



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



---

**CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE – BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA**

---

**EFEITOS DO MIRABEGRON, UM AGONISTA  $\beta_3$  ADRENÉRGICO  
SELETIVO, NAS RESPOSTAS CARDIOMETABÓLICAS DE  
CAMUNDONGOS OBESOS**

**CARMEM PERES VALGAS DA SILVA**

**Rio Claro – SP  
2018**



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



## **EFEITOS DO MIRABEGRON, UM AGONISTA $\beta_3$ ADRENÉRGICO SELETIVO, NAS RESPOSTAS CARDIOMETABÓLICAS DE CAMUNDONGOS OBESOS**

**CARMEM PERES VALGAS DA SILVA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Rio Claro, como requisito para para obtenção do grau de Doutora em Ciências da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade Humana)

**Orientador:** Profa. Dra. Angelina ZanESCO

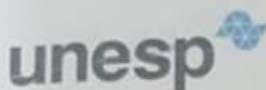
**Rio Claro - SP**

**2018**

617.1027 Silva, Carmem Peres Valgas da  
S586e Efeitos do mirabegron, um agonista beta 3 adrenergico seletivo, nas  
respostas cardiometabólicas de camundongos obesos / Carmem Peres  
Valgas da Silva. - Rio Claro, 2018  
102 f. : il., figs., gráfs., forms., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Bióciências de Rio Claro  
Orientadora: Angelina ZanESCO

1. Medicina esportiva. 2. Mirabegron. 3. Obesidade. 4. Metabolismo.  
5. Pvat. 6. &#946;3-ar. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



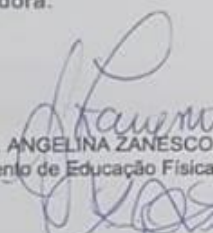
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeitos do Mirabegron, um agonista  $\beta_3$  adrenérgico seletivo, nas respostas cardiometabólicas de camundongos obesos

AUTORA: CARMEM PERES VALGAS DA SILVA

ORIENTADORA: ANGELINA ZANESCO

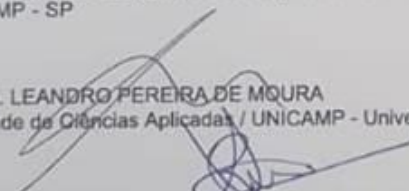
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, especialidade: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA pela Comissão Examinadora:




Prof. Dra. ANGELINA ZANESCO  
Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



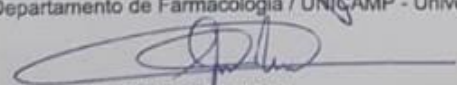
Prof. Dr. LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA  
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual - Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP



Prof. Dr. LEANDRO PEREIRA DE MOURA  
Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas - Limeira - SP



Prof. Dra. FABIÓLA TAUFIC MÔNICA IGLESIAS  
Departamento de Farmacologia / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas / SP



Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI  
Departamento de Farmacologia - Instituto de Ciências Biomédicas / USP - Universidade de São Paulo / SP

Rio Claro, 12 de abril de 2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Elizabeth e Carlos, meu irmão Felipe, vovó Ede, toda a minha família e a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste estudo.

“Sai de casa sempre assim que der  
Mas sai sem esquecer que a sua casa é sempre aqui.  
Sair de casa é só pra quem quer  
Pois a coragem anda a pé  
E vai te levar pra longe”

Coisa de casa – Outro Eu

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, por trazer ao mundo os ensinamentos que me levaram a crer no que creio, a agir como ajo, a amar como amo, a sonhar como eu sonho e me esforçar para sempre me colocar no lugar do outro. Pois minha fé me faz crer que toda a ciência do mundo de nada adianta sem a empatia e o amor.*

*Ao amor e apoio incondicional dos meus pais Elizabeth e Carlos, meu irmão Felipe, minha avó Ede, vó Luzia, Tia Fátima, Fernanda, Bruno e toda a minha família. Tudo o que fiz e faço é por vocês e graças a vocês. Nada me alegra mais que ver o sorriso em seus rostos quando se sentem orgulhosos de mim.*

*À minha Orientadora Dra. Angelina ZanESCO, a qual há 9 anos me ensina os passos para eu me tornar uma boa pesquisadora e professora. Muito obrigada pela paciência, sabedoria e otimismo, os quais contribuíram muito para que eu pudesse tomar as decisões sobre os caminhos que trilhei até agora. Toda a minha experiência e aprendizado dedico a você.*

*Às professoras Fernanda Priviero, Maria Andreia Delbin e Ana Paula Davel por toda a paciência e por tudo o que contribuíram na minha caminhada como pesquisadora desde a Iniciação Científica até hoje. Desse modo, agradeço aos professores Edson Antunes, Fabiola Mónica, Ana Paula Davel e Maria Andreia Delbin por cederem o espaço de seus laboratórios para a realização de parte da minha pesquisa.*

*Aos doutores Fabiano Calmasini e Eduardo Costa Alexandre pela ajuda inestimável ao desenvolvimento desse projeto.*

*Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq, que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e ao povo brasileiro, ao qual pertence o dinheiro investido nessa pesquisa.*

*À CAPES pela oportunidade que tive de realizar um estágio nos EUA onde tive um aprendizado inestimável.*

*À Dra. Kristin Stanford, Dr. Loren E. Wold e à Ohio State University por me receberem na Universidade e no laboratório de biologia celular e metabolismo, contribuindo para minha formação como pesquisadora com experiência em um laboratório no exterior.*

*Aos Doutores Tiago Figueira e Fernanda Priviero, que em minha qualificação contribuíram com ideias importantes para o término dessa pesquisa.*

*Aos bioteristas Miguel, Toninho, Aguinaldo e Francine que cuidaram de nossos camundongos com muito zelo e respeito para garantir a qualidade de nossa pesquisa.*

*Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia da Vasomotricidade do IB Unicamp: Jamaira, Dani, Andressa, Amanda, Aline, Hygor, Nadia, Stefano, do laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física da Unesp Rio Claro: Iane, Maycon, Rodrigo, Carlos, Guilherme, Chadi, e do Departamento de Farmacologia da Unicamp: Fabiano, Eduardo, Fábio, Mari, Julio, Celso, Luiz, Glaucia, Tuany e Renata. Tenho muita sorte por ter feito parte de laboratórios onde todos se respeitam e se ajudam. Muito obrigada pela amizade, conversas e troca de experiências que foram essenciais para o meu desenvolvimento como pesquisadora e como ser humano.*

*À UNESP Rio Claro e todos os seus funcionários (principalmente à Ivana) por todo o apoio para que essa pesquisa de doutorado se desenvolvesse.*

*À “mãe” UNICAMP, em especial à Faculdade de Educação Física (FEF), pois foi lá que tudo começou: Todo dia que entrava por aqueles portões agradecia a Deus por me conceder viver aquele sonho...Na FEF aprendi muito, não apenas a amar e a viver a Educação Física, mas também a ser uma pessoa melhor. Tenho muito orgulho dessa profissão que é tão pouco valorizada, me sinto preparada para lutar para que isso mude. Obrigada por isso FEF...*

*A todos os amigos que fiz durante essa caminhada, especialmente aos amigos do oGrupo de dança, Rudá, FEF Unicamp, Ohio State University e comunidade Maria Luzia: Caio Graco, Eduardo Ortiz, Helena Jatkoski, Paulinha Westin, Sansão, Cecília Gonçalves, Francisco Cabelo, Guilherme Campese, Alexandre Garcia, Oeslle Lucena, Paulo Lima, Rafael Bergo, Tais Orlandin, Thais Sousa, Evandro Takeshi, Rodrigo Yasuda, Rodrigo Ferla, Victor Pretti, Erika Marques, Rodolfo Finatti, Caio Reis, Ricardo Maçaneiro, Jarbas Bernardino, Artur MV, Simone Kishimoto, Jorge Torres, Srividya Suresh, Jordan Millard, Eddie Nunez, Brandon Sanders, Cosan, Ana Claudia, Vineeta, Jasspreet, Revati, Vikram, Daniel Santos, Gabriel Santos, Lindsay Letícia, Mariana Detoni e Laura Detoni. Todos vocês em algum momento me ouviram e me aconselharam nos momentos de angústia e dúvidas. Os momentos alegres que passei ao lado de vocês me ajudaram a aliviar minhas tensões e medos, me dando alegria e energia para prosseguir. De maneira especial, agradeço ao meu querido amigo Paulo Pinto por todo o apoio que me foi dado desde o início. As nossas conversas foram de valor imensurável e posso dizer sem sombra de dúvidas que você foi uma das pessoas que mais contribuíram para eu*

*conseguir concluir essa fase da minha vida. Desse modo, preciso agradecer também ao Aldenir Antunes, Gui Pierrotti e Paula: O trabalho de vocês garante semanalmente a alegria e a renovação das energias de muitas pessoas, fico muito feliz pela oportunidade de poder fazer parte do oGrupo de dança e Rudá Bar.*

*A todos os professores que tive, pois seus ensinamentos formaram a base de tudo o que conheço, pretendo conhecer e nada temer...*

*Serei eternamente agradecida a todos vocês...*



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	Página
1 - Lipogênese e lipólise em adipócitos.....	23
2 - Lipólise mediada por sinalização $\beta_3$ -AR.....	24
3 - Inflamação crônica de baixo grau na obesidade.....	26
4 - Sinalização de redução da sensibilidade à ação da insulina na obesidade.....	27
5 - Aumento da lipólise via TNF- $\alpha$ .....	28
6 - Esteatose hepática não alcoólica e suas consequências.....	29
7 - Estimulação da termogênese induzida pela ligação da noraepinefrina aos receptores $\beta_3$ -AR nos adipócitos do tecido adiposo marrom.....	31
8 - Localização anatômica dos depósitos de tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom e tecido adiposo bege em roedores e seres humanos.....	33
9 - Localização anatômica dos depósitos de tecido adiposo branco adiposo perivascular e histologia.....	36
10 - Efeitos do tratamento com Mirabegron sobre a composição corporal e consumo calórico.....	52
11 - Efeitos do tratamento com Mirabegron no gasto energético.....	53
12 - Efeitos do tratamento com Mirabegron no gasto energético.....	54
13 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na disposição das gotículas lipídica do tecido adiposo marrom.....	55
14 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na disposição das gotículas lipídica do tecido adiposo inguinal.....	56
15 - Expressão proteica de UCP1 no Tecido adiposo marrom e Tecido adiposo inguinal.....	57
16 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na temperatura da região interescapular e caudal.....	58
17 - Imagem termal representativa das regiões interescapular e caudal.....	59
18 - Efeitos do Mirabegron na temperatura retal.....	60
19 - Efeitos do tratamento com Mirabegron em ácidos graxos livres e glicerol séricos.....	61
20 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na histologia hepática.....	62

21 - Efeitos do tratamento com Mirabegron em TBARS, Leptina, TNF- $\alpha$ séricos, TNF- $\alpha$ da gordura epididimal e do tecido adiposo marrom.....	64
22 - Efeitos do tratamento com Mirabegron em parâmetros glicêmicos.....	72
23 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na pressão arterial caudal e frequência cardíaca.....	74
24 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na tolerância ao esforço.....	75
25 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na reatividade vascular.....	76
26 - Efeitos do tratamento com Mirabegron na histologia do tecido adiposo perivascular.....	78
27- Expressão proteica de UCP1 e TNF- $\alpha$ no PVAT.....	79

## TABELA

Página

1 – Peso corporal, perfil lipídico e índice aterogênico de camundongos obesos tratados com Mirabegron por 2 semanas.....	51
2 – Resposta máxima (Emax) and potência (pEC <sub>50</sub> ) em resposta aos agentes contrátil, Serotonina (5HT) e relaxante, Acetilcolina (ACh) .....	77
3- Sumário dos resultados do metabolismo energético e perfil lipídico.....	65
4- Sumário efeitos do Mirabegron no metabolismo glicídico.....	73
5- Sumário efeitos do Mirabegron no sistema cardiovascular e tolerância ao esforço.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$ – Micrograma	CTR+MIRA – Controle tratado com Mirabegron
5HT – Serotonina	dL – decilitro
AC – Adenilato ciclase	DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
ACh - Acetilcolina	$e^-$ - Elétron
AGL – Ácido graxo livre	EE – Gasto energético
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico	ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
AMPK – Proteína quinase ativada pelo AMP	eMAX - Resposta máxima
ANOVA – Análise de variância	eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
AQP7 – Proteína aquaporina do subtipo 7	EROs – Espécies reativas de oxigênio
ATP - Trifosfato de adenosina	FABP - Fatty acid-binding protein
AUC <sub>tau</sub> - Exposição	FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
Ca <sup>2+</sup> – Cálcio	FADH <sub>2</sub> - Flavina adenosina dinucleotídeo;
CAC – Ciclo do ácido cítrico	FAT - Fat acid transporter
CaCl <sub>2</sub> - Cloreto de cálcio	FCM – Faculdade de Ciências Médicas
CEMIB - Centro Multiinstitucional de Bioterismo	g – Grama
CEUA – Comitê de ética em estudos animais	GCs – Guanilato ciclase solúvel
CO <sub>2</sub> - Dióxido de carbono	Gi – Proteína G inibitória
C <sub>max</sub> - Pico de concentração plasmática	GLUT4–Transportador de glicose tipo 4
CT – Colesterol total	GMPC – Guanosina monofosfato cíclico
CTR – Controle tratado com veículo	H.E – Hematoxilina e eosina
	H <sup>+</sup> - Íon hidrogênio

H <sub>2</sub> O – Água	Km/h – Quilômetros por hora
HDL – Lipoproteína de alta densidade	L - Litro
HDL-C – Lipoproteína de alta densidade – colesterol	LDL – Lipoproteína de baixa densidade
HIF-1 – Fator induzível por hipóxia 1	LPL – Lipase lipoproteica
HOMA - homeostasis model assessment method	LSH – lipase hormônio sensível
HR – Frequência cardíaca	M – Molar
HSL – Lipase hormônio sensível	MDA – Malondialdeído
IA – Índice aterogênico	mg – Miligrama
IB – Instituto de biociências	MgSO <sub>4</sub> - Sulfato de magnésio
IκK - complexo quinase IκB	Min – Minutos
IL1-β – Interleucina 1 beta	Mira – Mirabegron
IL-6 – Interleucina 6	mM – Milimolar
IR – Receptor de insulina	MMP – Metaloproteinase de matriz
IRS-1 – Substrato do receptor de insulina	mRNA - RNA mensageiro
JNK – Proteína quinase c-Jun N-terminal	NaCl – Cloreto de sódio
K <sup>+</sup> - Íon potássio	NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
K <sub>ATP</sub> – Canais para potássio sensíveis a ATP	NAFLD – Doença hepática não alcoólica
Kcal – quilocaloria	NaHCO <sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio
KCL – Cloreto de potássio	NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B
kDa – Quilodalton	NO – Óxido nítrico
Kg – Quilograma	O <sub>2</sub> – Gás oxigênio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Hidrogenofosfato de potássio	OB – Obeso

OB+MIRA – Obeso tratado com Mirabegron	TAG – Triglicerídeo
°C – grau Celsius	TAM – Tecido adiposo marrom
PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio 1	TAS – Tecido adiposo subcutâneo
pEC <sub>50</sub> – Potência	TAV – Tecido adiposo visceral
PGC-1 $\alpha$ -coativador 1 $\alpha$ do receptor gama ativado pelo peroxisoma proliferador	TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
pH - Potencial de hidrogênio iônico	TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa
PKA – proteína quinase A	U – Unidades
PKG – Proteína quinase G	UCP1 – Proteína desacopladora mitocondrial 1
PPAR- $\gamma$ - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	UNESP – Universidade do Estado de São Paulo
PVAT- - Na ausência de tecido adiposo perivascular	UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
PVAT – Tecido adiposo perivascular	VCO <sub>2</sub> – Dióxido de carbono produzido
PVAT+ - Na presença de tecido adiposo perivascular	VEGF – fator de crescimento vascular endotelial
QR – Quociente respiratório	VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
S.E.M – Erro padrão da média	VO <sub>2</sub> – Consumo de oxigênio
SNA – Sistema nervoso autônomo	VO <sub>2máx</sub> - Consumo máximo de oxigênio
SNP – Sistema nervoso parassimpático	YM-178 – Mirabegron
SNS – Sistema nervoso simpático	$\alpha$ -AR – receptor adrenérgico do subtipo alfa
SOCS3 - citocinas supressoras da sinalização 3	$\beta$ -AR – receptor adrenérgico do subtipo beta
SREBP1 - lipogenic gene sterol regulatory element-binding protein 1	$\beta$ -oxidação – Beta-oxidação
TAB – Tecido adiposo branco	$\mu$ M – Micromolar

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	19
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 - Sistema nervoso simpático.....	20
2.2 - Tecido adiposo.....	20
2.3.1 - Lipogênese e Lipólise.....	21
2.3 - Tecido adiposo como órgão endócrino .....	24
2.4 - Obesidade e inflamação.....	25
2.4 - Tecido Adiposo Marrom/Bege e receptores $\beta_3$ -adrenérgicos ( $\beta_3$ -AR).....	30
2.5 - Receptores $\beta_3$ adrenérgicos e relaxamento do músculo liso vascular.....	34
2.6 - Receptores $\beta_3$ -AR e Tecido Adiposo Perivascular.....	34
2.7 - Mirabegron.....	36
3. - JUSTIFICATIVA.....	38
4. - OBJETIVOS.....	40
5. - MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1 - Animais.....	41
5.2 - Tratamento com Mirabegron (Mira).....	41
5.3 - Peso corporal, consumo alimentar e gordura epididimal.....	43
5.4 - Pressão arterial indireta.....	43
5.5 - Calorimetria indireta.....	43
5.6 - Medida da temperatura retal e detecção de temperatura por câmera de imagem termal.....	43
5.7 - Teste de tolerância ao esforço.....	43
5.8 - Obtenção dos valores de glicemia de jejum.....	44
5.9 - Teste de sensibilidade à insulina.....	44
5.10 - Obtenção das amostras de soro.....	44
5.11 - Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	44
5.11.1 - Insulina.....	44
5.11.2 - Perfil lipídico e índice aterogênico.....	45
5.11.3 - Ácidos graxos livres e glicerol.....	45
5.11.4 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), leptina e TNF- $\alpha$ .....	45
5.12 - Avaliação morfológica.....	46
5.13 - Avaliação das proteínas de interesse por Western Blot.....	46
5.14- Reatividade vascular.....	48
5.15 - Análise estatística.....	49
6. - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.1 - Parte 1: metabolismo energético e perfil lipídico.....	50
6.1.1 - Peso corporal, perfil lipídico e índice aterogênico.....	50
6.1.2 - Gordura epididimal e ingestão calórica.....	50
6.1.3 - Calorimetria .....	52

6.1.4 - Morfologia do tecido adiposo marrom e inguinal, expressão proteica, temperatura retal, interescapular e caudal.....	54
6.1.5 - Ácidos graxos livres (AGL) e glicerol.....	60
6.1.6 - Morfologia do tecido hepático.....	61
6.1.7 - Concentração de TBARS, Leptina e TNF- $\alpha$ .....	63
6.1.8 - Discussão dos efeitos do Mirabegron sobre o perfil lipídico e o metabolismo energético.....	66
6.2 – Parte 2: Resultados e discussão dos efeitos do Mirabegron sobre o metabolismo glicídico.....	71
6.2.1 - Perfil glicêmico.....	71
6.2.2 - Discussão: efeitos do Mirabegron no metabolismo glicídico.....	73
6.3 - Parte 3: resultados e discussão dos efeitos do Mirabegron sobre o sistema cardiovascular e tolerância ao esforço.....	74
6.3.1 - Pressão arterial caudal e frequência cardíaca.....	74
6.3.2 - Tolerância ao esforço.....	74
6.3.3 - Curvas concentração-resposta em anéis de aorta.....	75
6.3.4 - Morfologia do tecido adiposo perivascular.....	77
6.3.5 – Expressão proteica de UCP1 e TNF- $\alpha$ no PVAT.....	78
6.3.6 - Discussão: efeitos do Mirabegron sobre o sistema cardiovascular e tolerância ao esforço.....	80
7 - CONCLUSÕES.....	83
8 – LIMITAÇÃO.....	83
10. - REFERÊNCIAS.....	84

## RESUMO

O sistema nervoso simpático desempenha importante papel no sistema cardiovascular e no metabolismo, sendo que os receptores adrenérgicos do subtipo  $\beta_3$  ( $\beta_3$ -AR) estão amplamente distribuídos em diferentes células, encontrando-se especialmente no tecido cardíaco, musculatura lisa e tecido adiposo. Esses receptores estão relacionados a diversas ações fisiológicas, como relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, lipólise do tecido adiposo branco e termogênese do tecido adiposo marrom. Por outro lado, a importância dos  $\beta_3$ -AR no tecido adiposo perivascular (PVAT) e regulação do tono vascular não é conhecida. O mirabegron (YM-178) é um agonista  $\beta_3$ -AR seletivo, atualmente desenvolvido por Astellas Pharma Inc., e aprovado desde 2012 pelos EUA, para tratamento de bexiga hiperativa, considerando a ação dos receptores  $\beta_3$ -AR no relaxamento do músculo liso. Contudo não existe nenhum estudo envolvendo o mirabegron nos parâmetros cardiometabólicos plasmáticos e no metabolismo do tecido adiposo e em modelos de obesidade. **Objetivos:** Analisar os efeitos do tratamento de Mirabegron (Mira), um agonista  $\beta_3$ -AR seletivo, por duas semanas em parâmetros cardiometabólicos e reatividade vascular na presença ou ausência de PVAT de camundongos obesos. **Métodos:** Camundongos C57BL/6J foram divididos em grupos controle veículo (CTR), controle tratado com Mira (CTR+MIRA), obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD 12 semanas) tratado com veículo (OB) e obeso tratado com Mira (OB+MIRA). Mira foi administrado por duas semanas (10mg/kg) na forma de gavagem. Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh 100pM a 30  $\mu$ M) e serotonina (5HT 1nM a 30 $\mu$ M) foram realizadas em anéis de aorta PVAT+, PVAT-. Foram medidos a temperatura corporal e gasto energético; bem como pressão arterial, frequência cardíaca e tolerância ao esforço, além de análises bioquímicas de perfil lipídico, glicemia de jejum, insulina sérica, Glicerol, AGL, TBARS, leptina e TNF- $\alpha$ . Foram calculados o índice HOMA e o índice aterogênico. A histologia hepática e dos depósitos de tecido adiposo foi realizada pela coloração de hematoxilina e eosina. **Resultados:** O tratamento com Mira (OB+ mira) por duas semanas aumentou o gasto energético (17%) sem alterar a temperatura corporal, redução do peso corporal (7%), gordura epididmal (25%), colesterol total (17%), LDL-C (55%), índice aterogênico (45%), TBARS (20%), TNF- $\alpha$  (48%), Glicerol e AGL (40%), insulina (67%), e índice HOMA (65%) quando comparados ao grupo OB. Os níveis elevados de leptina (1000%) no grupo OB não foram alterados pelo Mira. Como esperado os depósitos de lipídios hepáticos, do TAM e PVAT foram aumentado com a dieta HFD e Mira reverteu parcialmente essa alteração, observados na histologia. Observamos modificação nas gotículas lipídicas tecido adiposo inguinal dos grupos CTR+MIRA e OB+MIRA. Anéis com PVAT+ apresentaram aumento na resposta máxima ( $E_{max}$ ) à 5HT (%KCl) em anéis de aorta de OB+MIRA (109 $\pm$ 10) comparado aos outros grupos (CTR: 69 $\pm$ 9; CTR+MIRA: 77 $\pm$ 11; OB: 65 $\pm$ 9). **Conclusão:** Em camundongos obesos, o tratamento com Mira por duas semanas resultou em modificação dos tecidos adiposos marrom e inguinal, aumento do gasto energético, melhora de importantes parâmetros bioquímicos como o perfil lipídico e glicêmico, além de reduzir o marcador de estresse oxidativo TBARS, sem contudo alterar a tolerância ao esforço, pressão arterial e frequência cardíaca. Entretanto, em anéis de aorta PVAT+, o tratamento com Mira resultou em aumento da  $E_{max}$  para 5-HT.

Palavras chave: Mirabegron, obesidade, metabolismo, PVAT, termogênese,  $\beta_3$ -AR.



## ABSTRACT

Sympathetic nervous system plays an important role in the cardiovascular system and metabolism. In particular, the  $\beta_3$  subtype adrenergic receptors ( $\beta_3$ -AR) are widely distributed in different cells, especially in cardiac tissue, smooth muscle and adipose tissue. These receptors are related to several physiological actions, such as vascular and non-vascular smooth muscle relaxation, lipolysis and thermogenesis. In addition,  $\beta_3$ -AR participates in the increasing of the number of mitochondria at specific sites of white adipose tissue, called browning of white adipose tissue. Finally, it is not known whether these receptor subtypes may play a role in regulation of the perivascular adipose tissue (PVAT) vasomotricity. Despite these important actions involving these receptor population, studies involving selective  $\beta_3$ -AR agonists on obesity state are scarce. Mirabegron (YM-178) is a selective  $\beta_3$ -AR agonist, currently developed by Astellas Pharma Inc. and approved since 2012 by the USA for overactive bladder treatment, considering the action of  $\beta_3$ -AR receptors on smooth muscle relaxation. Interestingly, there is no study involving the effects of mirabegron on cardiometabolic parameters, adipose tissue metabolism in obesity models. **Objectives:** To examine the effects of Mirabegron (Mira) treatment, for two weeks on cardiometabolic parameters and vascular reactivity in the presence or in the absence of PVAT in obese mice. **Methods:** C57BL/6J mice were divided into vehicle control (CTR), Mira treated (CTR + MIRA), obese mice fed with hyperlipid diet (HFD 12 weeks) treated with vehicle (OB) and obese treated with Mira (OB + MIRA). Mira was given for two weeks (10mg / kg) as a gavage. Concentration-response curves to Acetylcholine (ACh 100pM at 30 $\mu$ M) and serotonin (5HT 1nM at 30 $\mu$ M) were obtained in PVAT + aorta rings, PVAT-. Body temperature and energy expenditure were measured as well as biochemical parameters: lipid profile, fasting glycemia, serum insulin, glycerol, FFA, TBARS, leptin and TNF- $\alpha$ . HOMA index and atherogenic index were calculated. Hepatic and adipose tissue histology was performed by staining hematoxylin and eosin. **Results:** Treatment with Mira for two weeks increased energy expenditure (17%), without alteration in body temperature. Reduction in body weight (7%), epididymal fat (25%), total cholesterol (17%), LDL-C (55%), atherogenic index (45%), TBARS (%), TNF- $\alpha$  (48%), Glycerol and AGL (40%), insulin (67%) and HOMA index (65%) was seen in OB + MIRA when compared with OB group. The increase in leptin levels (1000%) in OB group was not modified by Mira. In contrast, the increased lipid deposits in hepatic, TAM and PVAT, observed in histology, was partially reversed by Mira. We observed changes in lipid droplets in the inguinal adipose tissue of CTR+MIRA and OB+MIRA groups. Rings with PVAT + showed an increase in the  $E_{max}$  to 5HT (% KCl) in aortic rings of OB + MIRA ( $109 \pm 10$ ) compared with the other groups (CTR:  $69 \pm 9$ ;  $65 \pm 9$ ; CTR+MIRA:  $77 \pm 11$ ; OB:  $65 \pm 9$ ). **Conclusion:** In obese mice, treatment with Mira for two weeks resulted in modification of brown and inguinal adipose tissues, an increase in energy expenditure, improvement of biochemical parameters such as lipid profile and glycemia, without any modification in the tolerance to exercise effort, blood pressure and heart rate. On the other hand, in PVAT + aortic rings, Mira treatment resulted in increased  $E_{max}$  to 5HT.

Key-words: Mirabegron, obesity, metabolism, PVAT, thermogenesis,  $\beta_3$  –AR.

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, principalmente caracterizada por hipertrofia dos adipócitos, o que resulta em aumento do peso corporal e da circunferência de cintura (SELBY et al., 1989; HAN et al., 1995). É comumente acompanhada por um desequilíbrio no metabolismo energético, glicêmico e no perfil lipídico. Esse desequilíbrio resulta em diversas comorbidades, especialmente as doenças cardiovasculares e o diabetes mellitus tipo 2 (VAN GAAL, 2006). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016) alerta que a obesidade já é um dos maiores problemas de saúde pública mundial e, além disso, projeta que para o ano de 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões serão considerados obesos. As modificações nutricionais que vêm ocorrendo ao longo das últimas décadas, onde tem sido cada vez maior a ingestão de alimentos ricos em açúcares simples e gorduras (particularmente a saturada, de origem animal) em conjunto com redução da prática de atividades físicas, resultam como uma de suas consequências na epidemia mundial dessa doença (MONTEIRO et al., 1995). Desse modo, o estudo sobre o metabolismo dos diferentes depósitos de tecido adiposo e de possíveis ferramentas farmacológicas seguras para o tratamento da obesidade são de grande interesse, uma vez que em parte significativa dos casos, o grau de alterações metabólicas advindas da obesidade impede uma eficiente intervenção alimentar e de atividades físicas necessárias ao tratamento do indivíduo obeso (SHIRAGA et al., 2006; PAULI et al., 2011). Considerando a complexidade de fatores envolvidos na gênese e consequências da obesidade, e a constante busca por formas de tratamento que complementem a necessária mudança de hábitos de vida, o presente estudo buscou avaliar os efeitos do tratamento com Mirabegron (Mira) por duas semanas, um agonista seletivo dos receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, sobre o metabolismo lipídico, glicídico e parâmetros cardiovasculares através da reatividade de aorta. Além disso, avaliamos os efeitos do Mira sobre o tecido hepático, adiposo marrom, subcutâneo inguinal e perivascular de camundongos obesos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Sistema nervoso simpático**

O sistema nervoso autônomo (SNA), também conhecido como sistema neurovegetativo ou sistema nervoso visceral, é a parte do sistema nervoso que está relacionada ao controle das funções vegetativas frente às modificações do ambiente, como a respiração, circulação, controle de temperatura, digestão e excreção. O SNA se subdivide em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) (GUYTON, HALL, 2011).

O SNS desempenha importante papel no sistema cardiovascular e no metabolismo através da liberação do neurotransmissor noradrenalina e do hormônio adrenalina. Essas catecolaminas ativam os receptores adrenérgicos localizados na membrana celular, regulando assim os diversos órgãos e sistemas (AHLQUIST, 1948; KIRSTEIN, INSEL, 2004). Os receptores adrenérgicos são classificados em  $\alpha$  ( $\alpha$ -AR) e  $\beta$  ( $\beta$ -AR) e estes podem ser subdivididos predominantemente em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (LANDS et al., 1967, GRANNEMAN et al., 1993). Particularmente, os receptores  $\beta_3$  adrenérgicos ( $\beta_3$ -AR) foram caracterizados ao final da década de 80, e sua clonagem permitiu a elucidação de alguns efeitos das catecolaminas não associadas à ativação dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (EMORINE, et al., 1989). Os receptores  $\beta_3$ -AR estão amplamente distribuídos em diferentes células, encontrando-se especialmente no tecido cardíaco, musculatura lisa e tecido adiposo (TROCHU et al., 1999; DAVIS et al., 2008). São receptores acoplados à proteína Gs (estimulatória), e sua ativação promove cronotropismo positivo, relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, lipólise no tecido adiposo branco e termogênese no tecido adiposo marrom (EASON et al., 1992; ROZEC et al., 2006; MUND, FRISHMAN, 2013).

### **2.2 Tecido adiposo branco**

De modo a garantir a sobrevivência da espécie em situações de escassez de nutrientes e redução da temperatura do meio ambiente, os mamíferos adquiriram a capacidade de estocar as calorias advindas de nutrientes (lipídios, carboidratos e proteínas) não utilizadas momentaneamente, para suprir as necessidades metabólicas posteriores (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). De modo especial, os lipídios podem

ser armazenados em grandes quantidades pois não necessitam da água como solvente, uma vez que são hidrofóbicos. Desse modo, permitem em um menor espaço armazenar uma quantidade maior de energia para o metabolismo oxidativo aeróbio, tornando o tecido adiposo o principal reservatório energético do organismo. (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; LEHNINGER et al., 2007).

As unidades celulares mais abundantes do tecido adiposo são os adipócitos, os quais possuem a função principal de armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma. Os adipócitos podem armazenar maiores quantidades de TAG (lipogênese) ou disponibilizar ácidos graxos livres (AGL) para a circulação sanguínea (lipólise) a partir principalmente de estímulos neurais, hormonais, estado nutricional e atividade física (AHIMA, FLIER, 2000; LUO, LIU, 2016). O tecido adiposo é também composto por pré-adipócitos, fibroblastos, células do sistema imune (especialmente macrófagos), células do estroma vascular, matriz de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e tecido nervoso (AHIMA, FLIER, 2000; FERRANTE, 2007).

Existem diferentes tipos de depósitos de tecido adiposo no organismo e, embora todos possuam a capacidade de realizar lipogênese e lipólise, suas características histológicas e funcionais variam bastante entre si. Alguns diferentes depósitos de tecido adiposo serão apresentados para possibilitar a compreensão do estudo (PÉNICAUD et al., 2000).

### **2.2.1 Lipogênese e Lipólise**

Lipogênese é o processo onde ocorre a incorporação de TAG, a partir de 3 moléculas de AGL e uma de glicerol, ao adipócito. Esse processo ocorre quando há aumento da disponibilidade de AGL e quilomícrons (vindos da absorção intestinal e quebrados pela enzima lipase lipoproteica, a LPL, no endotélio dos capilares dos adipócitos) na circulação sanguínea. A atividade da LPL é regulada de acordo com cada tecido onde se encontra, sendo que no tecido adiposo, sua ativação permite a distribuição de triglicérides para o órgão metabolicamente ativo em condições pós-prandiais (KERSTEN, 2014). Um dos principais estímulos para a lipogênese é o aumento das concentrações plasmáticas do hormônio insulina, o qual é liberado pelo pâncreas após aumento da glicemia resultante da alimentação. O glicerol 3-P e a acetil-CoA necessários para a formação do TAG provém do metabolismo da glicose, a qual

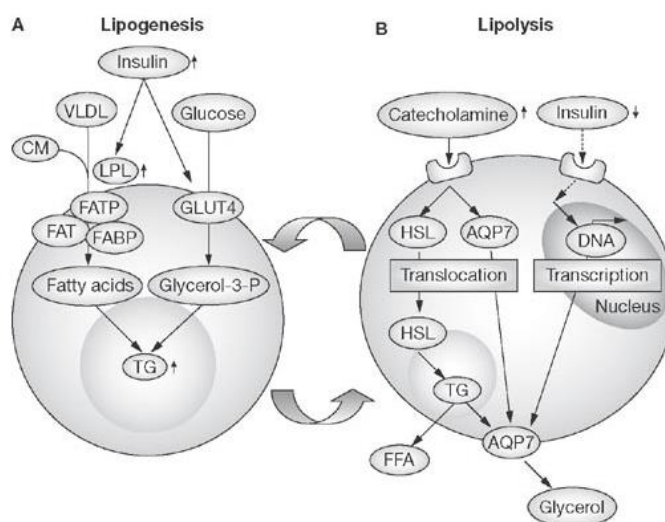
entra no adipócito por difusão facilitada através do carreador GLUT-4, estimulado pela insulina (ASSIMACOPOULOS-JANNET et al., 1995). Além disso, a insulina tem a função de estimular a LPL, enzimas lipogênicas, inibição da quebra de TAG armazenado, e estimular a expressão de genes lipogênicos como o *lipogenic gene sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP1). Sendo assim, a ação do hormônio insulina é essencial ao processo de lipogênese, tanto no tecido adiposo quanto no fígado (FERRÉ, FOUFELLE, 2007; TEMPLEMAN et al., 2017), (Figura 1).

O principal estoque de TAG no organismo encontra-se no TAB, sendo sua principal localização a região subcutânea, a qual possui grande capacidade de expansão devido a elasticidade da pele. Porém, o TAB é também encontrado na região visceral/abdominal (TAV) e perivascular (BJORNTORP, 1996; LANTHIER, LECLERCQ, 2014). Além disso, estoques de TAB podem ser formados em outros órgãos, como fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco e pâncreas, sendo esses estoques denominados de gordura ectópica. O aumento excessivo da disponibilidade de substratos energéticos circulantes é uma das principais causas do acúmulo de gordura ectópica, sendo esse um dos responsáveis pelas complicações da obesidade e dislipidemias, como a resistência à insulina e disfunção mitocondrial (GOODPASTER, WOLF, 2004; SHULMAN, 2014; ZACHAREWICZ et al., 2018).

Lipólise é o processo denominado à quebra da molécula de TAG em AGL e glicerol (FRAYN et al., 2003) (figura 1). Esse processo fisiológico é estimulado por situações de demanda energética como no jejum, frio e exercício físico, sendo fundamental à homeostase energética. Os AGL possuem importantes funções no organismo, incluindo: a) substrato energético para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) pelas mitocôndrias; b) influência na ação da insulina e no metabolismo glicêmico em alguns tecidos; e c) são substratos para a produção de lipoproteínas no fígado (HAGENFELDT et al., 1972; ARNER, 2003; ZHENG et al., 2014).

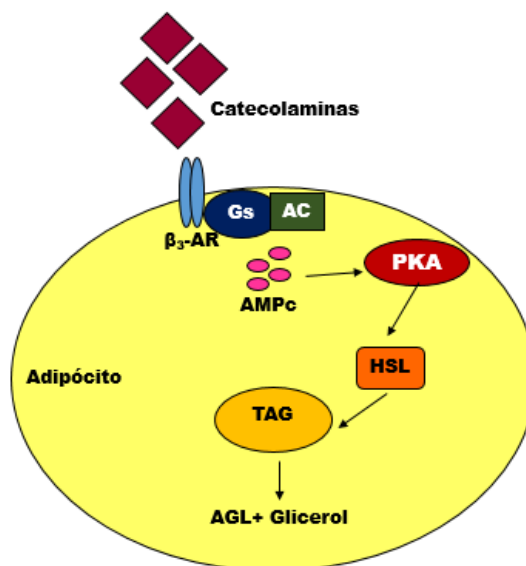
Em seres humanos os principais mediadores da lipólise são as catecolaminas noradrenalina e adrenalina (ARNER, 2005; LAFONTAN, LANGIN, 2009; LAFONTAN, 2014). As catecolaminas influenciam a lipólise através da ligação aos subtipos de adrenoreceptores  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo ambos ligados à proteína G. No tecido adiposo, a ativação dos  $\beta_3$ -AR/Gs, ativará a enzima adenilato ciclase (AC), aumentando a formação do segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, irá fosforilar a lipase hormônio sensível (HSL), e essa promoverá a quebra de TAG em ácidos graxos

livres e glicerol (Figura 2). A via de sinalização também ativará a proteína AQP7, a qual será responsável pelo transporte do glicerol para fora do adipócito (MAEDA et al., 2008). Já a ativação dos receptores  $\alpha$ -AR ligados à proteína Gi (inibitória) inibirá a ativação da AC, inibindo a lipólise (KOLDITZ, LANGIN, 2010; ZOUHAL et al., 2013). O balanço na densidade dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  nos depósitos de tecido adiposo determinará os efeitos locais das catecolaminas. Sabe-se que existe maior densidade de receptores  $\beta$ -AR no tecido adiposo visceral (TAV) do que em outros, como no TAS, assim essa região é mais suscetível a lipólise (BERMAN et al., 1998; MAURIEGE et al., 1999; NGUYEN et al., 2014).



**Figura 1. Lipogênese e lipólise em adipócitos.**

(A) Sob estímulos lipogênicos, a insulina se liga ao seu receptor localizado na superfície dos adipócitos, o que causa a translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular, permitindo a entrada de glicose no adipócito. A glicose intracelular é convertida em glicerol 3-P. A insulina também ativa a enzima LPL localizada na superfície da célula endotelial. A enzima LPL ativada promove a remoção de ácidos graxos livres das lipoproteínas quilomícron e VLDL, para que eles possam entrar no adipócito por transportadores específicos como FABP, FAT e FATP. Os ácidos graxos livres e glicerol 3-P serão esterificados em triglicérides. (B) Sob estímulos lipolíticos, as catecolaminas estimulam os receptores  $\beta$ -AR na superfície dos adipócitos, o que resulta na ativação da enzima HSL e movimentação da proteína AQP7 para a membrana celular. Além disso, os níveis de mRNA de AQP7 são elevados em resposta à redução da insulina plasmática (MAEDA et al., 2008). GLUT-4: Transportador de glicose tipo 4; LPL: Lipase lipoproteica; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; FABP: Fatty acid-binding protein; FAT: Fat acid transporter; FATP: Fatty-acid transport proteins; HSL: Lipase sensível a hormônio; AQP7: Aquaporina 7;



**Figura 2. Lipólise mediada por sinalização  $\beta_3$ -AR.** A interação das catecolaminas aos receptores  $\beta_3$ -AR leva à formação do segundo mensageiro, o AMPc, o qual fosforila a PKA, levando à estimulação da HSL e quebra de TAG em AGL e glicerol, sendo essa uma das principais vias pelas quais as catecolaminas estimulam a lipólise. AC: Adenilato ciclase; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína quinase A; TAG: triacilglicerol; AGL: ácidos graxos livres.

### 2.3 Tecido adiposo como órgão endócrino

O TAB, além de ser um importante estoque energético, isolante térmico e possuir a função de redução de impactos, apresenta também importante função endócrina, produzindo adipocinas que regulam o metabolismo energético, o processo inflamatório, a saciedade e a sensibilidade à insulina (BALISTRERI et al., 2010; SMITH, KAHN, 2016; KURYZKO et al., 2016).

O primeiro hormônio liberado pelo TAB a ser descoberto foi a leptina, em 1994, sendo essa uma das principais adipocinas liberadas pelo tecido adiposo, especialmente no TAS (TARTAGLIA et al., 1995; HUBE et al., 1996; CUI et al., 2017). A liberação de leptina é diretamente proporcional à quantidade de tecido adiposo. Conseqüentemente, os níveis dessa adipocina indicam os níveis das reservas energéticas aos centros de controle da homeostase energética, inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto calórico, aumentando a atividade do SNS e da oxidação de ácidos graxos na musculatura esquelética (FREDERICH et al., 1995; CUI et al., 2017).

As interleucinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e a IL-6, liberadas principalmente pelo TAV, estão relacionadas ao sistema imune, desempenhando importante função na

inflamação induzida pela obesidade (PROENÇA et al., 2014). Outras importantes adipocinas liberadas pelo TAB são a adiponectina, visfatina, resistina, angiotensina 2, apelina, dentre outras (AHIMA, 2006; GALIC et al., 2010; SMITKA, MARESOVÁ, 2015).

O desequilíbrio entre a produção de adipocinas pelo TAB, especialmente o aumento da liberação de adipocinas pró-inflamatórias no TAV, são fatores chaves para o desenvolvimento das comorbidades relacionadas à obesidade, como a inflamação crônica de baixo grau e a resistência à insulina (SANYAL et al., 2017).

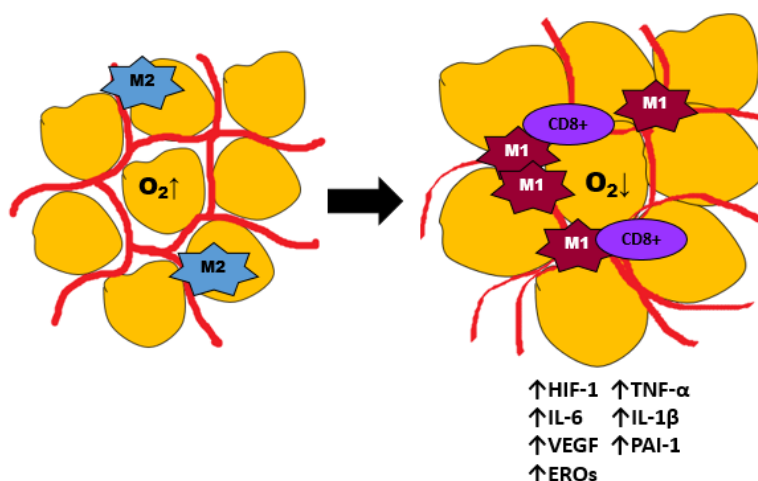
## 2.4 Obesidade e inflamação

Quando há uma maior ingestão calórica em detrimento ao gasto, o balanço energético torna-se desequilibrado. Conforme há um aumento no processo de lipogênese em relação ao de lipólise, o resultado é uma hipertrofia dos adipócitos, levando a uma expansão dos depósitos do TAB (ROSENBAUM, LEIBEL, 1998; IITSUKA et al., 2016). O TAS tende a acumular mais lipídios em seus adipócitos, pois possui uma menor população de receptores  $\beta$ -AR e maior expressão de receptores do subtipo  $\alpha$ , os quais são responsáveis por uma sinalização inibitória da lipólise (KERSHAW, FLYER, 2004). Além disso, o TAS possui uma maior sensibilidade à insulina, tornando a via lipogênica mais eficiente nesses depósitos. Contudo, a hipertrofia dos adipócitos característica da obesidade ocorre também no TAV, especialmente em indivíduos do sexo masculino de meia idade (tendência a maiores depósitos de TAV relacionados à redução dos níveis do hormônio testosterona, efeito resultante do processo de envelhecimento) e mulheres após a menopausa devido a perda do efeito protetor do estrógeno, o qual é responsável por favorecer o acúmulo de gordura na região subcutânea (MONTAGUE et al., 1998; BLAAK, 2001; PINKAS et al., 2016; MORETTI et al., 2017).

A hipertrofia dos adipócitos resulta em uma compressão mecânica dos vasos sanguíneos locais, especialmente no TAV (que é mais vascularizado e com menor espaço para expansão) resultando em hipóxia. A redução da disponibilidade de oxigênio levará o TAV a liberar uma série de citocinas e adipocinas inflamatórias como IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , leptina, metaloproteinasas de matriz (MMPs) e fatores de angiogênese como o fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial*



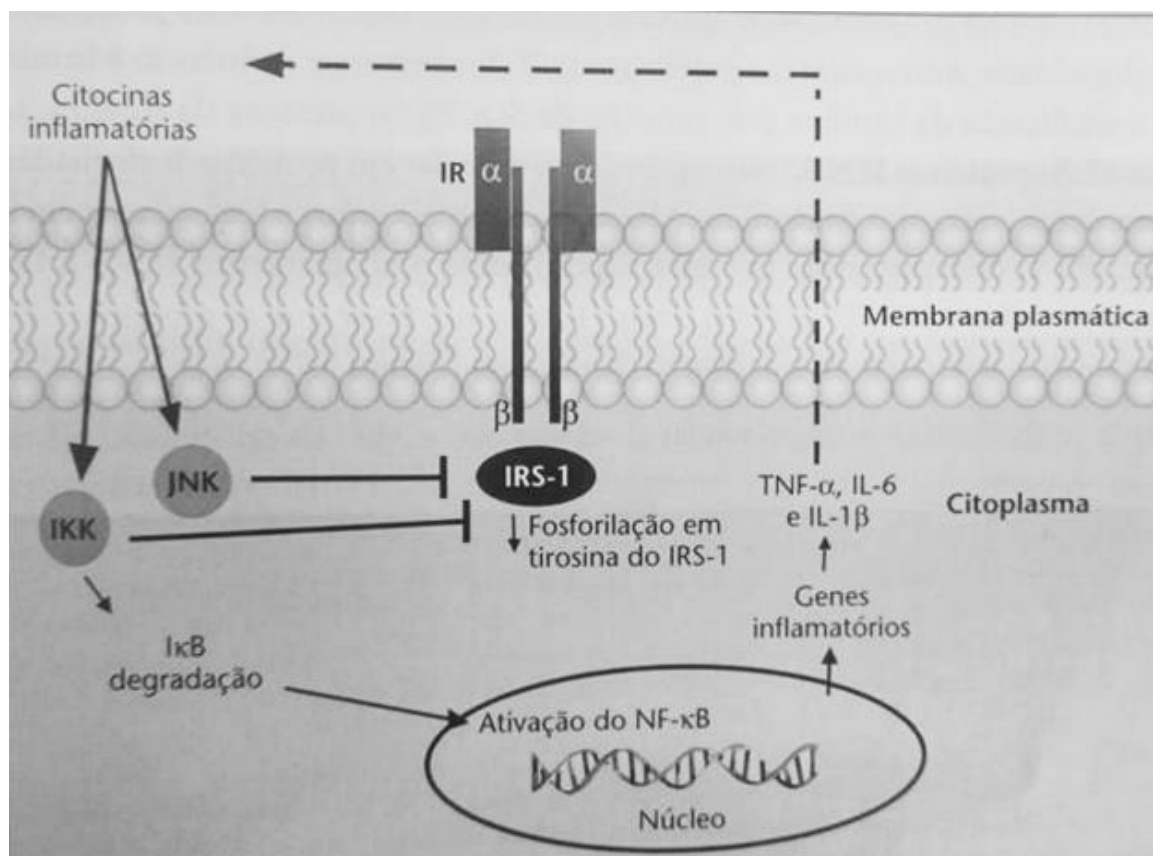
*growth factor* -VEGF) (CHEN et al., 2006; REVELO et al., 2014). A resposta mais significativa à hipóxia é desempenhada pelo fator induzido por hipóxia (hypoxic inducible fator, o HIF-1), o qual funciona como um sensor para as baixas concentrações de oxigênio (WANG, SEMENZA, 1993). A ativação desses mediadores resulta em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (aumento da oxidação de componentes celulares por espécies reativas de oxigênio –EROs - e redução da defesa antioxidante) local, apoptose e necrose, recrutamento de células imunes para a região e expressiva conversão de macrófagos do tipo M2 (anti-inflamatórios) para M1 (pró-inflamatórios), angiogênese, liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-6, PAI-1 e resistina, diminuição da liberação de adipocinas anti-inflamatórias como a adiponectina e aumento da expressão de genes pró inflamatórios (BAYS et al., 2014). Por esses efeitos, a obesidade é conhecida por causar uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau (Figura 3).



**Figura 3. Inflamação crônica de baixo grau na obesidade.** A hipertrofia dos adipócitos na obesidade resulta em hipóxia e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo TAB, infiltração de células imunes e conversão de macrófagos do tipo M1 para M2. HIF-1: fator induzível por hipóxia 1; IL-6: interleucina 6; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; EROs: espécies reativas de oxigênio; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1.

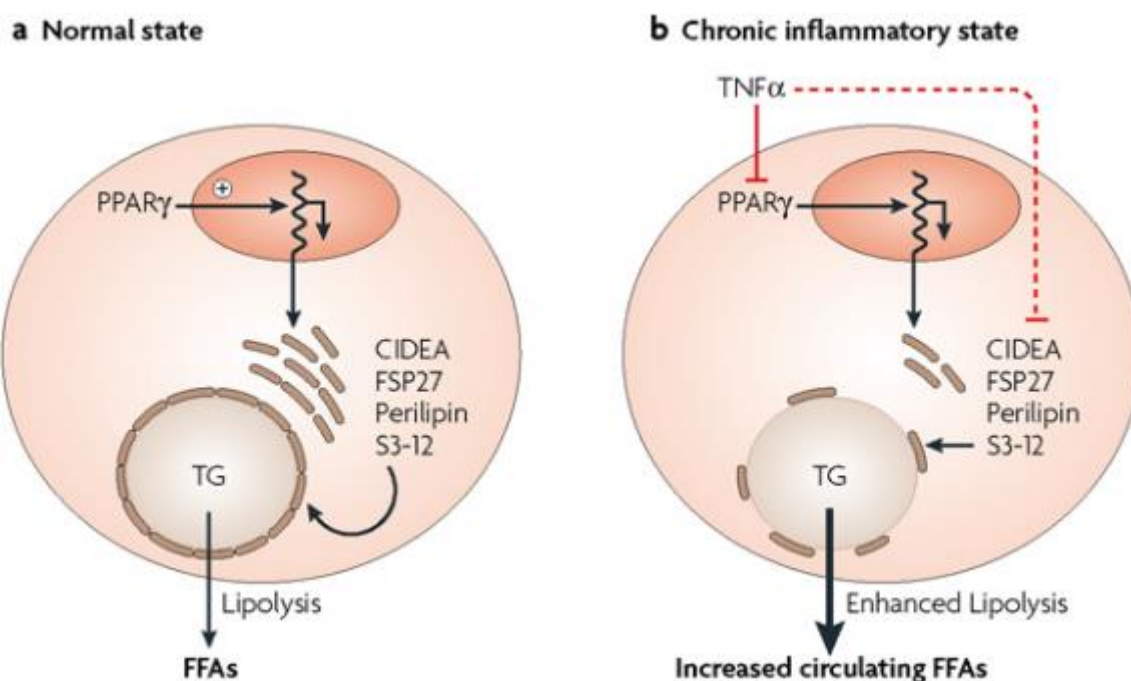
O aumento da produção e liberação sistêmica do TNF- $\alpha$  pelo TAB resulta em efeitos deletérios sobre a sinalização da insulina em tecidos insulino-dependentes, especialmente o músculo esquelético, que é o maior responsável pela utilização de glicose no organismo. O TNF- $\alpha$  ativará a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e o complexo quinase I $\kappa$ B (IkK), além de aumentar a expressão de citocinas supressoras da

sinalização 3 (SOCS3). Essas proteínas inibirão a capacidade de sinalização do receptor de insulina através da fosforilação do receptor e do substrato do receptor de insulina (IR e IRS-1) em sítios inibitórios de serina, de ação inibitória, resultando em redução da translocação de GLUT-4 e captação de glicose. Além disso, a ativação da IKK resulta em dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, permitindo que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B migre para o núcleo celular, ativando genes para a transcrição de mais citocinas pró-inflamatórias (Figura 4), caracterizando a resistência da ação da insulina, a qual resulta em hiperinsulinemia, e conseqüentemente DM2 (PAULI et al., 2011).



**Figura 4. Sinalização de redução da sensibilidade à ação da insulina na obesidade.** As vias inflamatórias podem ser ativadas por citocinas, como o TNF- $\alpha$ . A ação do TNF- $\alpha$  resulta em na ativação das quinases IKK e JNK, as quais fosforilam o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em serina, com efeito inibitório na sinalização e redução da translocação de GLUT-4 e captação de glicose. Além disso, essas vias levam à produção de outros mediadores inflamatórios por meio da ativação do NF- $\kappa$ B (PAULI et al., 2011). TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IKK: complexo quinase I $\kappa$ B; JNK: proteína quinase c-Jun N-terminal; GLUT-4: transportador de glicose tipo 4.

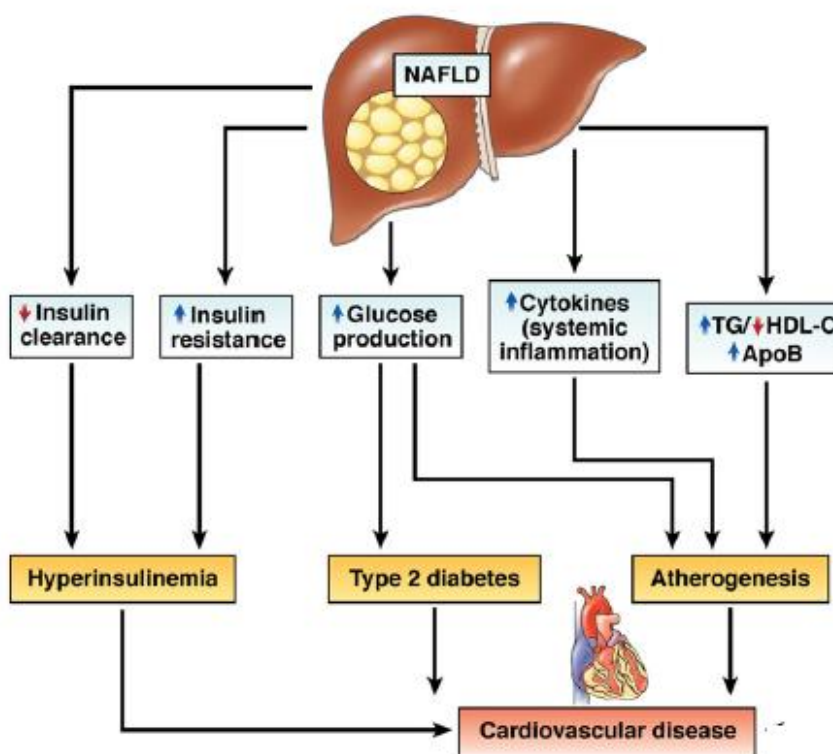
O TAV é um dos depósitos de tecido adiposo que se torna mais resistente à insulina, como consequência do aumento da ação do  $\text{TNF-}\alpha$ . Além disso, o aumento dos níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  resulta em aumento da ativação da HSL, via AMPc, além de reduzir a função e expressão de proteínas de empacotamento de gotículas lipídicas, como as perilipinas (ação indireta por inibição do fator de transcrição  $\text{PPAR-}\gamma$ ), o que resulta em lipólise e aumento de AGL na circulação (GUILHERME et al., 2008) como exemplificado na Figura 5. O aumento de AGL na circulação favorecerá sua captação e acúmulo em outros tecidos, como os tecidos adiposo marrom, epicárdico e perivascular, músculo esquelético e fígado, resultando em acúmulo de gordura ectópica, a qual contribuirá para a resistência à insulina.



**Figura 5. Aumento da lipólise via  $\text{TNF-}\alpha$ .** Além da ativação da HSL via dependente de AMPc, o aumento do  $\text{TNF-}\alpha$  no estado inflamatório crônico leva a uma redução da expressão de proteínas que mantém a estabilidade lipídica dentro dos adipócitos, como as perilipinas, resultando em aumento da liberação de AGL na circulação (GUILHERME et al., 2008).  $\text{TNF-}\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa;  $\text{PPAR}\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; FSP27: Proteína específica de gorduras 27.

No caso do fígado, o aumento da disponibilidade de AGL circulantes resulta em piora do quadro relacionado à resistência à insulina como, por exemplo, redução de seu *clearance*, ou seja, a depuração do hormônio (SVEDBERG et al., 1990). As taxas de *clearance* da insulina são inversamente proporcionais aos níveis de acúmulo de gordura local (KOTRONEN et al., 2007). A resistência à insulina ocorre de forma seletiva no fígado, onde a via mais prejudicada é a da glicogênese e a gliconeogênese é aumentada

em pessoas com resistência à insulina (CUSI, 2012). Entretanto, o estado de hiperinsulinemia resulta em aumento da expressão de SREBP-1c, ampliando a lipogênese em um processo denominado *de novo lipogenesis*, o qual em conjunto com o aumento da disponibilidade de AGL advindos da lipólise do TAV, resultarão na doença denominada esteatose hepática não alcoólica (NAFLD - *non alcoholic fat liver disease*) (DONNELLY et al., 2005; BRUNT et al., 2015). A NAFLD tem como consequência lipotoxicidade, disfunção mitocondrial, estresse de retículo endoplasmático, estresse oxidativo, fibrose e aumento da liberação para a circulação de lipoproteínas de muito baixa densidade ricas em TAG, como as VLDL (ADIELS et al., 2008; WANG et al., 2011; RINELLA, 2015). Na circulação sanguínea, as moléculas de VLDL se tornarão lipoproteínas de baixa densidade - LDL, o que resultará em um processo de dislipidemia, aumentando o risco de acúmulo de placas de gordura e inflamação nas artérias, processo denominado aterosclerose (GINSBERG et al., 2005; NEUSCHWANDER, 2017) (figura 6).



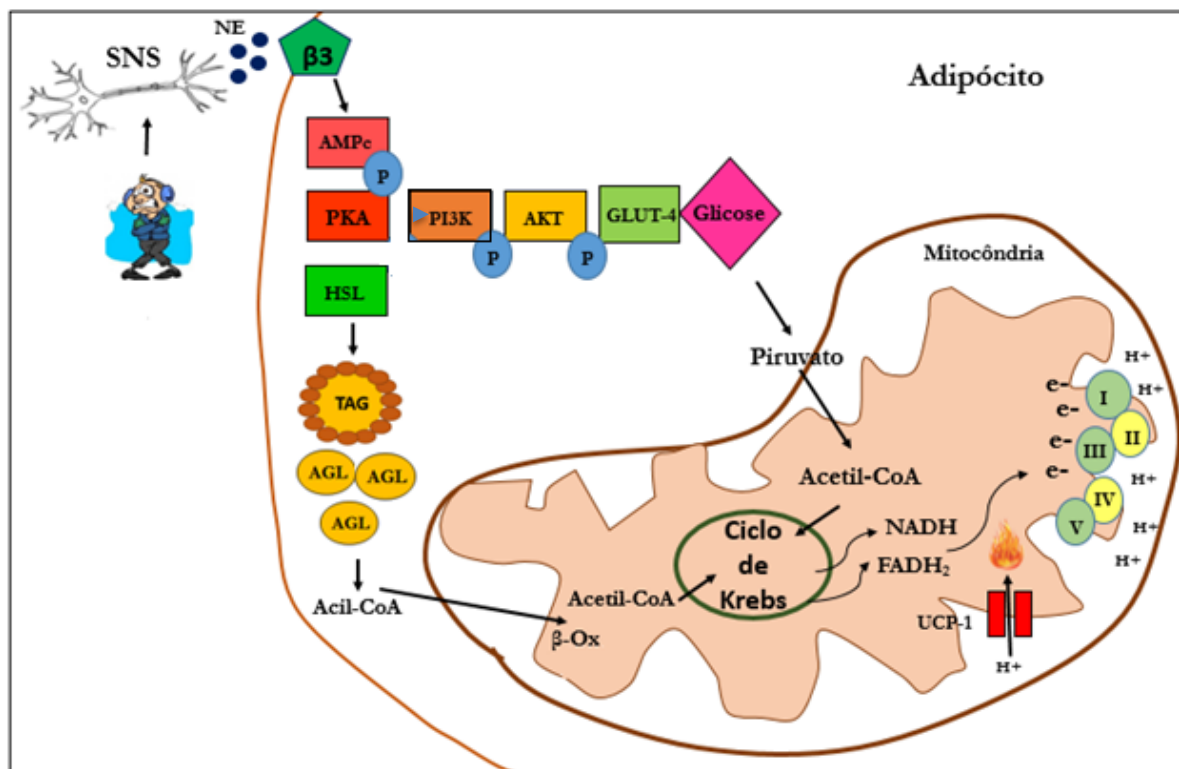
**Figura 6. Esteatose hepática não alcoólica e suas consequências.** A disponibilidade aumentada de AGL para a circulação leva à esteatose hepática, resultando em aumento da insulinemia, glicemia, alteração no perfil lipídico e consequentemente DM2 e doenças cardiovasculares. Adaptado de Cusi (2012).

## 2.4 Tecido Adiposo Marrom/Bege e receptores $\beta_3$ -adrenérgicos ( $\beta_3$ -AR)

O tecido adiposo marrom (TAM) é descrito como essencial para roedores e animais hibernantes. Até meados da última década, o TAM nos seres humanos era considerado como fonte de calor apenas em recém nascidos, já que nessa fase da vida a função de termogênese pelo mecanismo de tremores musculares ainda não está desenvolvido. Em seres humanos na fase adulta, o TAM era visto como praticamente inexistente (ARNER, 2005; TOWNSEND, TSENG, 2014). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a existência de quantidades significativas de TAM em adultos, em regiões como: ao redor do pescoço, clavícula e medula espinhal (NEDERGAARD et al., 2007; CYPESS et al., 2009), e que esses depósitos podem contribuir funcionalmente para o metabolismo dos substratos energéticos e termogênese (VIRTANEN et al., 2009; TOWNSEND, TSENG, 2014). O TAM apresenta elevado número de mitocôndrias, possuindo abundante expressão da proteína desacopladora da respiração mitocondrial UCP1 (*uncoupling protein*), cuja função é permitir a passagem de prótons gerados na cadeia de transporte de elétrons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Quando esses prótons passam pela proteína ATP sintase, ocorre a fosforilação oxidativa e a produção do ATP, entretanto, no TAM há grande desvio dessa passagem através da UCP1, resultando em aumento da respiração mitocondrial e dissipação de energia na forma de calor (BOUILLAUD et al., 1985; BORECKY et al., 2001; FEDORENKO et al., 2012).

Alguns estímulos, especialmente a exposição ao frio e queda da temperatura corporal, promovem aumento da estimulação do SNS, aumentando a liberação de catecolaminas, que por sua vez irão interagir com os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_3$  presentes no TAM. A densidade dos  $\beta_3$ -AR é significativamente e funcionalmente maior do que a de receptores  $\alpha$  e  $\beta_1$  no TAM (BRONNIKOV et al., 1999; CANNON, NEDERGAARD, 2004). Ao se ligar aos receptores  $\beta_3$ -AR, as catecolaminas ativarão a via estimulatória AMPc/PKA, resultando na ativação da HSL e hidrólise de triglicérides estocados na região do TAM, similar ao descrito para o TAB (ZHAO et al., 1994; MORAK et al., 2012). A PKA também levará ao aumento da captação de glicose por esse tecido, fornecendo substratos para o metabolismo mitocondrial e produção de calor pelas UCPs (CHERNOGUBOVA et al., 2004) (Figura 7). Além disso, a ativação da PKA levará à sinalização nuclear para aumento da expressão proteica de UCP1 (ROBIDOUX et al., 2005; CHEN et al., 2013). A ligação das catecolaminas aos  $\alpha_2$ -AR,

os quais são ligados à proteína Gi, inibirá a via de ativação da PKA, inibindo a termogênese (CANNON, NADERGAARD, 2004).



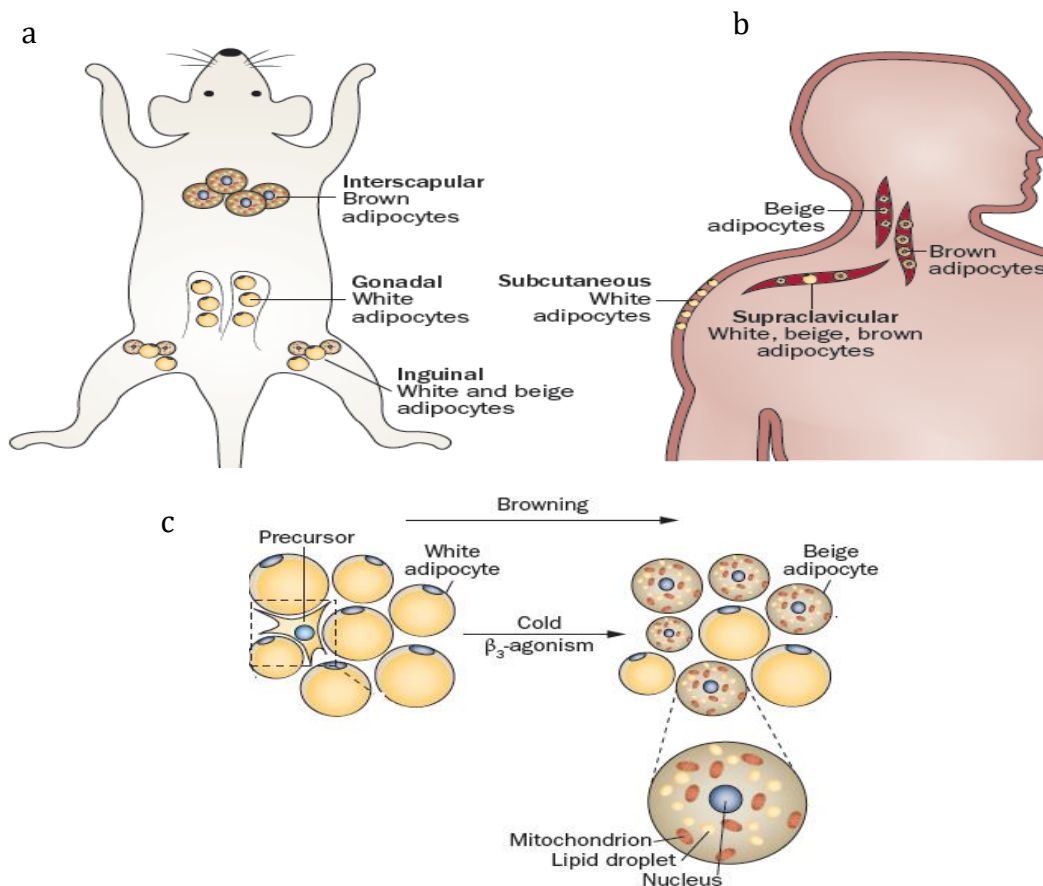
**Figura 7. Estimulação da termogênese induzida pela ligação da norepinefrina aos receptores  $\beta_3$ -AR nos adipócitos do tecido adiposo marrom.** Estímulos que resultam em ativação do SNS, como a exposição ao frio, resultarão na liberação de NE, ativação do  $\beta_3$ -AR, formação do segundo mensageiro AMPc e fosforilação da PKA. Essa via de sinalização resultará na lipólise de TAG e captação de glicose pela GLUT-4. Os substratos energéticos serão utilizados no ciclo de Krebs mitocondrial para a formação dos compostos reduzidos NADH e FADH<sub>2</sub>, os quais fornecerão os prótons necessários para a respiração mitocondrial. A UCP1 permitirá a passagem de prótons do espaço intermembranas para a matriz, desacoplando a fosforilação oxidativa, resultando em aumento da respiração mitocondrial e dissipação da energia na forma de calor (CANNON, NEDERGAARD, 2014). SNS: sistema nervoso simpático; NE: norepinefrina; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína quinase A; HSL: lipase sensível a hormônio; TAG: triacilglicerol; AGL: ácidos graxos livres; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: proteína quinase B; GLUT-4: transportador de glicose tipo 4; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; FADH: flavina adenosina dinucleotídeo; UCP1: proteína desacopladora mitocondrial 1.

Tem sido mostrado que alguns depósitos específicos de TAB, sob determinados estímulos, alteram seu fenótipo para “bege”, em um processo denominado como “*browning*” do tecido adiposo (NEDERGAARD, CANNON, 2014). Nessa modificação, o TAB adquire características fisiológicas e morfológicas de TAM, por aumentar o número de mitocôndrias e UCPs, aumentando o consumo de substratos energéticos para produção de calor. Estudos apontam que esse fenômeno ocorre em resposta a estímulos como: exposição ao frio, treinamento físico, agonistas do PPAR- $\gamma$

e agonistas dos receptores  $\beta_3$ -AR (FRONTINI, CINTI, 2010; KAJIMURA, SAITO, 2014) (Figura 8).

Devido à grande quantidade de UCP1 no TAM - cerca de 90% maior – que no tecido adiposo bege, a contribuição relativa dessas “células adiposas beges” à capacidade total de termogênese é muito baixa (KAJIMURA, SAITO, 2014; NEDERGAARD, CANNON, 2013). Contudo, evidências indicam que essas células podem contribuir significativamente para o aumento do gasto energético e poderiam contribuir para a redução do peso corporal (KAJIMURA, SAITO, 2014), o que torna de fundamental importância estudos que esclareçam melhor os estímulos que levam a esse *browning* do TAB, qual o impacto dessas adaptações para o metabolismo energético e prevenção e/ou tratamento da obesidade.

Estudos com agonistas de receptores  $\beta_3$ -AR, como o BRL-37344, CGP-12177 e o CL-316,243 mostram aumento da termogênese pelo TAM em modelos animais, e que a ativação dos  $\beta_3$ -AR por esses agentes poderia ser uma ferramenta farmacológica para o aumento do metabolismo energético e uma forma de tratamento para patologias como a obesidade e o DM2 (MOHELL, DICKER, 1989; HIMMS-HAGEN et al., 1994; MUND, FRISHMAN, 2013; WARGENT et al., 2013). Além disso, a administração de agonistas de receptores  $\beta_3$ -AR parece contribuir para o *browning* de algumas regiões de TAB subcutâneo de roedores (KOZA et al., 2000; LEE et al., 2012), resultando em prevenção da obesidade induzida por dieta hiperlipídica (COULTER et al., 2003). Essas informações mostram que a ativação da via  $\beta_3$ -AR/AMPC/PKA pode levar ao aumento da utilização de substratos energéticos tanto no TAM quanto pelo processo de *browning* do TAB, contribuindo para o controle do peso corporal. Embora existam algumas evidências para o controle da termogênese via receptores  $\beta_3$ -AR em seres humanos, essa questão permanece ainda não esclarecida pela falta de estudos clínicos que comprovem sua eficácia na regulação do metabolismo (MUND, FRISHMAN, 2013; HAINER, 2016).



**Figura 8. Localização anatômica dos depósitos de tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom e tecido adiposo bege em roedores e seres humanos.** a. Em roedores, o TAM da região interescapular contém adipócitos marrons. O tecido adiposo epididimal contém adipócitos brancos. Já o tecido adiposo subcutâneo inguinal (TAS-ing) contém uma população de adipócitos brancos e beges, sendo que essa proporção dependerá das condições ambientais e da dieta. b. Em seres humanos adultos, essa divisão não é bem clara, sendo que o TAS possui características de tecido adiposo branco, o TAM é composto de adipócitos brancos, marrons e beges, sendo que o TAM clássico pode ser encontrado em regiões profundas do pescoço, próximo ao tecido muscular. c. O processo de “*browning*” do tecido adiposo pode ser estimulado por agonistas dos receptores  $\beta_3$ -AR (BARTELT, HEEREN, 2014).

Estudos recentes tem mostrado que existem vias de termogênese do tecido adiposo marrom e bege independentes da ação da UCP-1 em modelos animais *knockout* para essa proteína desacopladora, e essa termogênese ocorreria pelo aumento do ciclo de cálcio por ação da proteína SERCA2ab (IKEDA et al., 2017) e ação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-21) (CHEN et al., 2017). Desse modo, o conhecimento sobre a termogênese e sua importância para o metabolismo se torna cada vez mais complexo e cada vez mais pesquisas são necessárias para a melhor compreensão desse fenômeno fisiológico.



## 2.5 Receptores $\beta_3$ -AR e relaxamento do músculo liso vascular

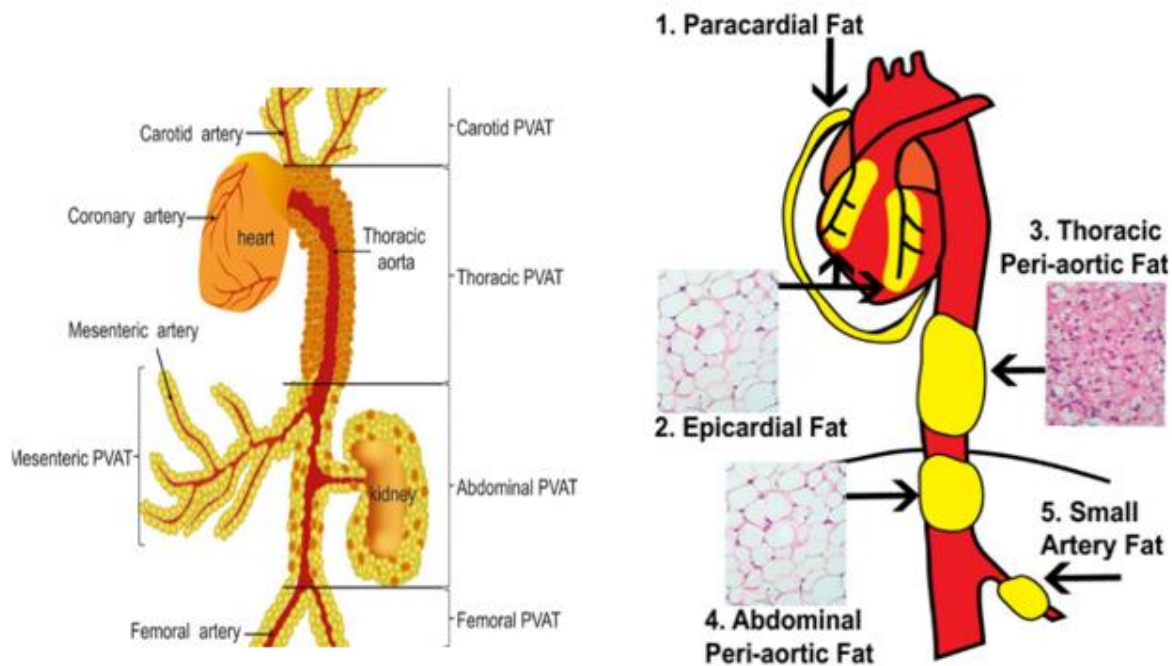
Sabe-se que o endotélio vascular participa de inúmeras funções metabólicas, e é um importante regulador do tônus vascular, a partir da produção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores (FURCHGOTT, ZAWADISKI, 1980; ZANESCO, ANTUNES, 2007; BONAVENTURA et al., 2008). O subtipo de receptores  $\beta_3$ -AR encontra-se presente no endotélio vascular. A ativação do  $\beta_3$ -AR pelas catecolaminas circulantes ou agonistas farmacológicos, leva à ativação da enzima AC, a qual hidrolisa o ATP em AMPc, (DESSY et al., 2004; ROZEC et al., 2005, 2006b). O AMPc atua ligando-se diretamente aos canais iônicos na membrana plasmática, inibindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana, reduzindo a sensibilidade do sistema contrátil ao íon, levando ao relaxamento da musculatura lisa vascular (HIMPENS et al., 1995; WERSTIUK, LEE, 2000). Além disso, os canais para  $\text{K}^+$  também participam do relaxamento vascular via AMPc (ALLEN et al., 1985). Estudos têm relacionado os canais para  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) às respostas dos agonistas de  $\beta$ -AR (MIYOSHI, NAKAIA, 1993; KRAVTSOV et al., 2004). Embora o AMPc tenha uma ação vasodilatadora a partir de sua ligação direta aos canais iônicos, o principal mecanismo de ação do AMPc é a ativação da PKA, a qual resulta na fosforilação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à produção de óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador (BOO et al., 2003; FORSTEMANN, SESSA, 2012). A PKA também é capaz de fosforilar proteínas específicas dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, resultando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em células endoteliais de aorta (HARTZELL, 1988). Em células endoteliais, agonistas de  $\beta_3$ -AR são também capazes de ativar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua liberação de estoques intracelulares, favorecendo a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina e consequente ativação da eNOS e produção do NO (TROCHU et al., 1999; TIRUPPATHI et al., 2002). Assim, a ativação da via  $\beta_3$  AR/AMPc/PKA, pode levar à vasodilatação, principalmente pela ativação da eNOS e produção de NO e pela abertura de canais iônicos. Contudo, os estudos envolvendo agonistas farmacológicos do receptor  $\beta_3$ -AR e do relaxamento dos diferentes leitos vasculares, inclusive da aorta, ainda são escassos.

## 2.6 Receptores $\beta_3$ -AR e Tecido Adiposo Perivascular

Na última década, os estudos sobre o tecido adiposo perivascular (PVAT) tem ganhado grande destaque, pois esse tecido é capaz de controlar o tônus vascular através

da produção de adipocinas e fatores anticontráteis, como a adiponectina, peróxido de hidrogênio e NO (LOHN et al., 2002; GAO et al., 2007; BROWN et al., 2014). Na presença de doenças cardiometabólicas como na obesidade e DM2, o PVAT pode apresentar um perfil pró-inflamatório, com a liberação de citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-6, além de EROs, perdendo a função anticontrátil e contribuindo para a fisiopatologia da aterosclerose e da disfunção endotelial (CHATTERJEE et al., 2009; OMAR et al., 2014).

Estudos mostram que o PVAT apresenta diferentes composições de adipócitos, dependendo do leito vascular em que se encontra ou de diferentes localizações de uma mesma artéria. No caso da aorta, o PVAT encontrado ao redor da porção abdominal é composto de TAB, enquanto que o encontrado ao redor da porção torácica apresenta características muito semelhantes ao TAM (PADILLA et al., 2013; FITZGIBBONS, CZECH, 2014) (Figura 9). Curiosamente, o estudo de Chang e colaboradores (2012) mostrou que, além de apresentar composição morfológica e proteômica muito semelhante ao TAM, o PVAT metabolicamente ativado possui função de termorregulação no leito vascular. A ativação do PVAT mediante o estímulo de exposição de camundongos ao frio por 2 meses, aumentou a biogênese mitocondrial e expressão da proteína termogênica UCP1, além de melhorar a função endotelial e reduzir a placa aterosclerótica de camundongos *knockout* para a proteína apoE e expostos à dieta hiperlipídica. Contudo, não existem estudos mostrando se outras formas de estimulação do PVAT, como a administração de agonistas  $\beta_3$ -AR, levariam a um aumento da expressão de proteínas da biogênese mitocondrial e termogênicas como a UCP1, além de seus efeitos na função endotelial e no efeito anticontrátil.



**Figura 9. Localização anatômica dos depósitos de tecido adiposo branco adiposo perivascular e histologia.** Adaptado de Brown e colaboradores (2014) e Fitzgibbons e Czech (2014).

## 2.7 Mirabegron

O Mirabegron (YM-178) é um agonista  $\beta_3$ -AR seletivo, atualmente desenvolvido por Astellas Pharma Inc. e aprovado desde 2012 pelos EUA, para tratamento de bexiga hiperativa, considerando a ação dos  $\beta_3$ -AR no relaxamento do músculo liso e importância desse subtipo de receptor no controle da função vesical (TYAGI, TYAGI, 2010). Os primeiros estudos sobre esse fármaco iniciaram-se em 2007 (TAKASU et al., 2007), sendo que a principal temática desses trabalhos se relacionava à sua eficácia no tratamento da incontinência urinária. Por outro lado, eventos adversos têm sido descritos e os mais importantes são taquicardia e aumento da pressão arterial. Foram encontrados somente dois trabalhos que avaliaram o efeito do Mira sobre o peso corporal de roedores. Yuno e colaboradores (2014) não observaram modificações no peso corporal de ratos após administração de Mira em uma concentração de 10, 30 e 100 mg/kg. Calmasini e colaboradores (2017) observaram redução do peso corporal de camundongos após administração de Mira por 2 semanas em uma concentração de 10 mg/kg. Assim, ainda pouco se sabe sobre os

efeitos desse composto na composição corporal e os possíveis efeitos cardiometabólicos.

Após a administração oral do fármaco, o Mira é absorvido atingindo o pico de concentração plasmática ( $C_{max}$ ) entre 3 e 4 horas. A  $C_{max}$  e exposição médias aumentam proporcionalmente mais do que a dose ao longo do intervalo de doses. As concentrações no estado estacionário (concentração que uma droga atinge no organismo quando o fármaco é administrado repetidamente, em doses separadas, por um tempo correspondente à sua meia vida) são atingidas ao fim de 7 dias com uma dose diária de Mira. Após administração diária, a exposição plasmática do Mira no estado estacionário é aproximadamente o dobro da verificada com uma dose única, o que se deve a um aumento da biodisponibilidade absoluta com o aumento da dose (TAKUSAGAWA et al., 2012; ELTINK et al., 2012). Nos estudos de fase III, o Mira foi administrado com ou sem alimentos e demonstrou eficácia e segurança em ambos os casos. Assim, o Mira pode ser tomado com ou sem alimentos, na dose recomendada. O Mira é extensamente distribuído no organismo e liga-se às proteínas plasmáticas (aproximadamente 71%), apresentando uma afinidade moderada para a albumina e alfa 1-glicoproteína ácida e distribui-se nos eritrócitos. Foram identificados dois metabólitos principais no plasma humano; ambos glucurónidos e inativos farmacologicamente (IITSUKA et al., 2015).

A eliminação renal do Mira é feita principalmente por secreção tubular ativa, acompanhada de filtração glomerular. A excreção urinária do Mira é dependente da dose e varia desde aproximadamente 6% após uma dose diária de 25 mg até 12,2% após uma dose diária de 100 mg.

Sabe-se que num documento da Astella Pharma Austrália, o mirabegron aumentou a lipólise em ratos, aumentou a termogênese em camundongos diabéticos obesos e melhorou a glicemia em ratos Zucker. Nesse documento, é relatado que esses efeitos não foram observados em cães, macacos e seres humanos. No entanto, esses estudos não estão acessíveis e nem foram publicados (Department of Health Therapeutic Goods Administration: Australian public assessment report for mirabegron, 2014)

### 3. JUSTIFICATIVA

O tecido adiposo branco (TAB), além de ser um importante estoque energético, possui importante função endócrina, produzindo adipocinas que regulam o metabolismo energético, o processo inflamatório, a saciedade e a sensibilidade à insulina (BALISTRERI et al., 2010). O processo inflamatório e o desequilíbrio entre a produção de adipocinas pelo TAB é um dos fatores-chaves para o desenvolvimento das comorbidades relacionadas à obesidade, como a resistência à insulina e a inflamação crônica de baixo grau. Além disso, estudos mostram que na obesidade há alterações na função do PVAT, onde este pode apresentar disfunção anticontrátil com excesso de liberação de fatores pró-inflamatórios por esse tecido (GIL-ORTEGA et al., 2010; FERNÁNDEZ-AFONSO et al., 2013; VAN DE VOORDE et al., 2014). Acredita-se que com a progressão da obesidade, tanto o PVAT quanto o TAM passam por um processo denominado “whitening” de seus adipócitos, onde os adipócitos marrons vão se tornando bege, resultando em perda de sua função termogênica e de regulação do metabolismo energético (BARTELT, HEEREN, 2014).

Nas duas últimas décadas, alguns estudos demonstraram um efeito significativo de agonistas dos  $\beta_3$ -AR, como o BRL-37344, CL 316,243, e CGP-12177A no aumento da lipólise em roedores e seres humanos (BARBE et al., 1996; LI et al., 1997; DE SOUZA, BURKEY, 2001; BRANDT et al., 2006; SAWA, HARADA, 2006). Em seres humanos, a expressão dos  $\beta_3$ -AR no TAB subcutâneo é menor que a de  $\beta_1$ -AR e  $\beta_2$ -AR (TAVERNIER, 1996), fazendo com que por muitos anos o interesse em estudar os efeitos de agonistas  $\beta_3$ -AR na lipólise e obesidade fosse desencorajado (DESSY, BALLIGAND, 2010). Contudo, a expansão de estudos envolvendo outros depósitos de tecido adiposo, como o visceral, marrom e bege e suas respectivas influências na fisiopatologia da obesidade, fazem com que as pesquisas envolvendo a ação dos  $\beta_3$ -AR no metabolismo do tecido adiposo sejam retomadas.

Considerando que o Mirabegron é um fármaco com ação seletiva sobre os  $\beta_3$ -AR e tem mostrado eficácia no relaxamento do músculo liso da bexiga, investigar os seus efeitos sobre o metabolismo e possível controle do peso corporal em TAB pode abrir novas perspectivas para o estudo da obesidade e do controle do peso corporal em indivíduos obesos. Além disso, nosso estudo procurou avaliar a influência desse tratamento na expressão da proteína termogênica UCP1 no TAM, tecido adiposo bege e no PVAT de aorta.

Embora os primeiros estudos envolvendo o uso do agonista dos  $\beta_3$ -AR CL 316,243 na termogênese do TAM de roedores tenham ocorrido em meados da década de 1990 (HIMMS-HAGEN et al., 1994), estudos dos últimos 2 anos têm emergido mostrando resultados promissores sobre o uso desse tipo de agonista na pesquisa relacionada ao metabolismo dos tecidos adiposo branco, marrom e bege de roedores obesos (POHER et al., 2015; WARNER et al., 2016; KIM et al., 2016; LEE et al., 2017). Nosso grupo de estudos verificou melhora na função da bexiga e redução do peso corporal em camundongos obesos tratados com Mira por 2 semanas (CALMASINI et al., 2017) e foram encontrados apenas mais dois estudos do grupo de pesquisa do Joslim Diabetes Center de Harvard (EUA); onde utilizaram Mira em camundongos (ROBERTS-TOLER et al., 2015) e humanos (CYPESS et al., 2015), ambos de forma aguda, verificando seus efeitos no metabolismo do TAM e na captação de glicose. Entretanto, no estudo agudo em humanos foram encontrados efeitos colaterais como taquicardia e aumento da pressão arterial.

Indivíduos obesos possuem menor capacidade de realizar exercícios físicos (ZANESCO, PUGA, 2013) e as razões envolvem menor capacidade de produção de ATP pelas mitocôndrias (DI MEO et al., 2017) e menor consumo de oxigênio (TOLEDO, GOODPASTER, 2013). Contudo, não há nenhum estudo envolvendo a utilização do Mira e a avaliação da tolerância ao esforço. Desse modo, consideramos que uma pesquisa que envolve o uso crônico do Mira em camundongos obesos em parâmetros cardiometabólicos e reatividade vascular seja importante para uma melhor compreensão de possíveis alvos terapêuticos para a obesidade.

#### 4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do tratamento por duas semanas com o agonista seletivo  $\beta_3$  adrenérgico, Mirabegron, em camundongos obesos, nos seguintes parâmetros:

1. Histologia e expressão proteica de UCP1 e TNF- $\alpha$  nos tecidos adiposos branco, marrom, bege e no PVAT de aorta;
2. Responsividade vascular de aorta de camundongos obesos na presença e ausência de PVAT;
3. Pressão arterial, frequência cardíaca e tolerância ao esforço;
4. Biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo energético;

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados camundongos controle (C57BL/6Junib) com 4 semanas de idade, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), os quais ficaram alojados em gaiolas forradas com maravalha, com 4 animais por caixa, em local com temperatura ambiente controlada entre 22 a 24°C e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Posteriormente, os animais foram divididos em grupos: controle, onde os animais receberam ração padrão (Radiated Nuvilab-CR1<sup>®</sup>, sendo a composição calórica de 65% de carboidratos; 22% proteínas e 10% de lipídios) e grupo obeso, onde foi induzida a obesidade através da substituição da ração padrão por dieta hiperlipídica purificada, rica em banha, fonte de gordura saturada (Pragsoluções, SP-Brasil, sendo a composição calórica de 27% de carboidratos, 16% de proteínas e 53% de lipídios,) durante 12 semanas (TSUKUMO et al., 2007; LEIRIA et al., 2012; WHITE, et al., 2013). Os animais de ambos os grupos receberam água *ad libidum*.

Após a décima semana de indução da obesidade, os grupos controle e obeso foram divididos em subgrupos:

1. Grupo controle tratado com veículo (CTR)
2. Grupo controle tratado com Mirabegron (CTR+MIRA)
3. Grupo obeso tratado com veículo (OB)
4. Grupo obeso tratado com Mirabegron (OB+MIRA)

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA – UNESP), protocolo nº 0135 de 18 de março de 2015 (vide anexo 1).

### 5.2 Tratamento com Mirabegron (Mira)

Após 10 semanas de dieta para indução de obesidade, foi iniciado o tratamento com Mirabegron (Astellas Pharma Europe Ltd., Chertsey, UK), em uma dose diária de 10mg/kg, diluída em 100µL de veículo (solução de 20% de Cremophor<sup>®</sup> RH40 [Sigma-Aldrich] – surfactante -, 10% de Transcutol<sup>®</sup> [Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA] em solução aquosa - co-surfactante – e 70% de água deionizada: 1:2:7, v/v/v %)



o qual foi administrado por entubação orogástrica, utilizando-se seringas de 1ml e agulhas de gavagem, para os grupos CTR+MIRA e OB+MIRA. Foi também administrada uma dose diária de 100µL de veículo, para os grupos CTR e OB. A administração de Mira ou veículo ocorreu durante 2 semanas.

### **5.3 Peso corporal, consumo alimentar e gordura epididimal**

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram mensurados no início do protocolo experimental e semanalmente até o final do estudo. Para avaliar os efeitos do Mira na ingestão calórica, durante as duas semanas de tratamento foi calculada a ingestão calórica considerando o conteúdo de macronutrientes e seu respectivo teor calórico (1g de carboidratos equivale a 4 kcal, 1g de lipídios equivale a 9 kcal e 1g de proteínas equivale a 4 kcal) e a média de ração ingerida por caixa, obtendo-se o valor estimado total de ração ingerida por animal (MANN, TRUSWELL, 2009).

Os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine® Cristália, Itapira –SP) para obtenção de amostras de sangue e logo em seguida foram sacrificados por deslocamento cervical, seguindo as normas de proteção de animais experimentais. A gordura epididimal foi isolada, pesada e congelada a -80°C para análises posteriores. Foram congelados também fragmentos de tecido adiposo marrom interescapular, tecido adiposo subcutâneo inguinal e tecido adiposo perivascular.

### **5.4 Pressão arterial indireta**

A pressão arterial caudal e a frequência cardíaca dos animais foram medidas na décima semana de indução da obesidade e ao final da primeira e segunda semanas de tratamento (semanas 11 e 12) com Mira, utilizando o método indireto de tail-cuff modificado (AD Instruments São Paulo-SP, Brasil) nos animais conscientes (ZATZ, 1990). As medidas foram realizadas em 3 dias de cada semana, no mesmo horário e pelo mesmo avaliador. Antes do início das medidas todos os animais passaram por 3 dias consecutivos de adaptação e então a pressão arterial caudal basal e a frequência cardíaca das semanas 11 e 12 foram determinadas utilizando-se a média das três medidas consecutivas de cada semana.

### **5.5 Calorimetria indireta**

A calorimetria indireta foi feita em equipamento Oxylet System (PamLab e Harvard Apparatus, Corneliã, Spain). Os camundongos foram adaptados e aclimatados à câmara por 24 horas antes de as medidas serem tomadas. Foram feitas medidas consecutivas de 5 minutos por 24 horas em animais alimentados. O software metabolism v2.2.01 forneceu os valores de consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), dióxido de carbono produzido ( $VCO_2$ ), quociente respiratório (*Respiratory Exchange Ratio* RER) e gasto energético total (EE). Os resultados foram normalizados pela massa corporal dos animais.

### **5.6 Medida da temperatura retal e detecção de temperatura por câmara de imagem termal**

A medida da temperatura retal foi realizada nos animais conscientes após 3 dias consecutivos de adaptação, utilizando-se termômetro específico para camundongos (Physitemp instruments inc, Clifton, EUA).

Imagens termais da região interescapular e da base da cauda de camundongos foram obtidas utilizando câmara termal FLIR B425 (FLIR Systems, Hong Kong, China) (SYMONDS et al., 2012).

Ambas as técnicas ocorreram à temperatura ambiente (25°C) e após os camundongos permanecerem 4 horas na temperatura de 4°C.

### **5.7 Teste de tolerância ao esforço**

O teste de esforço consistiu em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 minutos, até que foi atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o camundongo não foi mais capaz de correr mediante o incremento de velocidade da esteira (BROOKS, WHITE, 1978). Previamente ao teste todos os camundongos foram submetidos a 3 dias consecutivos de adaptação à esteira.

### **5.8 Obtenção dos valores de glicemia de jejum**

Ao final do tratamento com Mira, a glicemia de jejum noturno de 12 horas foi mensurada utilizando-se uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por

fitas reativas de teste (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

## **5.9 Teste de sensibilidade à insulina**

A sensibilidade à insulina foi verificada após as 2 semanas de tratamento com Mira. Foi administrada a concentração de 1,0 U/kg de insulina intraperitoneal (Humulin R-Insulin; Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) após 2 horas de jejum e amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal), 10, 20 e 30 minutos. Os valores de glicose foram constatados por fitas reativas de teste e monitor digital.

## **5.10 Obtenção das amostras de soro**

Após jejum noturno de 12h, os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal foi feita no abdômen do animal para coleta de amostras de sangue venoso (1mL), obtidas da veia cava. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rotações/minuto para obtenção do soro, as alíquotas foram congeladas em freezer a -80°C para análises posteriores.

## **5.11 Determinação dos parâmetros bioquímicos**

### **5.11.1 Insulina**

A insulina sérica foi medida utilizando-se um kit comercial de ELISA para camundongos (Millipore, São Paulo-SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A resistência à insulina foi estimada pelo cálculo do índice HOMA (*homeostasis model assessment method*), utilizando-se a glicose de jejum e os níveis séricos de insulina seguindo a fórmula:

$$\text{Insulina} \times (\text{glicemia} \times 0,055) / 22,5 \text{ (MATTHEWS et al., 1985).}$$

### **5.11.2 Perfil Lipídico e índice aterogênico**

Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (KATAL, MG, Brasil). O HDL-colesterol (HDL) foi determinado pelo método da precipitação utilizando também kit

específico (KATAL). O LDL colesterol foi determinado a partir da equação de Friedwald (SPIGHI, et al., 2013), onde:

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterol total} - \text{HDL colesterol} - (\text{Triglicérides}/5)$$

O índice aterogênico (IA) foi calculado a partir da fórmula (YOKOZAWA et al., 2002):

$$\text{IA} = (\text{CT} - \text{HDL}) / \text{HDL}$$

### **5.11.3 Ácidos graxos livres e glicerol**

Foram utilizados kits colorimétricos comerciais para análise dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lipólise: ácidos graxos livres (Cell Biolabs, San Diego CA, USA) e glicerol (Bioclin, Belo Horizonte MG, Brasil), seguindo instruções do fabricante.

### **5.11.4 Níveis de leptina, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e TNF- $\alpha$**

Foram utilizadas amostras séricas para a determinação da leptina (Enzo Life Sciences, New York, EUA), do MDA pelo método colorimétrico para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS ( $\mu\text{M}$ ) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) e amostras séricas e de homogenato de gordura epididimal para determinação do TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A concentração de TNF- $\alpha$  da gordura epididimal foi normalizada pela concentração de proteínas (medidas pelo método de BCA-Pierce) de cada amostra.

## **5.12 Avaliação morfológica**

Amostras de gordura epididimal, tecido adiposo marrom interescapular, tecido adiposo subcutâneo inguinal, PVAT e tecido hepático foram isoladas, e então colocadas em solução de formol 10% tamponado. Após um mínimo de 24h após fixação em formol 10%, as amostras foram retiradas e submetidas à desidratação com concentrações crescentes de etanol (70% - 100%) e de xilol e então embebidas em parafina. Cortes de 5 $\mu\text{m}$  foram obtidos em micrótomo, e então colocados em lâminas

de vidro e deixados por 24h em estufa a 37°C para fixação dos cortes nas lâminas. Em seguida, os cortes foram submetidos à desparafinização com xilol em 3 lavagens de 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos a uma sequência de banhos de etanol em concentrações decrescentes (100 – 70%) para então serem submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (H.E.). Após coloração, iniciou-se a análise do material em microscópio óptico Leica (DFC300FX) no aumento de 20x. Este aumento permite a análise da gotícula lipídica dos diferentes tecidos analisados. Fotos foram tiradas com a câmera acoplada ao microscópio.

### **5.13 Avaliação das proteínas de interesse por Western Blott**

Amostras de homogenato de TAM, tecido adiposo subcutâneo inguinal (TAS-ing) e PVAT foram utilizadas para a determinação da concentração de proteínas pelo método de BCA (Pierce), e então a quantidade necessária para aplicar 75µg de proteína em géis de acrilamida de 15% foi calculada para cada amostra. Em seguida foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean (BioRad) para detecção das expressões proteicas de UCP e TNF- $\alpha$ .

### **Eletroforese e transferência das amostras**

As alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia- 0,5 mM; SDS- 0,17 mM; DTT- 39 µM; Tris- HCL pH=8 - 0,01 M e Azul de bromofenol- 0,5%) e mantidas a 99°C durante 5 minutos e, em seguida, estas amostras foram aplicadas no gel com SDS a 3% (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel com 15% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema Mini-Protean II (Electrophoresis Cell, BioRad) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 100 Volts (Power Pac 200, BioRad). Junto com as amostras foi aplicado no gel um padrão de proteínas “marcador de peso molecular” (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada, durante 20 segundos, com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e o papel Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Modulo de Transferência, BioRad) contendo a solução de transferência (Tris- 25 mM; Glicina- 190 mM; SDS-0,05 % e Metanol- 20%). O sistema foi submetido a uma corrente de 100V durante 1 hora. A transferência foi confirmada

através da coloração do gel com Ponceau (ROMERO-CALVO et al., 2010). As proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1%, por 5 minutos, e coradas com Ponceau- 1%; ácido acético-1% durante 5 minutos. A descoloração das membranas foi feita com uma sequência de lavagens iniciada com água destilada seguida por finalização com o TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %). As membranas foram então incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com uma solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %).

### **Incubação com anticorpos e detecção das proteínas de interesse**

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo primário contra as isoformas da UCP1 (1:500 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz-CA) e TNF- $\alpha$  (1:500 Novus Biologicals, Cambridge-UK), em solução bloqueante à temperatura de 4°C e sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos com TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %), sob agitação. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos secundários, anti-mouse para UCP1 (1:5000, Abcam, Cambridge-MA) e anti-hamister para TNF- $\alpha$  (1:4000, Abcam, Cambridge-MA), diluídos em solução bloqueante e incubados por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foi lavado com solução de TBS-T em 4 lavagens sucessivas de 10 minutos cada. As proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science). A razão da coloração de Ponceau foi realizada para normalização da expressão das proteínas de interesse (ROMERO-CALVO et al., 2010). Para análise e quantificação das bandas foi utilizado o programa de análise de imagens ImageJ.

### **5.14 Reatividade Vascular**

Após a eutanásia, os segmentos de aorta torácica na presença (PVAT+) e ausência (PVAT-) de PVAT, foram removidos cuidadosamente e colocados em cubas de tecido isolado com solução de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO<sub>3</sub>- 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O- 1,17 e CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O- 2,5 para a obtenção de curvas concentração-resposta a agentes vasodilatadores e vasoconstritores.

Cada anel com cerca de 3mm foi montado no sistema de miógrafo para vasos de grande calibre para medida de tensão isométrica (Modelo 610M, DMT A/S, Aarhus NA-Dinamarca), mantidos em 5 ml da solução de Krebs aquecida a 37°C, pH 7,4 e aerada com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>. Os anéis de aorta foram submetidos a uma tensão basal de 5mN durante 45 minutos de estabilização. Após a estabilização, todos os anéis foram expostos à contração induzida por cloreto de potássio (KCl: 80mM) e após a contração máxima foram lavados com solução de Krebs.

**Curvas concentração-resposta à acetilcolina:** Após a curva de pré-contração ao análogo do tromboxana A<sub>2</sub>, U46619 (em uma concentração necessária para produzir 50-80% da contração máxima ao KCL), foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh; 100pM - 30 μM). O relaxamento foi plotado como porcentagem da pré-contração induzida pelo U46619.

**Curvas concentração-resposta à serotonina:** Curvas concentração-resposta à serotonina, 5HT (1nM a 30uM) foram obtidas. Os valores de contração foram plotados em miliNewtons (mN) e normalizados pelo delta de contração ao KCl.

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963).

Os dados obtidos foram avaliados através da equação descrita:

$$E = E_{MAX} / \{ [1 + (10^c/10^x)^n] + \Phi \}$$

Onde E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E<sub>MAX</sub> representa a resposta máxima que o agonista produziu; c representa o logarítimo da EC<sub>50</sub>, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logarítimo das concentrações do agonista, o termo exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, parâmetro que define o tipo de curva concentração-resposta obtida; por fim o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista. A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: E<sub>MAX</sub>, log EC<sub>50</sub> (pEC<sub>50</sub>) e n foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA-EUA) com o valor basal Φ = zero.

### 5.15 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (*standard error of the mean* – S.E.M) para  $n$  experimentos (n=3 a n=25 camundongos/grupo). Foi realizada análise de variância (ANOVA Two-way) para determinação das diferenças entre os grupos e pós-teste de Bonferroni. Para as diferenças entre anéis PVAT e PVAT- de um mesmo grupo foi utilizado teste t de student. O programa utilizado foi o Graph Pad Prism 5.0 e foi adotado um nível de significância de  $P < 0,05$ .



## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 PARTE 1: METABOLISMO ENERGÉTICO E PERFIL LIPÍDICO**

#### **6.1.1 Peso corporal, perfil lipídico e índice aterogênico**

A tabela 1 apresenta os valores de peso corporal no início da dieta (semana 0), 10<sup>a</sup> (semana anterior ao início do tratamento com Mira), 11<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas (final do tratamento com Mira), perfil lipídico e índice aterogênico. No início do estudo não observamos diferenças na média de peso corporal entre os grupos. Como esperado, os camundongos pertencentes aos grupos obesos apresentaram valores aumentados de peso corporal na 10<sup>a</sup> semana (aproximadamente 33%), quando comparado aos grupos controles. Logo no final da primeira semana de tratamento com Mira, a média de peso corporal do grupo OB+MIRA apresentou redução de peso corporal (8%) quando comparado ao grupo OB, e essa diferença foi potencializada ao final da 12<sup>a</sup> semana (10%). A evolução do peso corporal é apresentada na Figura 10.

A dieta hiperlipídica promoveu aumento nos valores de colesterol total no grupo OB quando comparado ao grupo controle, aproximadamente 65%. De maneira similar, os níveis de LDL-C foram aumentados apenas no grupo OB (170%) quando comparado a CTR. O tratamento com Mira reduziu parcialmente os níveis de colesterol total e LDL colesterol. O índice aterogênico foi aumentado apenas no grupo OB (142% comparado a CTR) e o Mira reduziu esse índice em 122% no grupo OB+MIRA quando comparado ao OB (Tabela 1).

#### **6.1.2 Gordura epididimal e ingestão calórica**

A massa da gordura epididimal aumentou em ambos os grupos obesos quando comparado aos respectivos grupos controles (800% para OB e 1200% para OB+MIRA). O tratamento com Mira reduziu a quantidade de gordura epididimal tanto em CTR+MIRA (50%) quanto em OB+MIRA (25%) quando comparados aos respectivos grupos tratados apenas com veículo (Figura 10A).

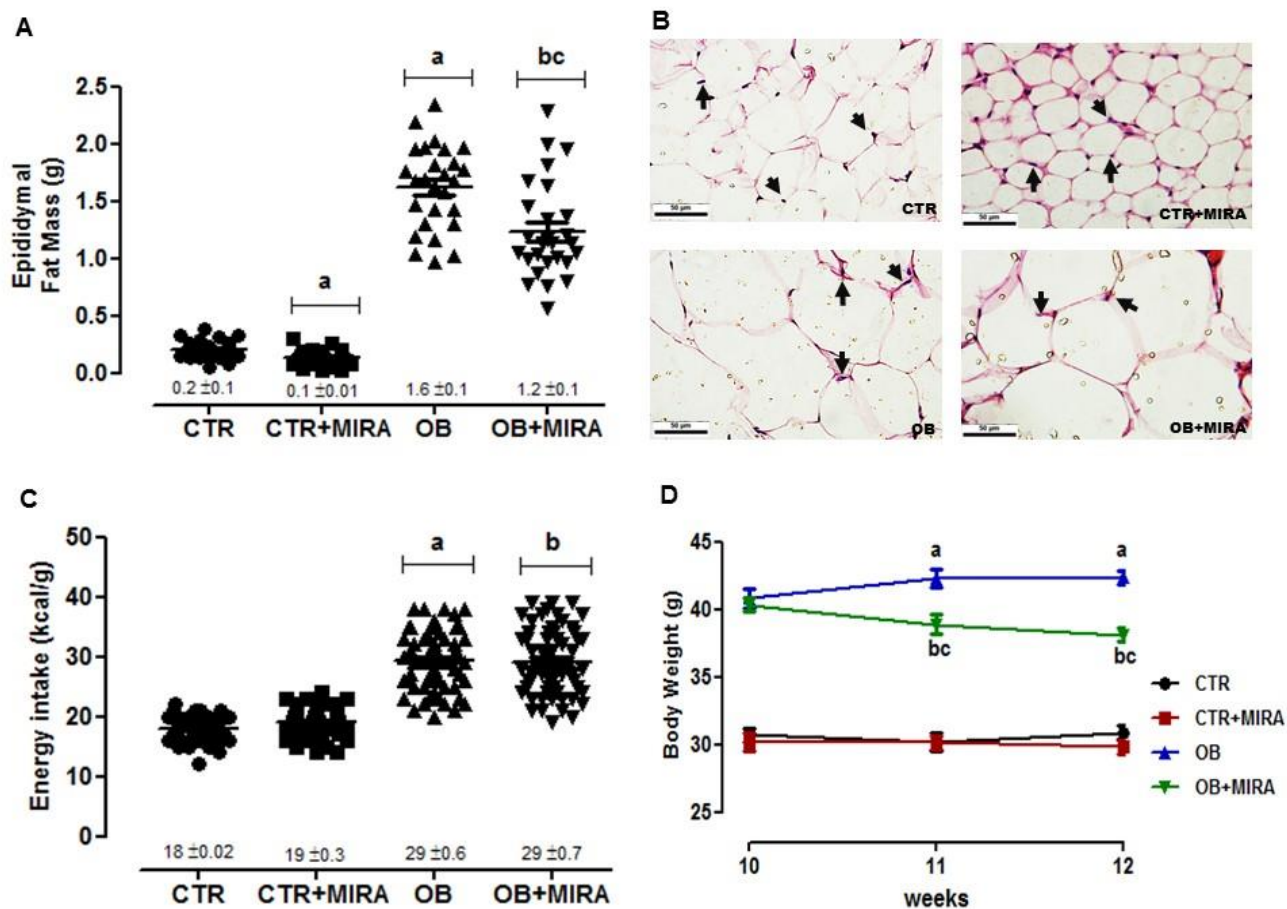
A ingestão calórica média durante a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas foi aumentada nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (aproximadamente 57%) e o tratamento com MIRA não resultou em nenhum efeito sobre esse comportamento (Figura 10C). A figura 10 também apresenta a representação histológica do tecido

adiposo epididimal (painel B) e evolução do peso corporal na 10<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas (painel D).

**Tabela 1. Peso corporal, perfil lipídico e índice aterogênico de camundongos obesos tratados com Mirabegron por 2 semanas.**

	CTR	CTR+MIRA	OB	OB+MIRA
<b>Peso semana 0</b>	18,1 ± 0,4	17,9 ± 0,4	17,8 ± 0,4	18,3 ± 0,5
<b>Peso semana 10</b>	30,7 ± 0,6	30,3 ± 0,4	40,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	40,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>Peso semana 11</b>	30,2 ± 0,7	30,1 ± 0,5	42,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	38,9 ± 0,7 <sup>bc</sup>
<b>Peso semana 12</b>	30,9 ± 0,5	29,8 ± 0,5	42,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	38,1 ± 0,5 <sup>bc</sup>
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	106,5 ± 6	112,7 ± 6	182,2 ± 11 <sup>a</sup>	151,1 ± 10 <sup>b</sup>
<b>HDL-C (mg/dl)</b>	81,6 ± 5	85,3 ± 7	104,4 ± 5	109,3 ± 4
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	17,3 ± 2	18,9 ± 3	46,8 ± 9 <sup>a</sup>	21,4 ± 5 <sup>c</sup>
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	65 ± 6	63 ± 7	98 ± 8 <sup>a</sup>	81 ± 16
<b>Índice aterogênico</b>	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,08 <sup>c</sup>

Os dados representam a média ± SEM de  $n=10-35$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p<0.05$  comparado a OB.

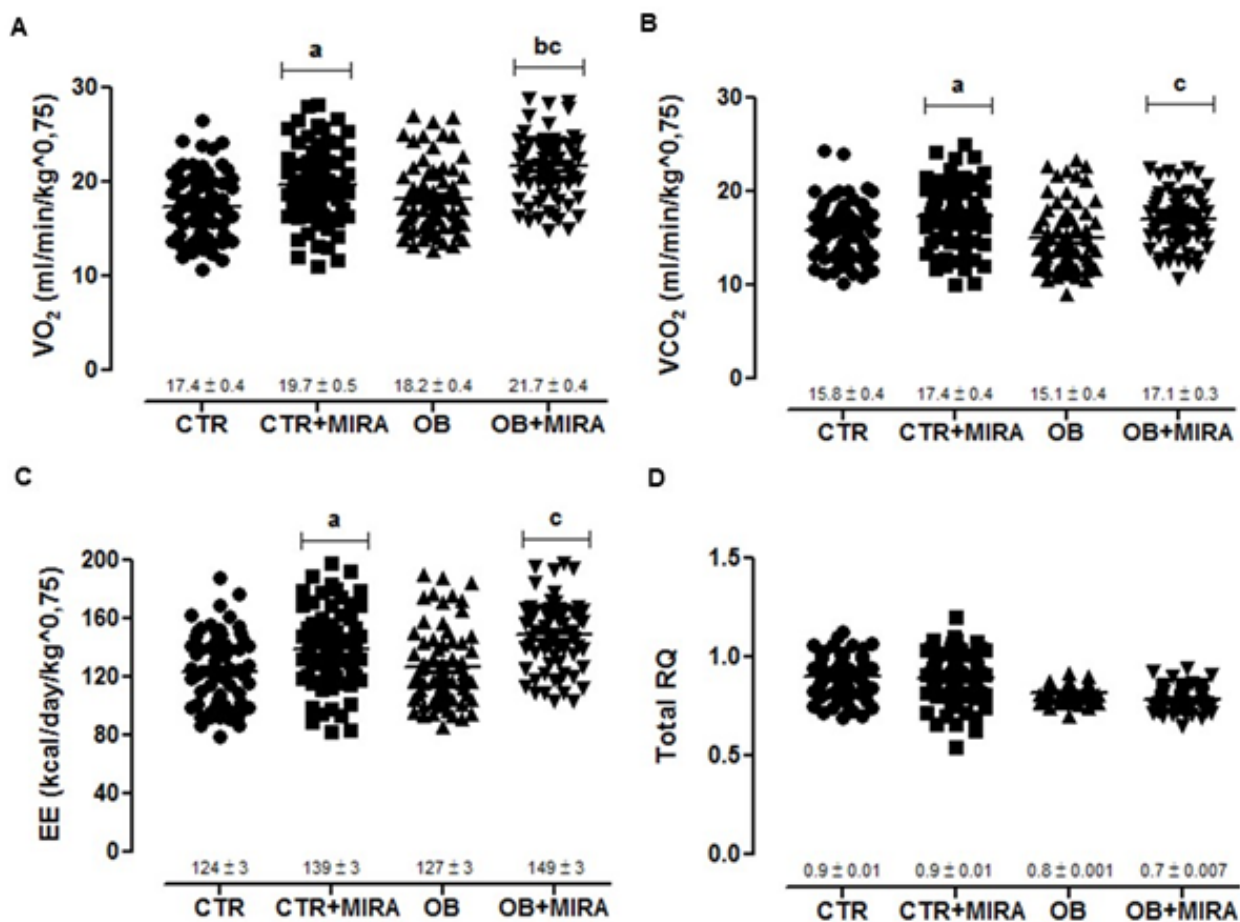


**Figura 10. Efeitos do tratamento com Mirabegron sobre a composição corporal e consumo calórico:** massa da gordura epididimal (A), histologia representativa de tecido adiposo epididimal (B) ingestão calórica média (C), evolução do peso corporal (D), de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n$ =aprox. 25 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p$ <0.05, comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p$ <0.05 comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p$ <0.05 comparado a OB. Setas pretas representam núcleos dos adipócitos. Imagem representativa histológica:  $n$ =3 camundongos/grupo.

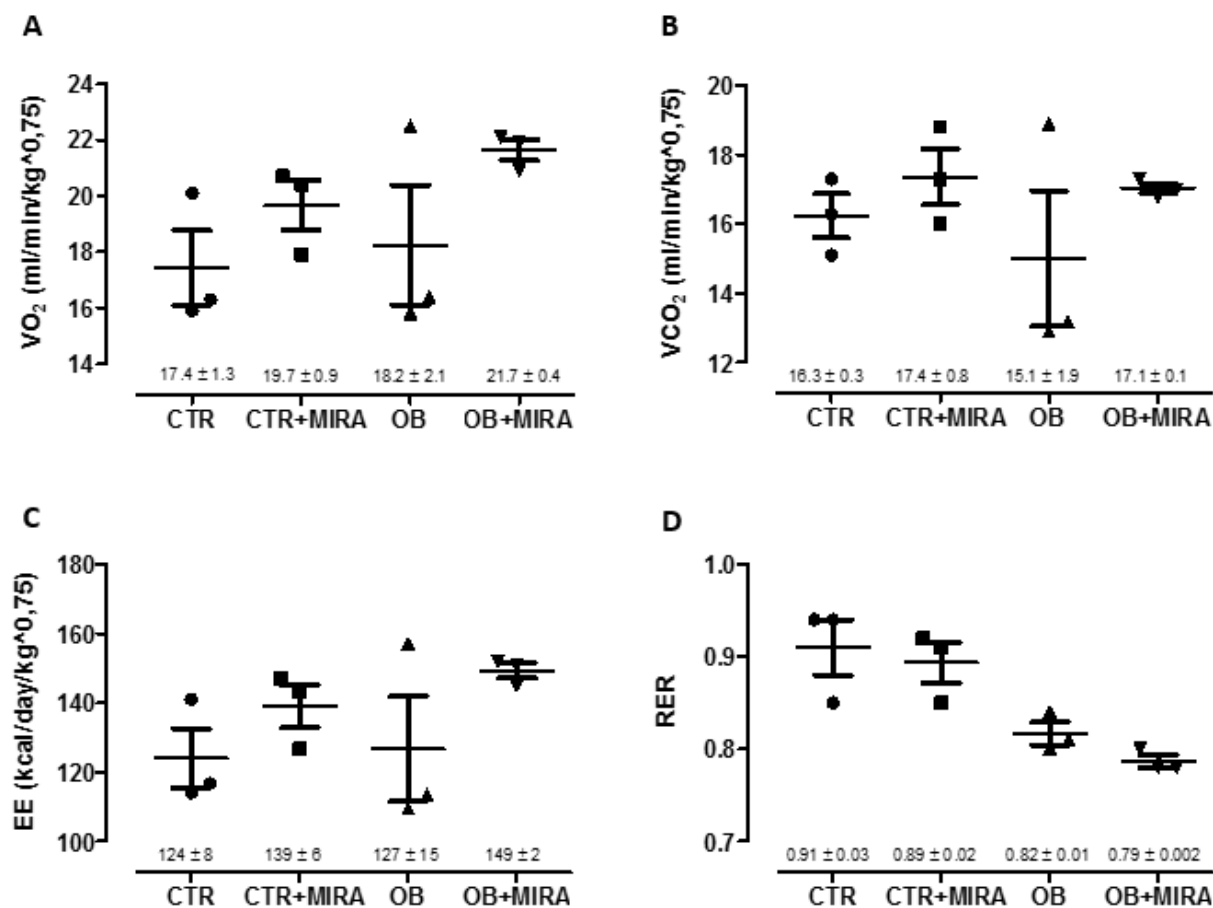
### 6.1.3 Calorimetria

A figura 11 apresenta a análise calorimétrica de 24 horas de todos os grupos. O tratamento com Mira resultou em aumento do  $VO_2$  (13% e 19%),  $VCO_2$  (10% e 13%) e do gasto energético (EE: 12% e 17%), respectivamente para os grupos CTR+MIRA e OB+MIRA (Figura 11, painéis A, B e C) quando comparados aos respectivos controles tratados com veículo. A figura 11 também apresenta as diferenças entre o quociente respiratório entre os grupos, onde os grupos obesos apresentam valores mais próximos a 0,7, e os grupos controles valores mais próximos a 1 (Figura 11D). O número total de animais em cada grupo foi três, e cada ponto reflete a medida feita a cada 5 minutos.

A figura 12 mostra a média das medidas de calorimetria de 24 horas para um total de 3 animais por grupo.



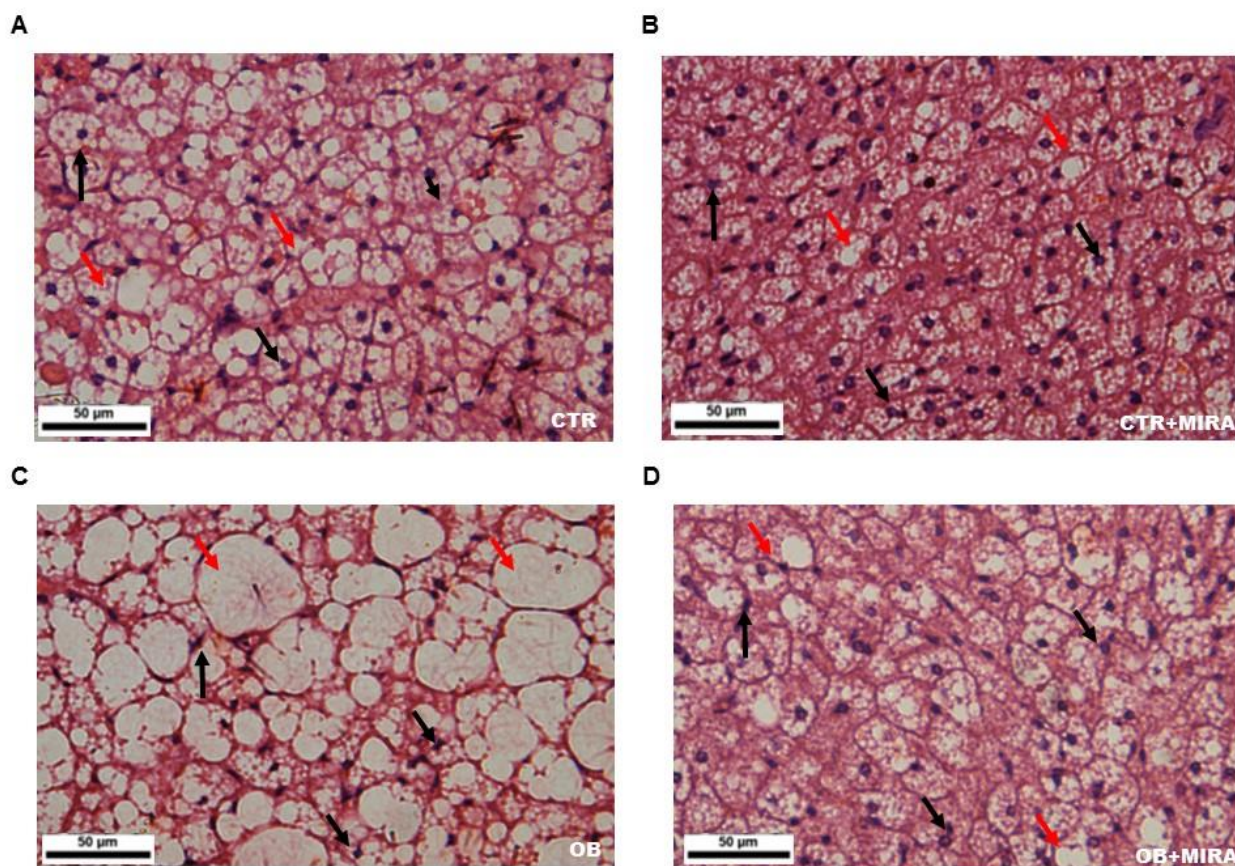
**Figura 11. Efeitos do tratamento com Mirabegron no gasto energético:** medidas de 24h a cada 5 minutos do consumo de oxigênio (A), liberação de CO<sub>2</sub>, gasto energético (C) e quociente respiratório (D) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) mantidos em gaiola de análise respirométrica por 48 horas. Os dados representam a média ± SEM de  $n=3$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p<0.05$  comparado a OB.



**Figura 12. Efeitos do tratamento com Mirabegron no gasto energético:** média das medidas de 24h do consumo de oxigênio (A), liberação de CO<sub>2</sub>, gasto energético (C) e quociente respiratório (D) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) mantidos em gaiola de análise respirométrica por 48 horas. Os dados representam a média ± SEM de  $n=3$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p<0.05$  comparado a OB.

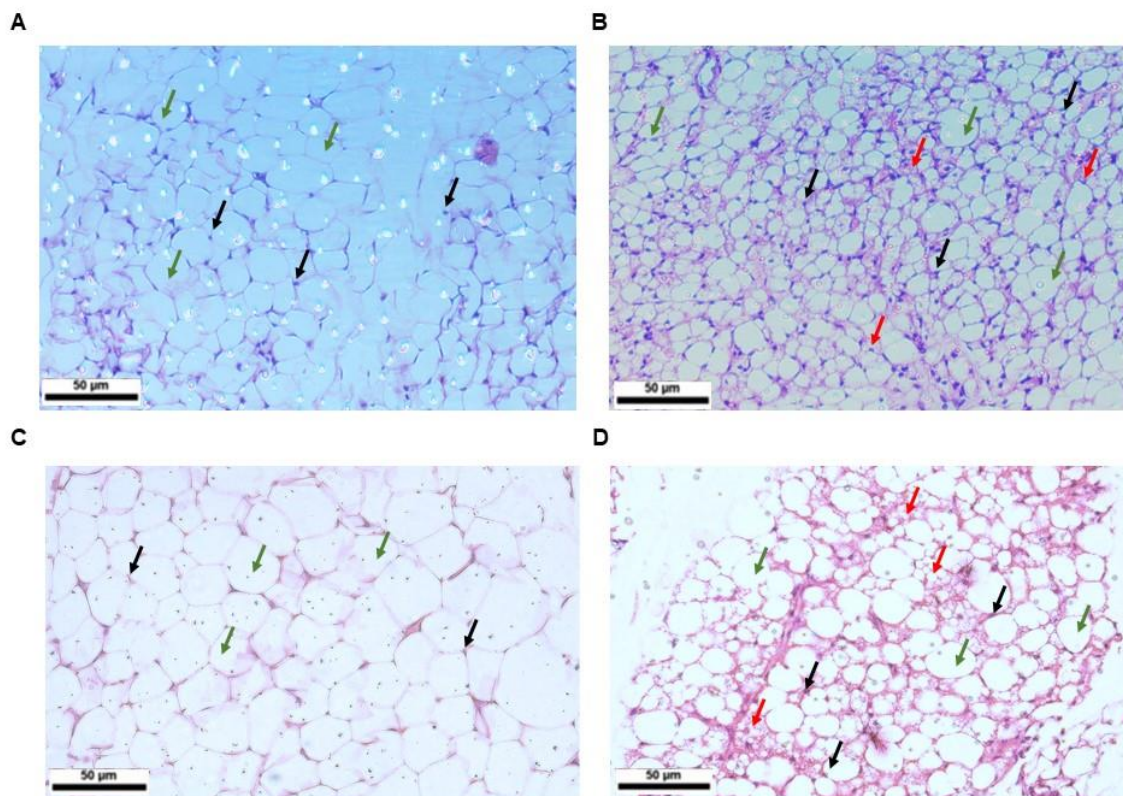
#### 6.1.4 Morfologia do tecido adiposo marrom e inguinal, expressão proteica, temperatura retal, interescapular e caudal

A figura 13 apresenta a histologia do tecido adiposo marrom interescapular, onde é possível identificar a característica típica multilocular das gotículas lipídicas no grupo CTR (painel A), a qual é modificada nitidamente devido à dieta hiperlipídica no grupo OB, com aumento das gotículas lipídicas, assemelhando-se às do tecido adiposo branco (Figura 13C). De maneira interessante, o tratamento com Mira resultou em uma redução no tamanho e na coalescência das gotículas lipídicas em ambos os grupos, CTR+MIRA e OB+MIRA (Figura 13, painéis B e D) quando comparado aos respectivos grupos controles tratados com veículo (CTR e OB).



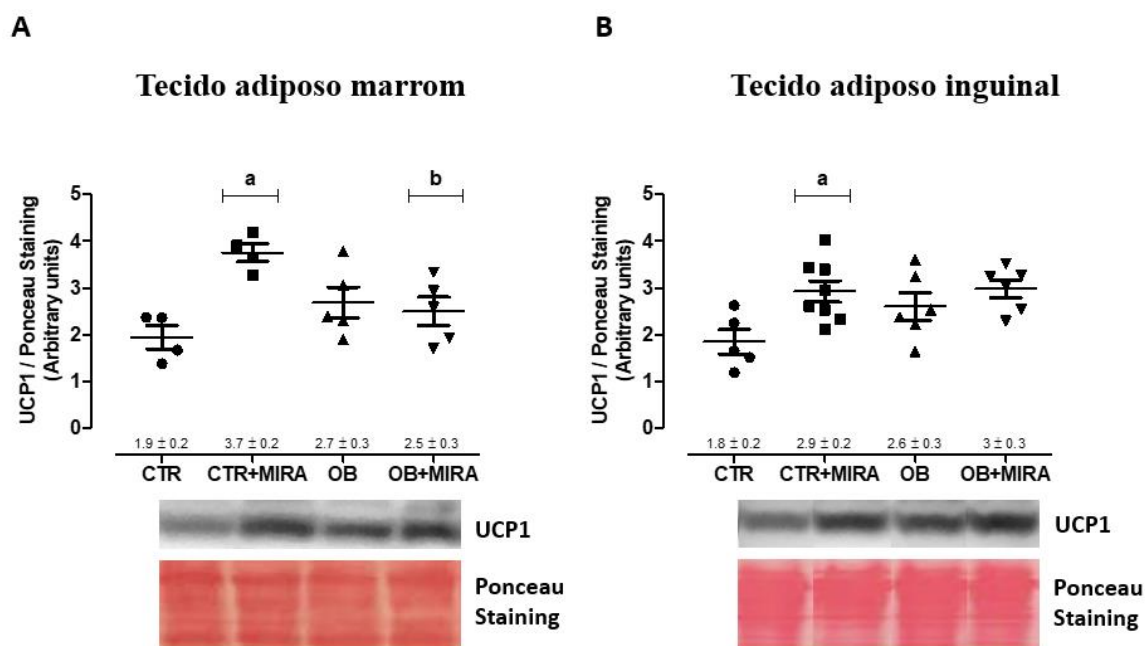
**Figura 13. Efeitos do tratamento com Mirabegron na disposição das gotículas lipídica do tecido adiposo marrom:** Histologia representativa do tecido adiposo marrom da região interescapular de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Setas pretas representam núcleos dos adipócitos, setas vermelhas representam gotículas de triglicérides. n=3 camundongos/grupo.

A figura 14 apresenta a histologia do tecido adiposo inguinal, onde é possível observar a presença de gotículas lipídicas multiloculares características de tecido adiposo marrom nos grupos tratados com Mira (Figura 14, painéis B e D) quando comparado aos respectivos grupos controles.



**Figura 14. Efeitos do tratamento com Mirabegron na disposição das gotículas lipídica do tecido adiposo inguinal:** Histologia representativa do tecido adiposo inguinal de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Setas pretas representam núcleos dos adipócitos, setas vermelhas representam gotículas multiloculares de triglicérides, setas verdes representam gotículas de triglicérides típicas. n=6 camundongos/grupo.

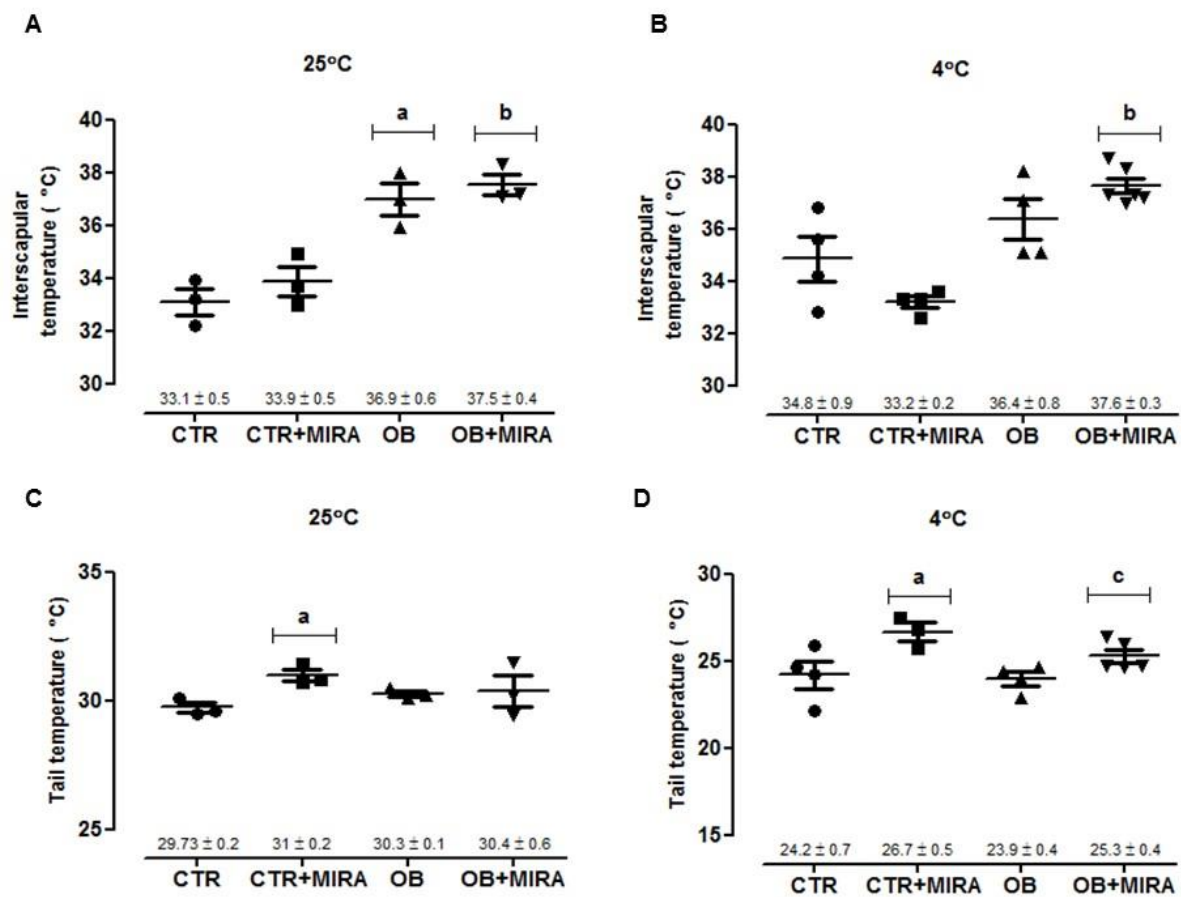
A figura 15 apresenta a expressão proteica de UCP1 dos tecidos adiposos marrom (painel A) e inguinal (painel B). Em ambos os tecidos há um aumento na expressão da proteína desacopladora da respiração mitocondrial no grupo CTR+ MIRA (94% no TAM e 61% no TAS-ing).



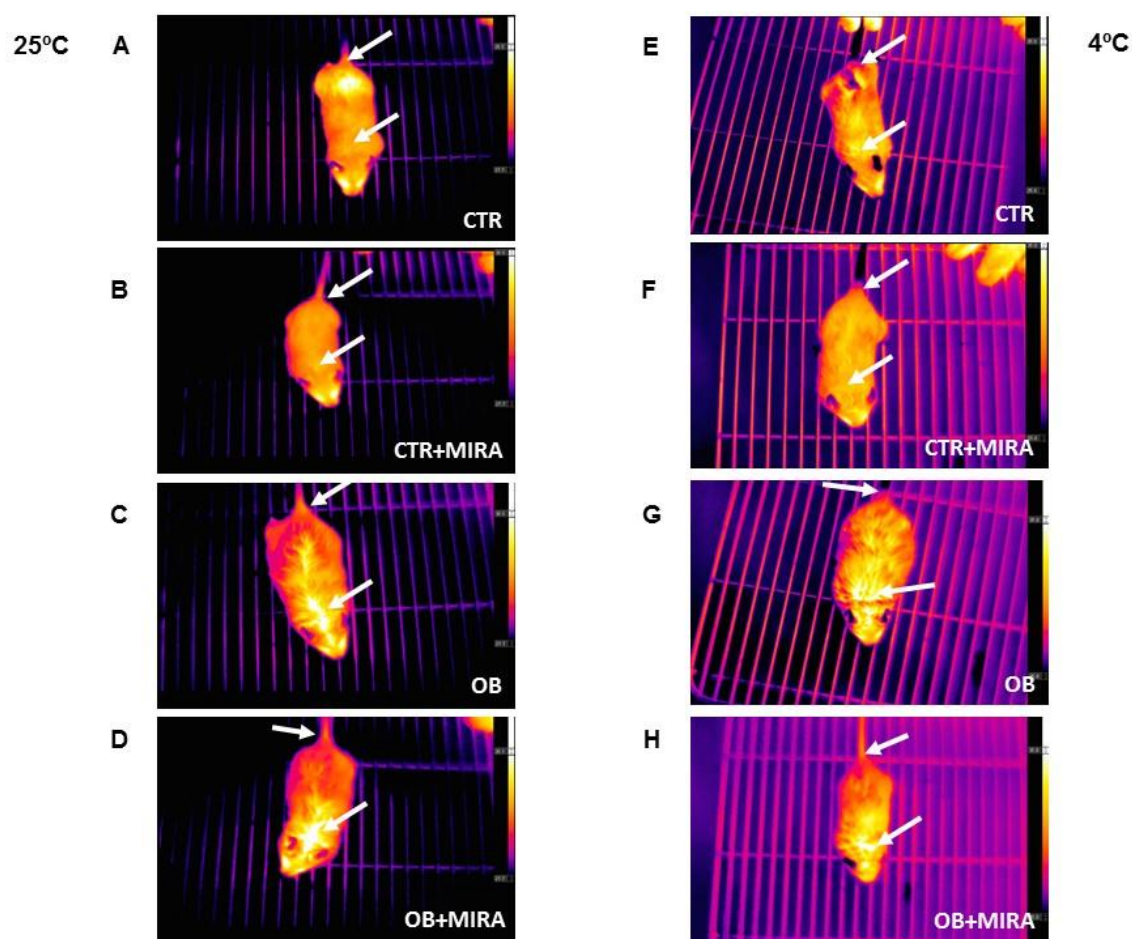
**Figura 15. Expressão proteica de UCP1 no Tecido adiposo marrom e Tecido adiposo inguinal** de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Os dados representam a média ± SEM de  $n=4-8$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA

A figura 16 apresenta a temperatura da região interescapular e da base da cauda dos camundongos na temperatura ambiente (25°C) e a 4°C, mantidos por 4 horas. Na primeira situação, os grupos obesos apresentam temperatura da região interescapular aumentada (aproximadamente 11%) quando comparado aos camundongos controles (painel A), enquanto que a 4°C apenas o grupo OB+MIRA apresenta um aumento de temperatura significativo quando comparado ao seu controle (13%) (painel B). Considerando que os roedores tem dissipação de calor pela cauda, foi medida também a temperatura pela sua base, e é possível observar que a 25°C o tratamento com Mira resultou em ligeiro aumento da temperatura dessa região (4%) no grupo CTR+MIRA. Contudo, o efeito do Mira mostra-se mais evidente quando observa-se a diferença da temperatura da base da cauda a 4°C, onde tanto o grupo CTR+MIRA quanto OB+MIRA apresentam temperatura elevada quando comparados aos seus respectivos controles tratados com veículo (10% e 6% respectivamente) (Figura 16D). A figura 17 apresenta as imagens termais representativas a 25°C (Figura 17 painéis A,B,C, e D) e a 4°C (Figura 17, D,E,F e G).



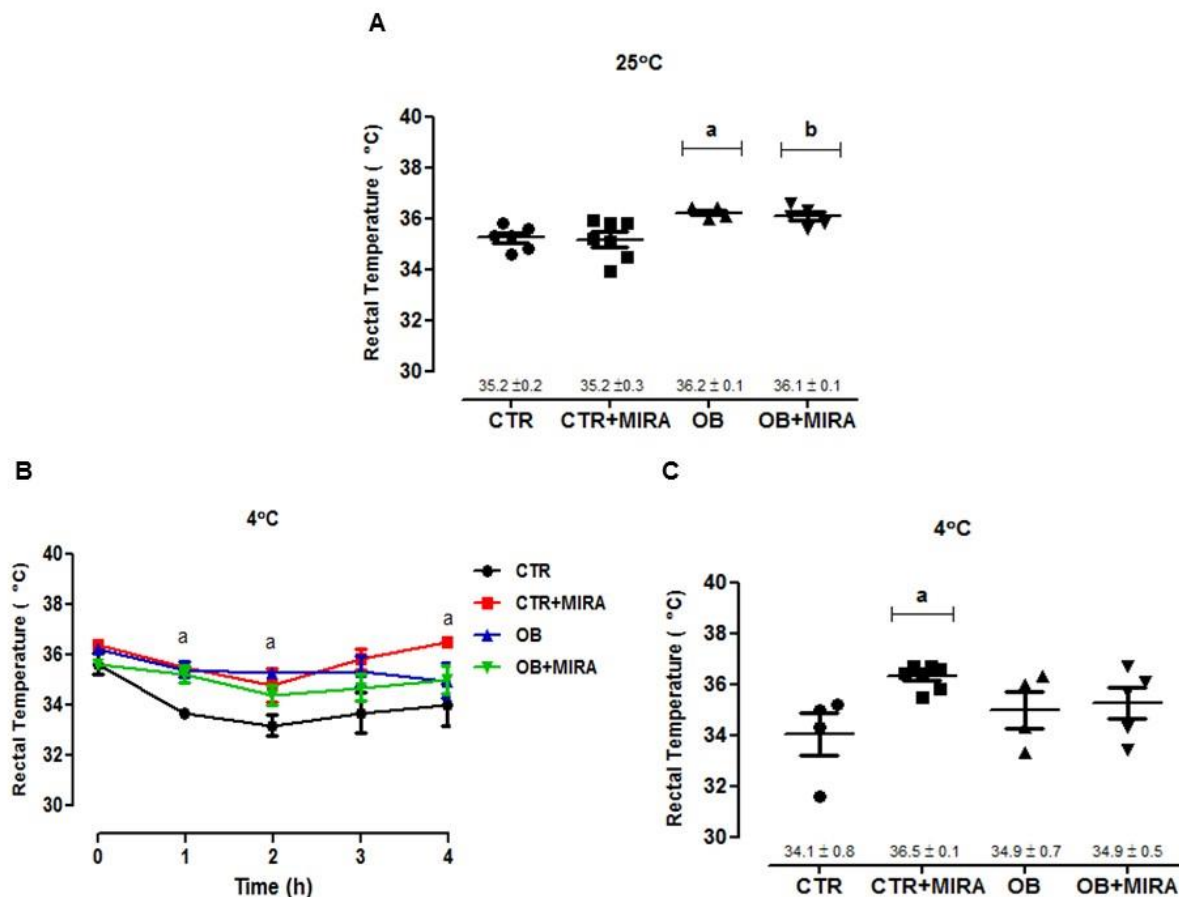


**Figura 16. Efeitos do tratamento com Mirabegron na temperatura da região interescapular e caudal:** Dados numéricos da temperatura da região interescapular e da base da cauda a 25°C (A,C), e após 4 horas a 4°C (B,D) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média ± SEM de  $n$ =aprox. 4 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p$ <0.05, comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p$ <0.05 comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p$ <0.05 comparado a OB.



**Figura 17. Imagem termal representativa das regiões interescapular e caudal:** a 25°C (A,B,C e D), e após 4 horas a 4°C (E,F,G e H) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA).  $n$ =aprox. 4 camundongos/grupo. Setas brancas representam a localização do tecido adiposo marrom interescapular e da base da cauda, onde as medidas foram realizadas.

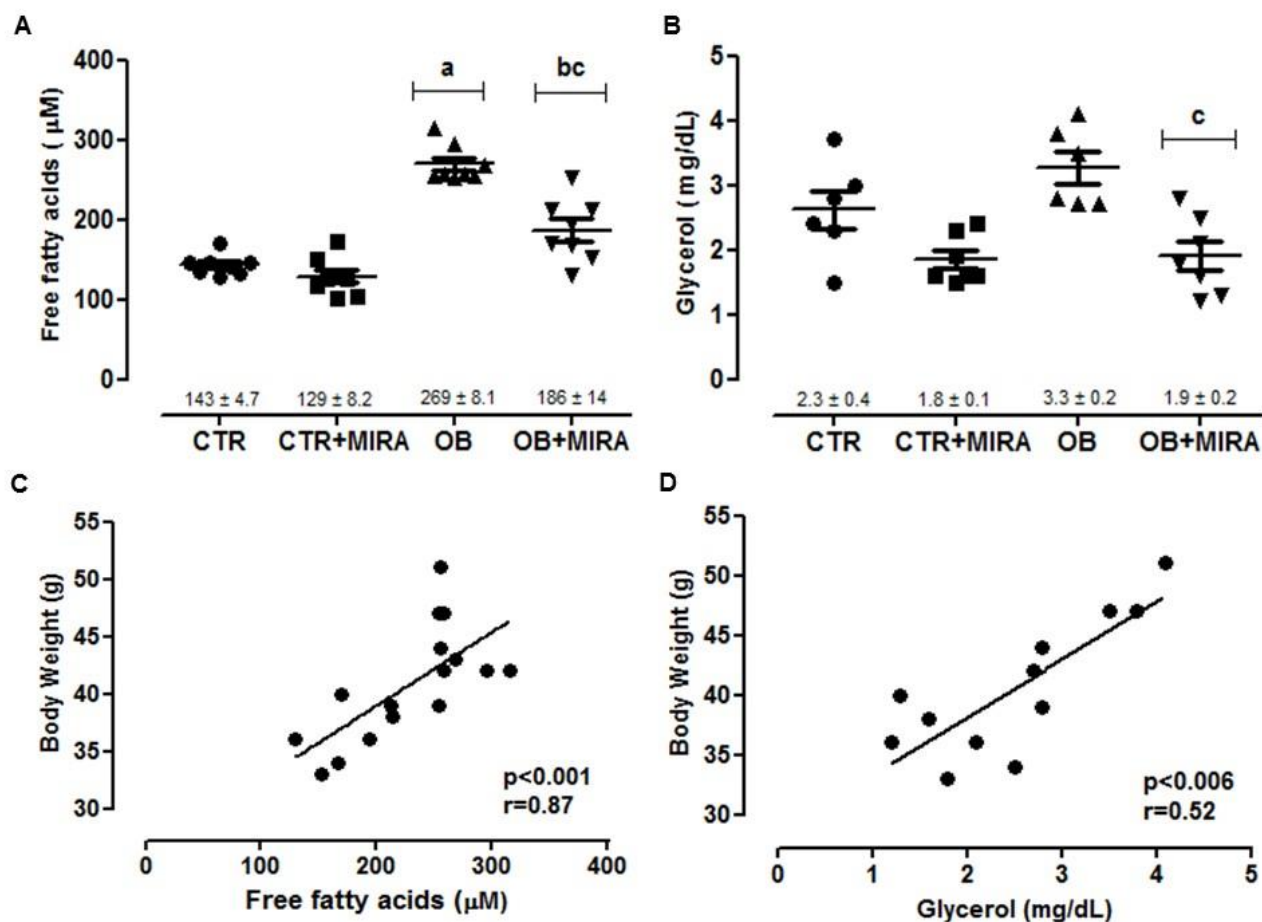
A figura 18 mostra os valores da temperatura retal, sendo que pode-se observar que a 25°C ambos os grupos obesos apresentam pequeno aumento (aproximadamente 2%), quando comparado aos grupos controles, efeito independente do tratamento com Mira (Figura 18A). Também foi realizada a medida da temperatura retal a 4°C, de hora em hora, em um total de 4 horas (Figura 18B). Podemos observar que o grupo CTR+MIRA apresenta valores significativamente aumentados da temperatura retal quando comparado ao grupo CTR desde o final da primeira hora (Figura 18B). Quando analisamos a temperatura retal ao final de 4 horas a 4°C, observamos que o grupo CTR+MIRA apresenta um aumento de 7% quando comparado a CTR (Figura 18C).



**Figura 18. Efeitos do Mirabegron na temperatura retal:** a 25°C (A), e após 4 horas a 4°C (B e C) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=4$  a 7 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA.

### 6.1.5 Ácidos graxos livres (AGL) e glicerol

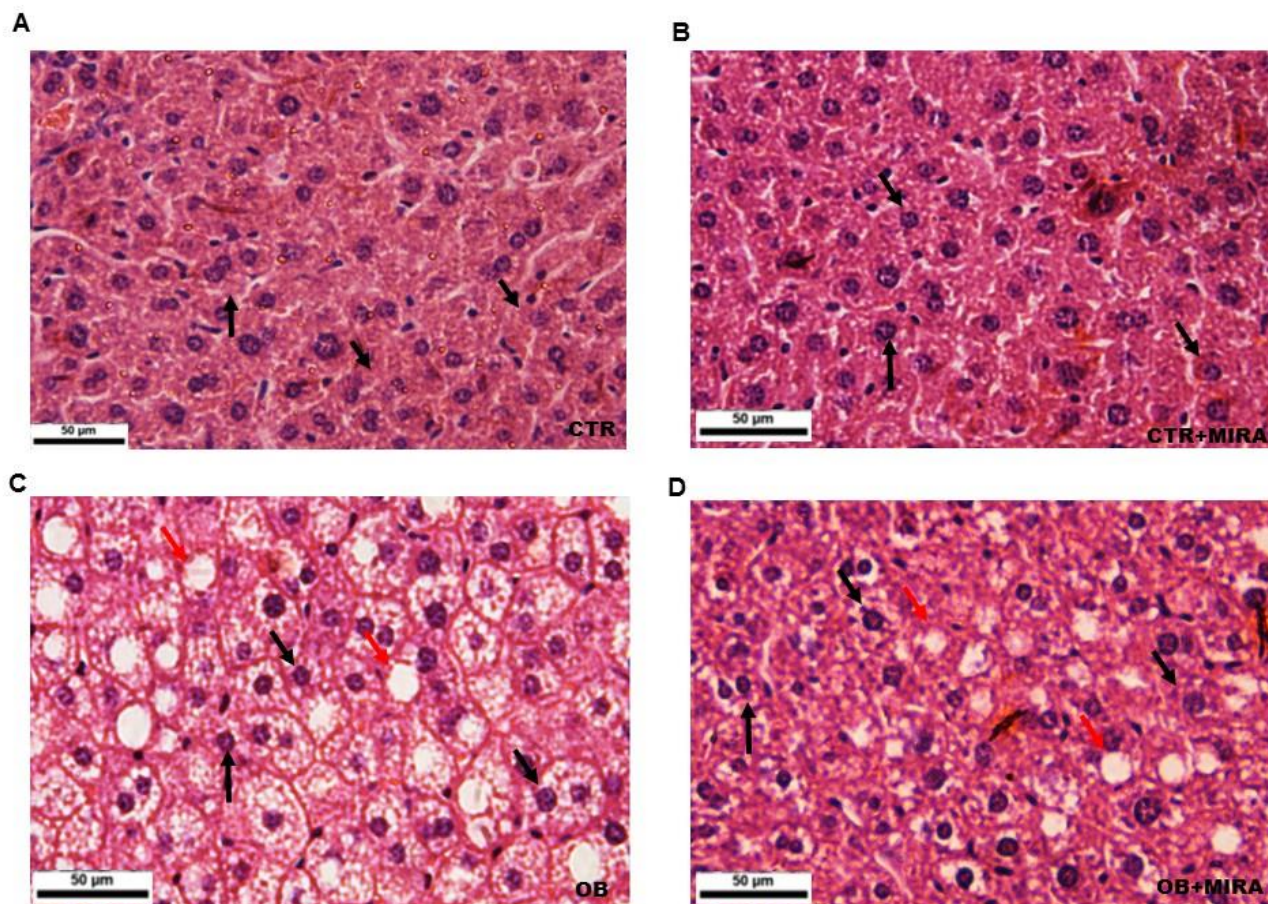
A figura 19 mostra o efeito da dieta hiperlipídica nas concentrações séricas de AGL e glicerol. Tanto o AGL quanto o glicerol apresentaram-se significativamente aumentados nos animais obesos, (88% para OB e 40% para OB+MIRA), respectivamente quando comparados aos controles. O tratamento com Mira nos animais obesos reduziu significativamente concentração de AGL (30%) e de glicerol (42%) quando comparado aos animais do grupo OB (Figura 19, painéis A e B). Verificamos uma correlação positiva entre as concentrações séricas de AGL e glicerol e os valores de peso corporal (Figura 19, painéis C e D).



**Figura 19. Efeitos do tratamento com Mirabegron em ácidos graxos livres e glicerol séricos:** ácidos graxos livres (A) e glicerol (B) de 12h de jejum e correlação dos níveis dos parâmetros séricos com o peso corporal (C e D, respectivamente) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média ± SEM de  $n=6$  a 8 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , comparado a CTR; <sup>b</sup> $p < 0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p < 0.05$  comparado a OB.

### 6.1.6 Morfologia do tecido hepático

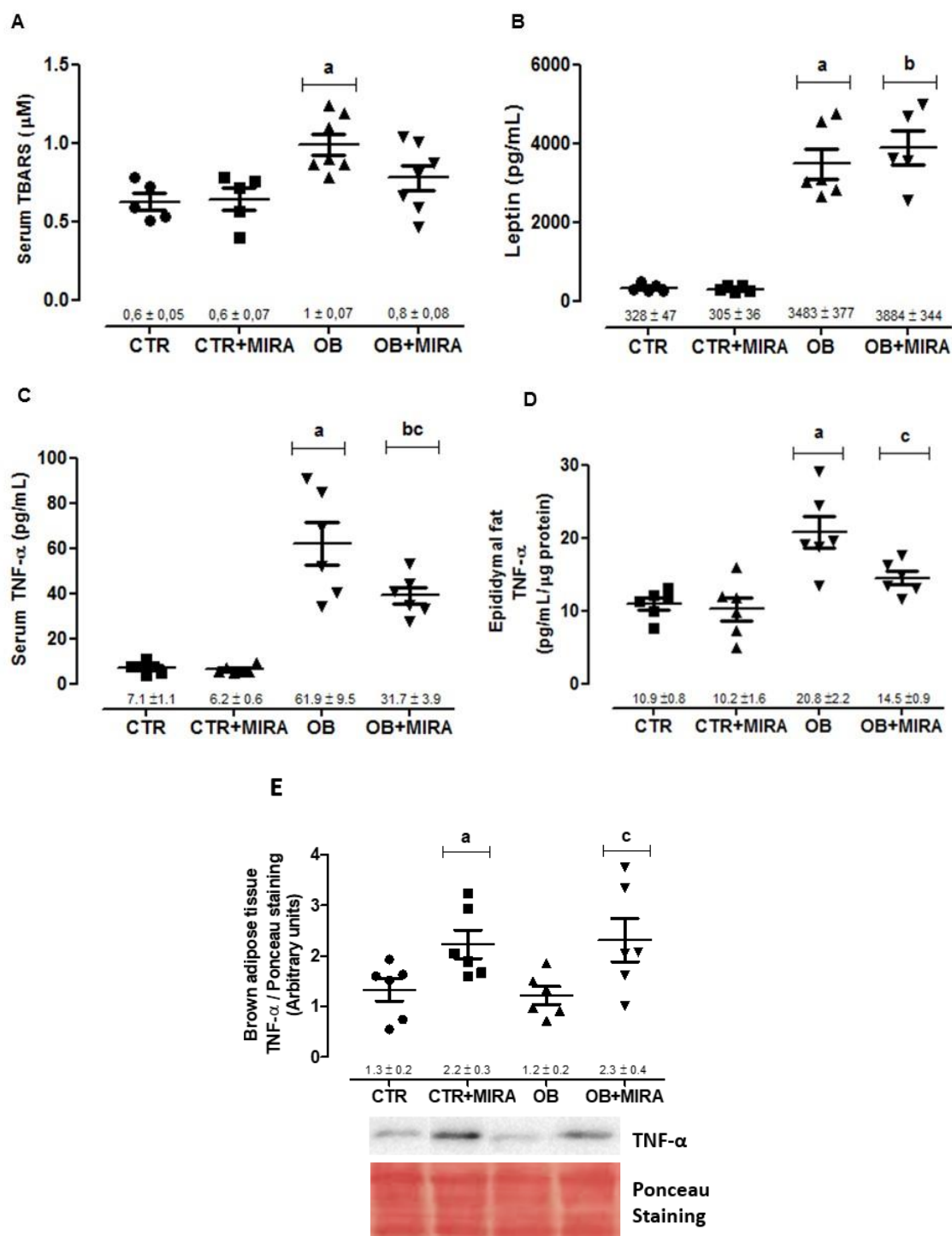
As imagens de histologia do tecido hepático são apresentadas na Figura 20. Não foram encontradas diferenças entre os grupos CTR e CTR+MIRA (Figura 20, painéis A e B). Contudo, no grupo OB é possível observar acúmulo de gotículas lipídicas, o que caracteriza um processo de esteatose hepática (Figura 20C). O grupo OB+MIRA apresentou redução desse acúmulo lipídico (Figura 20D).



**Figura 20. Efeitos do tratamento com Mirabegron na histologia hepática:** imagem representativa de histologia hepática de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Setas pretas representam núcleos dos hepatócitos, setas vermelhas representam gotículas de triglicérides. n=3 camundongos/grupo.

### **6.1.7 Concentração de TBARS, Leptina e TNF- $\alpha$**

A dieta hiperlipídica resultou em aumento das concentrações sistêmicas de TBARS (67%) e TNF- $\alpha$  (aproximadamente 700% para o soro, 90% para o homogenato epididimal) (Figura 21, painéis C e D) no grupo OB quando comparado ao grupo CTR. O tratamento com Mira reverteu essa alteração em 48% para o soro e 30% para o homogenato epididimal. A dieta hiperlipídica resultou em aumento das concentrações de leptina (aproximadamente 1000%) e o tratamento com Mira não reverteu essa alteração (Figura 21B). A expressão proteica de TNF- $\alpha$  também foi avaliada no TAM e podemos observar que surpreendentemente sua expressão é aumentada nos grupos CTR+MIRA e OB+MIRA.



**Figura 21.** Efeitos do tratamento com Mirabegron em TBARS (A), Leptina (B), TNF- $\alpha$  (C) séricos, TNF- $\alpha$  da gordura epididimal (D) e do tecido adiposo marrom (E) de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=5$  a 7 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p < 0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p < 0.05$  comparado a OB.

## SUMÁRIO DOS RESULTADOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E PERFIL LIPÍDICO

PARÂMETRO	CTR+MIRA	OB+MIRA
Peso corporal	↔	↓
Ingestão calórica	↔	↔
Massa da gordura epididimal	↓	↓
VO <sub>2</sub>	↑	↑
VCO <sub>2</sub>	↑	↑
Gasto energético	↑	↑
Expressão de UCP1 no TAM e TAS-ing	↑	↔
Temperatura da região interescapular a 25°C	↔	↔
Temperatura da região interescapular a 4°C	↔	↑
Temperatura da base da cauda a 25°C	↑	↔
Temperatura da base da cauda a 4°C	↑	↑
Temperatura retal a 25°C	↔	↔
Temperatura retal a 4°C	↑	↔
TNF- $\alpha$ sérico	↔	↓
TNF- $\alpha$ da gordura epididimal	↔	↓
Expressão de TNF- $\alpha$ no TAM	↑	↑
Ácidos graxos livres	↔	↓
Glicerol	↔	↓
Colesterol total	↔	↔
HDL-C	↔	↔
LDL-C	↔	↓
Triglicérides	↔	↔
Índice Aterogênico	↔	↓
Leptina	↑	↑
Esteatose hepática	↔	↓



### 6.1.8 DISCUSSÃO DOS EFEITOS DO MIRABEGRON SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E O METABOLISMO ENERGÉTICO

A partir dos resultados apresentados, observamos que o tratamento com Mira por duas semanas reduziu o peso corporal de camundongos obesos. É interessante observar que a redução do peso corporal total e da massa da gordura epididimal ocorreu independentemente de alterações na ingestão calórica. Esses dados sugerem que essa perda de massa gorda pode ser decorrente da ativação dos  $\beta_3$ -AR nos adipócitos, com aumento da lipólise. De fato, estudos anteriores que utilizaram o tratamento com Mira na concentração de 10mg/kg (mesma concentração que a utilizada no estudo) mostraram que a administração da droga por duas semanas causou redução da massa da gordura epididimal, sem alterar o peso corporal de camundongos obesos (CALMASINI et al., 2017). Por outro lado, o estudo de Yuno e colaboradores (2014) não encontrou modificação no peso corporal e consumo alimentar em ratos Wistar.

O papel da ativação dos receptores  $\beta_3$ -AR em tecido adiposo ainda é pouco explorado e estudos que utilizaram diferentes agonistas mostram resultados contraditórios. Alguns trabalhos demonstraram redução significativa do peso corporal de camundongos com a administração de BRL-37344 por duas semanas (WU et al., 2014) e com o CL316,243 por quatro (FU et al., 2008; XIAO et al., 2015) e oito semanas (WARNER et al., 2016). Todavia, outros estudos não observaram diferenças no peso corporal com o tratamento com CL316,243 por duas (POHER et al., 2015) e quatro semanas (GHORBANI et al., 2015) em ratos Wistar e Zucker obesos. Similar aos nossos achados, esses estudos mostraram que o uso de agonistas  $\beta_3$ -AR não modificava a ingestão alimentar, à exceção do estudo de Xiao e colaboradores (2015) que mostrou mudanças nesse parâmetro. Os trabalhos relatam que a redução do peso corporal e massa da gordura epididimal se deve principalmente devido efeito lipolítico dos agonistas  $\beta_3$ -AR e aumento do gasto energético por ativação termogênica do tecido adiposo marrom. Cabe ressaltar que os resultados conflitantes podem ser devido às diferenças na espécie animal utilizada em cada estudo, bem como na dose da droga utilizada.

Com relação ao perfil lipídico, sabe-se que a obesidade é uma patologia caracterizada por alterações metabólicas provenientes da hipertrofia dos adipócitos, especialmente aqueles localizados entre as vísceras e na região abdominal. Essa adiposidade está diretamente relacionada a alterações no perfil das lipoproteínas

plasmáticas, especialmente observadas pelo aumento dos níveis plasmáticos das moléculas de LDL colesterol (TCHERNOF et al., 1996; ROCHA, LIBBY, 2009). Como esperado, a dieta usada no presente estudo acarretou aumento dos níveis séricos de colesterol total, LDL colesterol, triglicérides e índice aterogênico em camundongos obesos. Essa alteração no perfil lipídico pode ser explicada pelo processo inflamatório ocasionado pela hipertrofia dos adipócitos, demonstrado pelo aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  tanto na gordura epididimal (67%) quanto circulante (700%). Sabe-se que o TNF- $\alpha$  apresenta um efeito lipolítico, o qual resulta em aumento dos níveis de AGL na circulação (ZHENG et al., 2014), o que foi observado nos camundongos do grupo OB. Quando há excesso de AGL na circulação, os mesmos são direcionados para armazenamento no fígado, o qual disponibiliza esses lipídios novamente para a circulação sanguínea sob a forma de VLDL para se converterem a LDL após perda de TAG (GINSBERG et al., 2005). O excesso de AGL circulante observado no grupo OB pode ter contribuído de forma significativa para o processo de esteatose hepática observado na imagem de histologia desse grupo.

O tratamento com Mira por duas semanas em camundongos obesos reduziu as concentrações de colesterol total, LDL colesterol e do índice aterogênico, calculado a partir das concentrações de colesterol total e colesterol HDL. Redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , AGL e glicerol também foram observados nesse grupo. Esses achados podem possivelmente explicar a atenuação da esteatose hepática dos camundongos obesos como também a redução dos níveis de LDL colesterol e índice aterogênico. Por outro lado, trabalhos anteriores não mostraram diferenças nos níveis de LDL-C (WU et al., 2014) e colesterol total (XIAO et al., 2015) em camundongos obesos tratados por 2 semanas com os agonistas  $\beta_3$ -AR: BRL37344 e CL 316,243, respectivamente. Cabe salientar que estudos mostrando os efeitos dos agonistas  $\beta_3$ -AR no perfil lipídico de camundongos obesos são escassos.

Sabe-se que além do elevado nível circulante de LDL-C ser um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, a ação oxidante das espécies reativas de oxigênio nessas moléculas leva ao processo inflamatório que resulta na formação de células de espuma e aterogênese (TRPKOVIC et al., 2015). O tratamento com Mira resultou em redução do marcador de peroxidação lipídica TBARS, que estava elevado nos animais obesos, contribuindo também para a redução do risco de aterosclerose nesse modelo de obesidade.

O hormônio leptina é produzido principalmente nos adipócitos pertencentes ao TAS e suas principais funções estão relacionadas ao controle da ingestão alimentar, ativação do SNS e aumento do gasto energético (ABELLA et al., 2017). A obesidade é caracterizada por resistência à leptina e hiperleptinemia em humanos e em alguns modelos experimentais (CUI et al., 2017). Algumas estratégias terapêuticas, como a prática de exercícios físicos, resultam em aumento da sensibilidade à leptina, melhorando suas ações no controle da ingestão alimentar (ZHAO, 2011). Estudos demonstram redução da concentração de leptina circulante como efeito de adaptação ao frio (KORHONEN, SAARELA, 2005; LUO et al., 2016) e pela ativação dos  $\beta_3$ -AR pelo CL 316,243 em camundongos (LUO et al., 2016) e AJ-9677 em beagles (OMACHI et al., 2007). Além disso, um estudo envolvendo a administração do CL 316,243 demonstrou potencialização da ação anorexigênica da leptina, dependente da ativação da UCP1, em camundongos selvagens quando comparados aos animais *knockout* para UCP1 (OKAMATSU-OGURA et al., 2011). Surpreendentemente, o tratamento com Mira por duas semanas não alterou as concentrações de leptina em camundongos controles e obesos, isso pode ajudar a explicar o fato de não haver modificações na ingestão alimentar. A razão da discrepância entre nossos resultados e dos estudos anteriores ainda não é clara.

Desde a redescoberta da importância da presença do TAM em humanos na última década (HANY et al., 2002; CYPESS et al., 2009), estudos clínicos e experimentais, envolvendo a utilização de agonistas  $\beta_3$ -AR ou a exposição ao frio, têm demonstrado que a ativação desse subtipo de receptores no TAM resulta em aumento do gasto energético, com consequente direcionamento de lipídios para esse tecido com redução dos níveis de AGL circulantes e estoques de TAG no fígado (BERBÉE et al., 2015; ROBERTS-TOLLER et al., 2015; WARNER et al., 2016; CYPESS et al., 2015; LYNES et al., 2017). Isso ocorre porque esses lipídios são direcionados para o TAM metabolicamente ativo. Além disso, a ativação do TAM em resposta ao frio é capaz de influenciar a atividade da enzima LPL, estimulando o catabolismo de lipoproteínas circulantes ricas em triglicérides (provenientes da dieta ou do fígado) em AGL, os quais são utilizados como substratos energéticos ao TAM (BARTELT et al., 2011). Em nosso estudo, a exposição dos camundongos obesos tratados com Mira ao frio (4°C) durante 4 h elevou significativamente a temperatura interescapular e caudal, sem acarretar mudanças na temperatura retal. Esses achados mostram claramente o efeito termogênico do Mira após exposição prolongada ao frio. Embora não haja estudo

anterior sobre o efeito do Mira na temperatura corporal de camundongos obesos, esse resultado corrobora com o artigo de Warner e colaboradores (2016), onde ratos Wistar obesos foram tratados com CL 316,243 por 8 semanas, e não foi observada alteração da temperatura corporal medida a 25°C. Os autores porém, observaram uma maior dissipação de calor pela cauda, de forma a proteger o animal de hipertermia. Ratos e camundongos controlam sua temperatura corporal principalmente pela vasorregulação na cauda (GORDON, 1987), onde a dilatação da artéria ventral aumenta o fluxo sanguíneo para as veias laterais com a finalidade de dissipar o calor quando o limite da temperatura corporal é excedido (GORDON, 1990; GORDON, 2017). Desse modo, além das regiões retal e interescapular, optou-se por também realizar a medida de temperatura na base da cauda dos camundongos.

Além das alterações na temperatura corporal em resposta ao frio, o tratamento com Mira elevou o gasto energético, medidos através de  $VO_2$  e  $VCO_2$  e modificou as características histológicas do TAM de ambos os grupos CTR+MIRA e OB+MIRA. Além disso, o tratamento com Mira modificou a característica das gotículas lipídicas do tecido adiposo inguinal, sugerindo que houve “*browning*” desse tecido. A modificação desse tecido pode ter contribuído para o aumento do consumo de AGL e gasto energético como efeito do tratamento com Mirabegron nos grupos CTR+MIRA e OB+MIRA. Vale salientar, contudo, que a expressão de UCP1 no TAM e TAS-ing só foi aumentada no grupo CTR+MIRA. Sabe-se que a administração do agonista CL316,243 resulta em aumento da expressão proteica de UCP1 no TAM em camundongos magros (YOSHITOMI, 1998), ratos obesos (WARNER et al, 2016) e no TAS-ing de camundongos magros (MONTILLO et al., 2014; LEE et al., 2017). Porém, não há outros estudos mostrando se há modificação da expressão dessa proteína no TAM e TAS-ing de camundongos obesos, considerando que os estudos encontrados avaliaram apenas a expressão gênica (EMILSSOM et al., 1998; COMMINS et al., 1999; WARGENT et al., 2013). Portanto, mais estudos são necessários para clarificar a regulação da expressão de UCP1 em modelos animais tratados com agonistas  $\beta_3$ -AR. Estudos mostram que a ativação do receptor  $\beta_3$ -AR resulta em aumento do gasto energético e captação de AGL no TAM de ratos (WARNER et al, 2016), camundongos e humanos (LYNES et al 2017). Nesse momento, só existe um estudo em seres humanos mostrando que o Mira aumenta a atividade do TAM e também a taxa metabólica basal. No entanto, esse estudo clínico usou dose elevada do composto (200mg) numa única administração em pacientes magros saudáveis (CYPESS et al.,

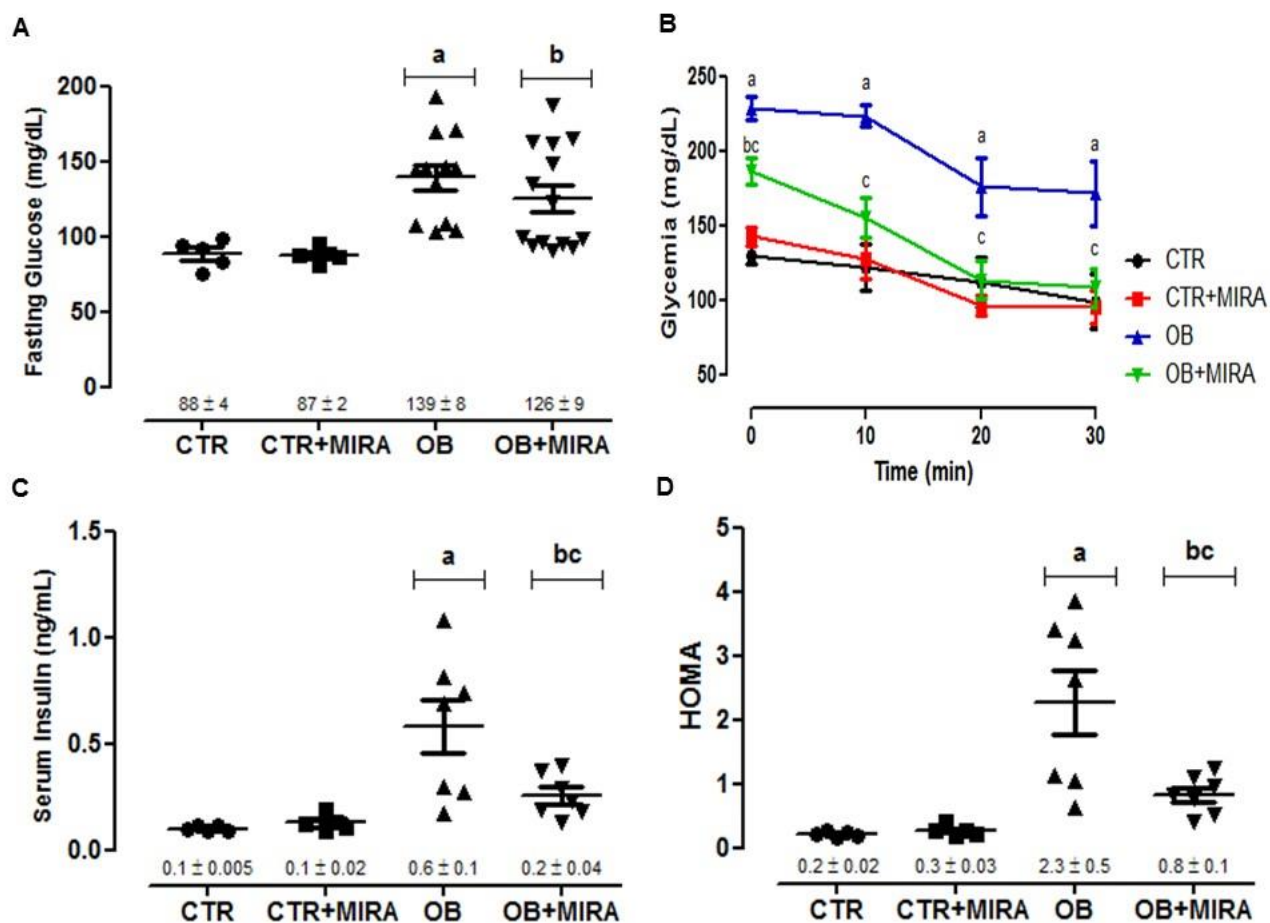
2015). Assim, não existem estudos mostrando o efeito do tratamento crônico com Mira em modelos de obesidade e nem em estudos clínicos randomizados e controlados. Portanto, nosso estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos do agonista seletivo de receptores  $\beta_3$ -AR no metabolismo energético e seus efeitos benéficos no perfil lipídico de camundongos obesos. Cabe ainda salientar que a interação entre tecido adiposo marrom, “*browning*” do tecido adiposo branco e perfil lipídico é uma abordagem a ser explorada. De fato, estudo prévio mostrou que a quantidade de TAM é inversamente proporcional aos níveis de LDL-C (MATSUSHITA et al., 2014). Sendo assim, drogas que ativam o TAM representam potenciais terapêuticos promissores para o tratamento da obesidade e suas comorbidades.

## **6.2 PARTE 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS EFEITOS DO MIRABEGRON SOBRE O METABOLISMO GLICÍDICO**

### **6.2.1 Perfil glicêmico**

Foram encontrados valores aumentados de glicemia de jejum (12h) em ambos os grupos obesos (aproximadamente 58 e 49% para OB e OB+MIRA, respectivamente) quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Figura 22A). Curiosamente, após jejum de 2 horas (momento 0 do teste de sensibilidade à insulina), o grupo OB+MIRA apresentou valores reduzidos em aproximadamente 18% na glicemia quando comparado ao grupo OB. Além disso, nos tempos 10, 20 e 30 minutos, os valores de glicemia do grupo OB+MIRA retornou a valores semelhantes ao dos grupos controles (Figura 22B).

Os níveis séricos de insulina foram aumentados em 600% no grupo OB e em 200% em OB+MIRA quando comparados aos grupos controles (Figura 22C). O tratamento com Mira em camundongos obesos resultou em redução da média dos valores de insulina em aproximadamente 300% quando comparado ao grupo OB. O índice HOMA foi aumentado em 1150% no grupo OB e o tratamento com Mira reduziu esse índice em 65% nos animais obesos. (Figure 22D).



**Figura 22. Efeitos do tratamento com Mirabegron em parâmetros glicêmicos:** glicose de 12 horas de jejum (A), glicemia nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos após administração de insulina nos camundongos em jejum por 2 horas (B), insulina sérica de jejum de 12 horas (C), índice HOMA (D). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n= 5$  a 15 camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p<0.05$  comparado a OB.

### SUMÁRIO DOS RESULTADOS DO METABOLISMO GLICÍDICO

PARÂMETRO	CTR+MIRA	OB+MIRA
Glicemia	↔	↔
Insulina	↔	↓
HOMA	↔	↓
Teste de sensibilidade à insulina	↔	↓

## 6.2.2 DISCUSSÃO: EFEITOS DO MIRABEGRON NO METABOLISMO GLICÍDICO

A glicemia de jejum apresenta-se elevada como resultado da dieta hiperlipídica em ambos os grupos obesos, independente do Mira. No entanto, mudanças significativas na glicemia de jejum de 2 horas e na sensibilidade à insulina (considerando que houve redução em seus níveis séricos após 12h de jejum, índice HOMA, e curva glicêmica após administração de insulina exógena).

Sabe-se que o excesso de AGL e TNF- $\alpha$  circulantes causados pela obesidade resultam em redução da sensibilidade à insulina por ativação de serinoquinases em tecidos insulino-dependentes (PAULI et al., 2011), inibição da expressão de adiponectina (KADOWAKI et al., 2006), estresse oxidativo e pelo processo de esteatose hepática (CUSI, 2012), resultando em redução da captação de glicose e diabetes mellitus tipo 2. Em nosso estudo, o tratamento com Mira pode ter levado à melhora da sensibilidade à insulina por aumento da utilização de glicose e AGL pelo TAM, assim como demonstrado em estudos que utilizaram outros agonistas  $\beta_3$ -AR (XIAO et al., 2015; WARNER et al., 2016). De fato, estudos prévios demonstraram que o browning do TAS-ing resulta em aumento de captação de glicose desse tecido (MÖSSENBOCK et al., 2014) e que o aumento da captação de glicose em camundongos obesos e diabéticos tratados com o agonista  $\beta_3$ -AR, BRL-37344, ocorre no TAM, não havendo modificações dessa captação pelo músculo esquelético (WU et al., 2014). Cabe salientar que a população de receptores  $\beta$ -AR no músculo esquelético é do subtipo  $\beta_2$ , cerca de 90%, e uma pequena proporção do subtipo  $\beta_1$  está presente no tecido (LYNCH, RYALL, 2008).

Somente dois trabalhos existem avaliando os efeitos do tratamento com Mira no metabolismo glicídico e foram realizados no Joslim Diabetes Center (Boston, EUA), sendo ambos os estudos com administração aguda de Mira. O primeiro estudo, de natureza experimental, não mostrou alteração na curva glicêmica de camundongos obesos (ROBERTS-TOLER et al., 2015). Já no estudo clínico, avaliando 12 jovens magros do sexo masculino (22 anos de idade), a administração única de alta dose de Mira (200mg) resultou em aumento da captação de glicose pelo TAM (CYPESS ET AL., 2015).

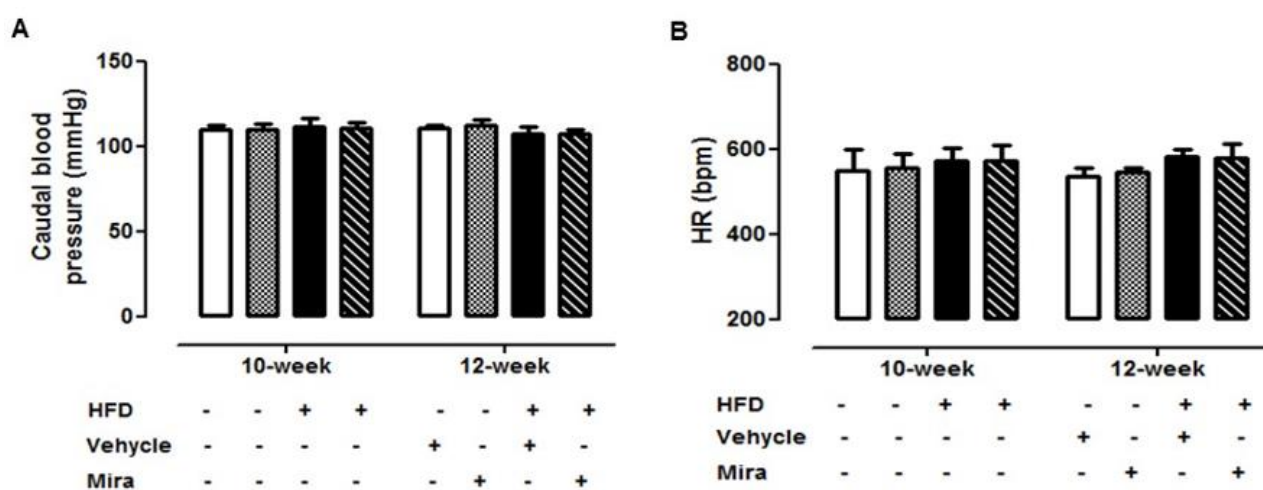
Portanto, nossos resultados mostram que o tratamento com Mira por 2 semanas melhora o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina, possivelmente por ativação da via  $\beta_3$ -AR/AMPC/PKA no TAM e TAS-ing.



### 6.3 PARTE 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS EFEITOS DO MIRABEGRON SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO

#### 6.3.1 Pressão arterial caudal e frequência cardíaca

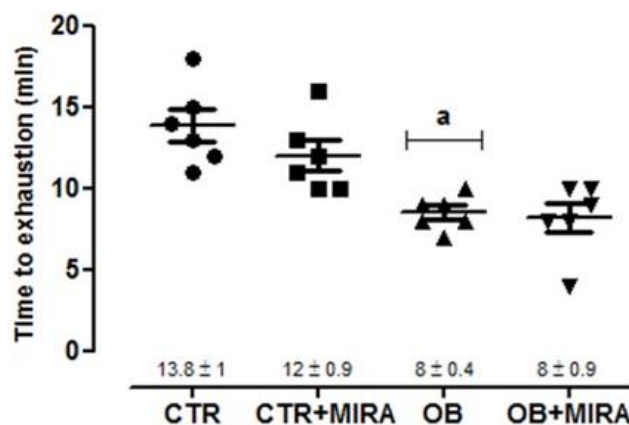
Nem a dieta hiperlipídica nem o tratamento com Mira causaram qualquer alteração na pressão arterial caudal e na frequência cardíaca (Figura 23, painéis A e B).



**Figura 23.** Efeitos do tratamento com Mirabegron na pressão arterial caudal (A) e frequência cardíaca (B) nas semanas 10 e 12 de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=10$  camundongos/grupo.

#### 6.3.2 Tolerância ao esforço

Como esperado, a dieta hiperlipídica reduziu em aproximadamente 42% o tempo para a exaustão em teste de esforço de camundongos em ambos os grupos obesos (OB e OB+MIRA), mostrando que o tratamento com Mira por 2 semanas não modifica esse menor desempenho dos animais obesos (Figura 24).



**Figura 24. Efeitos do tratamento com Mirabegron na tolerância ao esforço.** Tempo de exaustão após teste de esforço de velocidade incremental até a exaustão de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=6$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR.

### 6.3.3 Curvas concentração-resposta em anéis de aorta

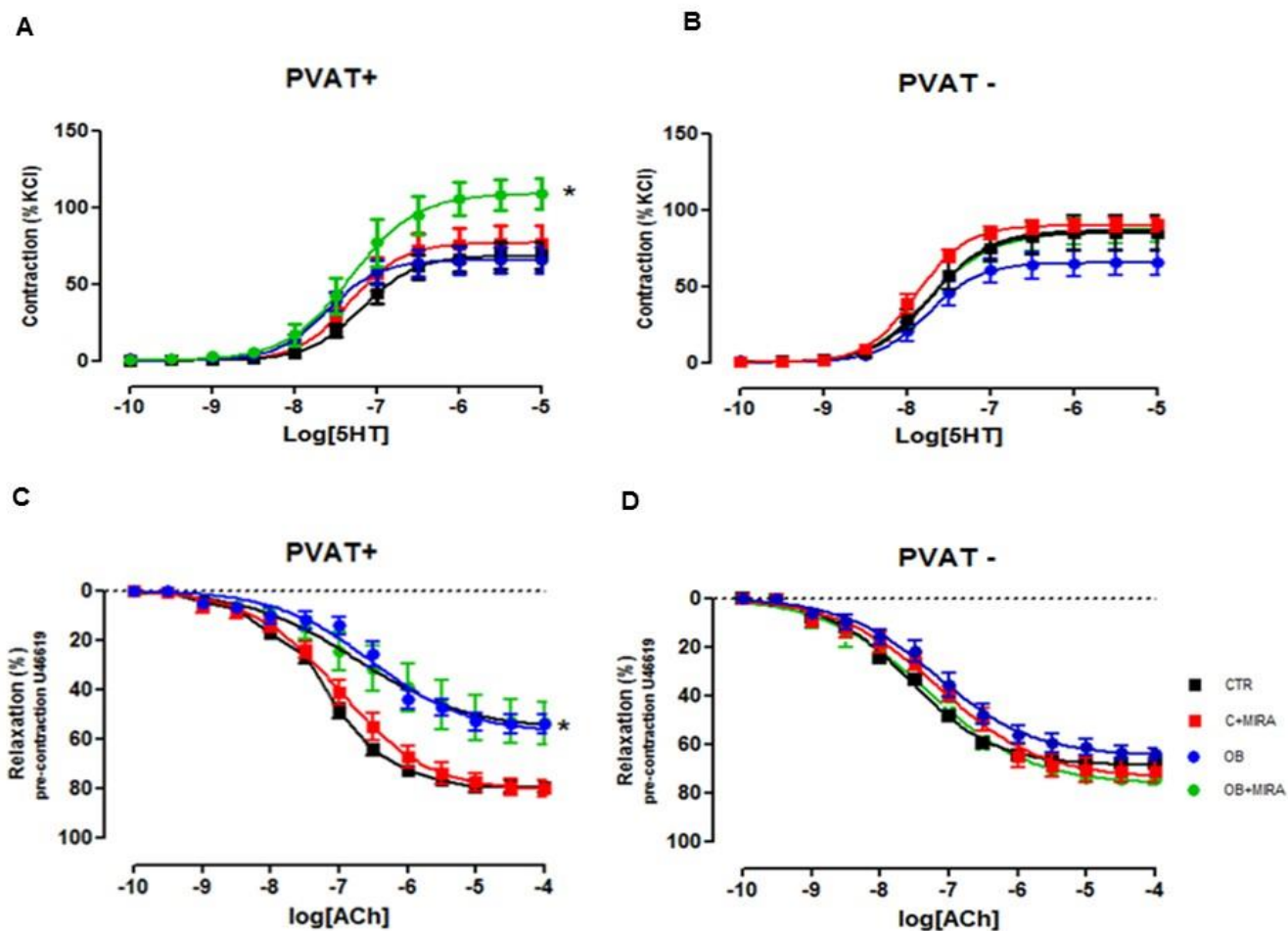
#### Resposta contrátil

A serotonina (5-HT, 1nM – 30 $\mu$ M) produziu respostas contráteis dependentes da concentração em anéis de aorta PVAT<sup>-</sup> e PVAT<sup>+</sup> (Figura 23, painéis A e B). Podemos observar um aumento na E<sub>max</sub> para 5-HT em aorta de animais do grupo OB+MIRA com PVAT<sup>+</sup>, aproximadamente 60%, quando comparado aos outros grupos (Figura 25A). Por outro lado, a retirada do PVAT<sup>-</sup> nos anéis da aorta aboliu esse efeito, mostrando que o tecido adiposo desses animais apresentam características particulares (Figura 25B). Os valores da E<sub>max</sub> e pEC<sub>50</sub> estão sumarizados na Tabela 2.

#### Resposta relaxante dependente do endotélio

A acetilcolina (ACh, 100pM – 30 $\mu$ M) produziu relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta PVAT<sup>-</sup> e PVAT<sup>+</sup> (Figura 25, painéis C e D). A E<sub>max</sub> foi significativamente reduzida nos anéis de aorta PVAT<sup>+</sup> dos animais obesos, aproximadamente 32%, quando comparada aos valores de E<sub>max</sub> de anéis dos grupos CTR PVAT<sup>+</sup> e CTR+MIRA PVAT<sup>+</sup> (Figura 25C), e o tratamento com mira não modificou essa menor resposta relaxante.

A retirada do PVAT aboliu esse efeito, confirmando que o tecido adiposo dos animais obesos está produzindo substâncias que estão interferindo na resposta relaxante do músculo liso vascular (Figura 25D). A Tabela 2 sumariza os resultados.



**Figura 25. Efeitos do tratamento com Mirabegron na reatividade vascular:** Resposta contrátil à Serotonina (5HT) e relaxante à Acetilcolina (ACh), em anéis de aorta na presença (PVAT+) (A,C) e ausência (PVAT-) (B,D) de tecido adiposo perivascular de camundongos controles tratados com veículo (CTR), controles tratados com Mira (CTR+MIRA), obesos (OB) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=10$  camundongos/grupo. \* $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA e OB.

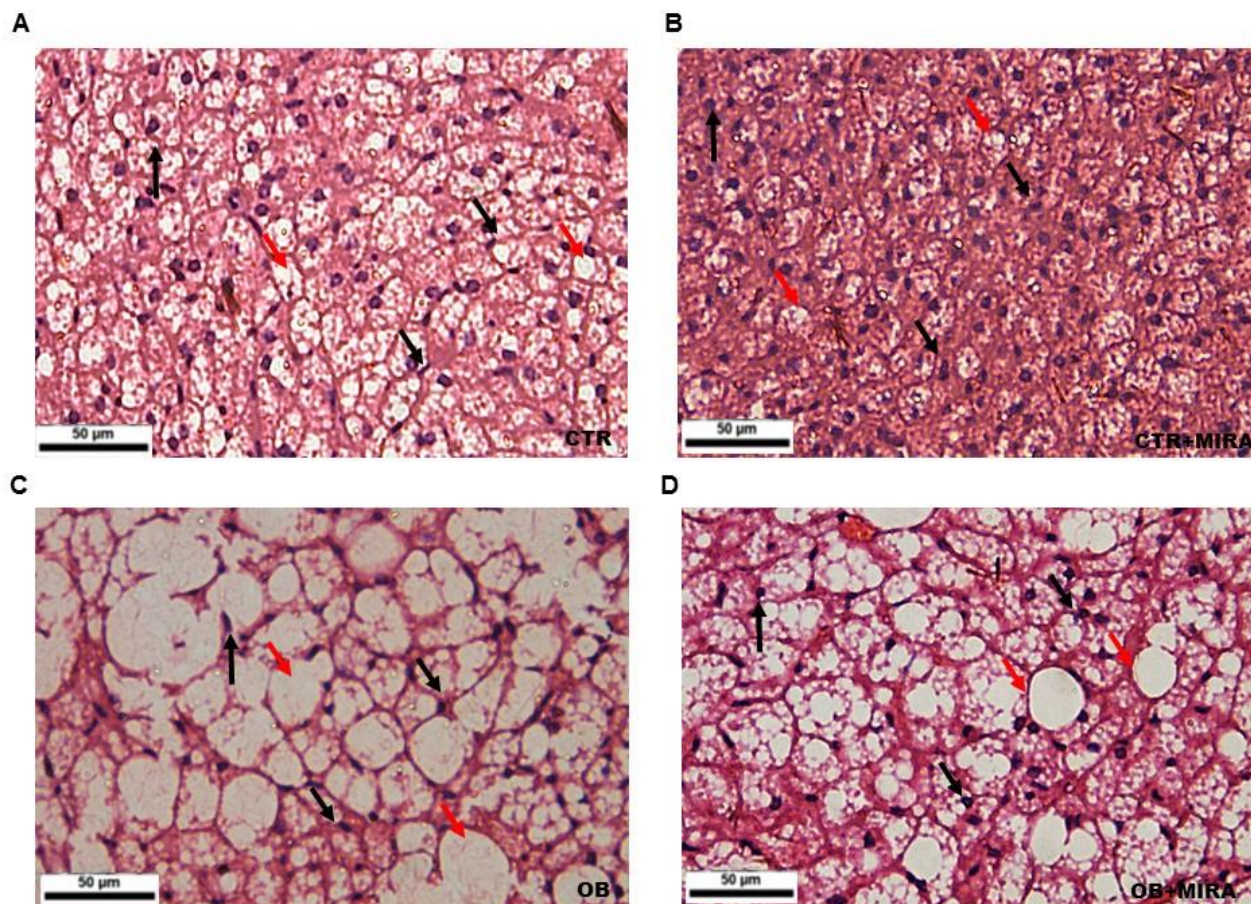
**Tabela 2. Resposta máxima (Emax) and potência (pEC<sub>50</sub>) em resposta à Serotonina (5-HT) e Acetilcolina (ACh) de camundongos obesos tratados com mirabegron por 2 semanas.**

	CTR PVAT+	CTR PVAT-	CTR+MIRA PVAT+	CTR+MIRA PVAT-	OB PVAT+	OB PVAT-	OB+MIRA PVAT+	OB+MIRA PVAT-
<b>5-HT</b>								
Emax	68.6 ± 9	84.9 ± 11	76.7 ± 11	90.4 ± 4	65.6 ± 9	65.5 ± 9	108.9 ± 10 <sup>bc</sup>	87.3 ± 9
EC <sub>50</sub>	7.2 ± 0.05 <sup>*</sup>	7.7 ± 0.04	7.3 ± 0.07 <sup>*</sup>	7.9 ± 0.07	7.5 ± 0.1	7.7 ± 0.09	7.2 ± 0.1 <sup>*c</sup>	7.8 ± 0.08
<b>ACh</b>								
Emax	79.6 ± 2	68 ± 4	80.3 ± 3	71.2 ± 3	54.3 ± 4 <sup>*a</sup>	66.8 ± 4	54 ± 9 <sup>*b</sup>	74.9 ± 2
EC <sub>50</sub>	7.2 ± 0.08	7.6 ± 0.2	7.1 ± 0.08	7.1 ± 0.1	6.7 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.3 ± 0.2 <sup>*b</sup>	7.3 ± 0.2

Os dados representam a média ± SEM de  $n=10$  camundongos/grupo. <sup>a</sup> $p<0.05$ , comparado a CTR ; <sup>b</sup> $p<0.05$  comparado a CTR+MIRA; <sup>c</sup> $p<0.05$  comparado a OB; \*  $P<0,05$  comparado a PVAT-.

### 6.3.4 Morfologia do tecido adiposo perivascular

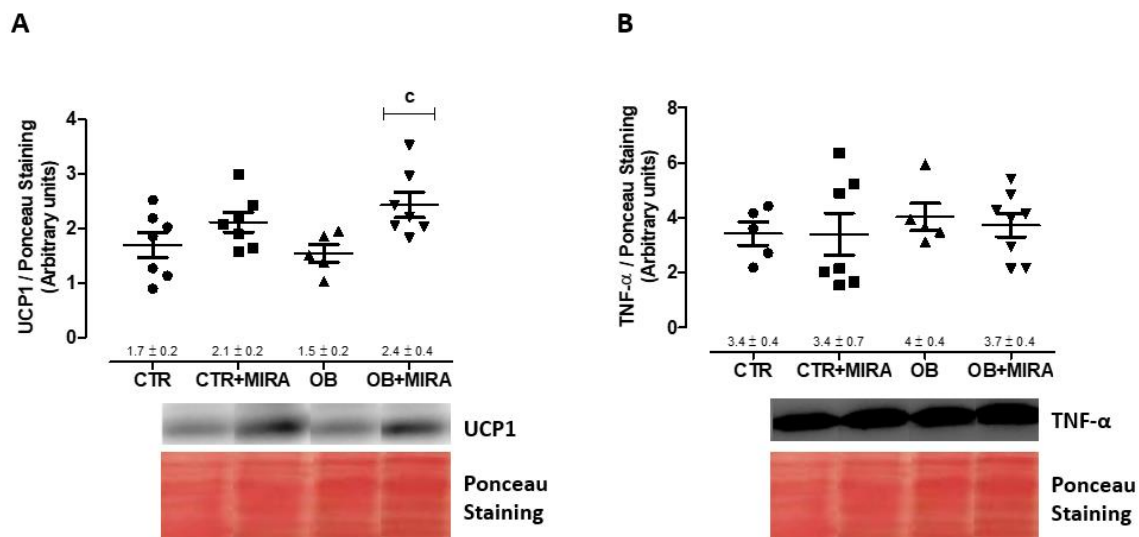
A figura 26 mostra a histologia do PVAT. Os painéis A e B mostram uma similaridade histológica, relacionada à arquitetura e estrutura, entre o PVAT e o tecido adiposo marrom interescapular (mostrado na Figura 13), o qual possui gotículas lipídicas multiloculares nos grupos controles. Os grupos obesos apresentaram aumento do tamanho dos depósitos lipídicos, assim como ocorreu no TAM. A análise qualitativa mostrou diferenças visuais no tamanho das gotículas lipídicas dos grupos CTR+MIRA e OB+MIRA quando comparados aos respectivos grupos controles tratados com veículo.



**Figura 26. Efeitos do tratamento com Mirabegron na histologia do tecido adiposo perivascular:** imagem representativa de PVAT de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Setas pretas representam núcleos dos adipócitos, setas vermelhas representam gotículas de triglicérides. n=3 camundongos/grupo.

### 6.3.5 Expressão proteica de UCP1 e TNF- $\alpha$ no PVAT

A figura 27 mostra que a expressão de UCP1 encontra-se aumentada no grupo OB+MIRA (41%) quando comparado ao grupo OB (painel A). Não houve diferenças na expressão proteica de TNF- $\alpha$  no PVAT dos grupos controles e obesos tratados com Mira.



**Figura 27. Expressão proteica de UCP1 e TNF- $\alpha$  no PVAT** de camundongos controles tratados com veículo (CTR) (A), controles tratados com Mira (CTR+MIRA) (B), obesos (OB) (C) e obesos tratados com Mira (OB+MIRA) (D). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de  $n=4-7$  camundongos/grupo. <sup>c</sup> $p < 0.05$ , comparado a OB.

### SUMÁRIO DOS EFEITOS DO MIRABEGRON NO SISTEMA CARDIOVASCULAR E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO

PARÂMETRO	CTR+MIRA	OB+MIRA
Pressão arterial caudal	↔	↔
Frequência cardíaca	↔	↔
Contração à 5-HT (PVAT+)	↔	↑
Contração à 5-HT (PVAT)	↔	↔
Relaxamento à ACh (PVAT+)	↔	↔
Relaxamento à ACh (PVAT-)	↔	↔
Expressão de UCP1 no PVAT	↔	↑
Expressão de TNF- $\alpha$ no PVAT	↔	↔
Tolerância ao esforço	↔	↔

### 6.3.6 DISCUSSÃO: EFEITOS DO MIRABEGRON SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E TOLERÂNCIA AO ESFORÇO

O Mira é uma droga aprovada pelo FDA e já encontra-se no mercado para o tratamento de bexiga hiperativa, sem comprovação de eventos adversos no sistema cardiovascular. Em nosso estudo, utilizamos doses mais elevadas da droga em comparação com a que encontra-se disponível para uso humano para tratamentos de distúrbios do sistema urinário. Ainda assim, não encontramos alterações na pressão arterial caudal e na frequência cardíaca em resposta ao tratamento com Mira por duas semanas. No entanto, o estudo de Cypess (2015), mostrou aumento da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica usando uma única dose de 200mg em voluntários jovens magros (n=12). Apesar de já ter sido demonstrado a existência de  $\beta_3$ -AR em vasos e que sua ativação causa vasodilatação e cronotropismo positivo reflexo (TROCHU et al., 1999), a possibilidade desse composto produzir respostas na pressão arterial e frequência cardíaca pode ser reduzida devido a perda de sua seletividade em altas doses. Assim, diferentes doses e com efeito mais prolongado devem ser testadas para confirmar a ausência de efeitos no sistema cardiovascular e manutenção nos efeitos metabólicos desejados.

Avaliamos também os efeitos do Mira na resposta a um teste de exaustão em esteira. A administração de Mira por 2 semanas não causou modificações na tolerância ao esforço de teste agudo de velocidade incremental até a exaustão de camundongos controles e obesos. Esses achados mostram que o aumento de peso piora a performance do animal sem qualquer interferência do agonista  $\beta_3$ -AR sobre esse parâmetro.

Sabe-se que o PVAT possui importante função fisiológica na reatividade vascular, devido à sua ação anticontrátil, e sua retirada intensifica a resposta contrátil a diferentes agonistas (GAO et al., 2007). Trabalhos prévios tem mostrado que o PVAT produz diversas substâncias, entre elas o NO, ROS, citocinas e adiponectina (AGHAMOHAMMADZADEH, HEAGERTY 2012; SZASZ, WEBB, 2012). Por outro lado, evidências mostram que na obesidade há perda da função anticontrátil do PVAT devido a liberação aumentada de fatores pró-inflamatórios e oxidativos (GIL-ORTEGA et al., 2010; FERNÁNDEZ-AFONSO et al., 2013; VAN DE VOORDE et al., 2014). No entanto, em nosso estudo os anéis de aorta de animais obesos não apresentaram alterações da resposta contrátil à 5-HT. Por outro lado, a associação obesidade com o tratamento com Mira por duas semanas potencializou a resposta

contrátil (Emax) para a 5-HT em anéis de aorta com PVAT (grupo OB+MIRA PVAT+), mostrando que essa associação provoca a liberação de fatores que exacerbam a resposta contrátil, considerando que a retirada do PVAT aboliu completamente esse aumento da resposta contrátil. Apesar de encontrarmos expressão aumentada do fator pró-inflamatório TNF- $\alpha$  no TAM como um efeito do tratamento com Mira, esse resultado não foi encontrado no PVAT. Contudo, a expressão de UCP1 está aumentada no grupo OB+MIRA comparado ao seu respectivo controle. Desse modo, mais estudos são necessários para investigar se há alguma associação entre a ativação do PVAT por agonistas  $\beta$ 3-AR e aumento da resposta contrátil à 5-HT. Mais recentemente, foi demonstrado que o PVAT produz catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) em aorta torácica e artéria mesentérica de ratos (AYALA-LOPEZ et al., 2014, AYALA-LOPEZ, WATTS, 2017). Em aorta, a produção de noradrenalina pelo PVAT é mais proeminente e independente de inervação simpática (AYALA-LOPEZ et al., 2014). Baseado nesses trabalhos, pode-se inferir que a maior resposta contrátil de anéis de aorta de camundongos obesos e tratados com Mira por duas semanas à 5-HT possa estar relacionada à maior liberação de catecolaminas do PVAT pela ativação  $\beta$ -adrenérgica, potencializando assim os efeitos da 5-HT.

Em relação ao relaxamento à ACh, observamos que a obesidade, independente do tratamento com Mira, provocou redução significativa na resposta relaxante de anéis de aorta na presença do PVAT. Esses dados, mostram que há fatores liberados pelo PVAT de animais obesos que podem estar reduzindo a ação dos agentes vasodilatadores derivados do endotélio na musculatura lisa vascular, reduzindo a biodisponibilidade do NO e atenuando a resposta relaxante. De fato, estudos anteriores mostram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica resulta na liberação de adipocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, dentre outros fatores que podem atenuar a resposta relaxante derivada do endotélio (CHATTERJEE et al., 2009; GREENSTEIN et al., 2009; VAN DAM et al., 2017). Esses dados são confirmados quando retiramos o PVAT desses anéis, e essa atenuação da resposta relaxante à ACh é abolida.

Estudo recente mostrou que em artéria mesentérica, a inibição dos  $\beta$ 3-AR resultou em perda da função anticontrátil do PVAT em camundongos saudáveis (SAXTON et al., 2016) e isso ocorre pela redução da liberação de NO. No entanto, esse efeito foi perdido em camundongos obesos e a utilização do agonista CL 316,243 não restaurou a função anticontrátil, a qual só ocorreu pela ativação da NOS. Um estudo



mostrou que a exposição crônica ao frio de camundongos *knockout* para apoE (tornando-os hipercolesterolêmicos) resultou em ativação do PVAT na região da aorta de camundongos, o que resultou em melhora da função relaxante à ACh devido a liberação do agente vasodilatador prostaciclina (CHANG et al., 2012).

## **CONCLUSÕES**

Em camundongos obesos, o tratamento com Mirabegron por duas semanas resultou em modificação histológica dos tecidos adiposos marrom, inguinal e pervascular, além de aumento do gasto energético, com consequente melhora do perfil lipídico e glicêmico, além de reduzir sistemicamente o marcador de estresse oxidativo TBARS e o fator pró-inflamatório TNF- $\alpha$ , evidenciando um efeito metabólico benéfico.

Por outro lado, a associação obesidade e tratamento com Mira potencializou a resposta contrátil à 5-HT em anéis de aorta na presença de tecido adiposo perivascular, sem mudanças nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca.

## **LIMITAÇÃO**

Considerando os mecanismos de controle da pressão arterial, outros leitos vasculares devem ser estudados para melhor avaliação dos efeitos do Mira sobre os fatores liberados pelo PVAT em animais obesos.

## REFERÊNCIAS

- ABELLA, V., SCOTECE, M., CONDE, J., PINO, J., GONZALEZ-GAY, M.A., GÓMEZ-REINO, J.J., MERA, A., LAGO, F., GÓMEZ, R., GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nat Rev Rheumatol**. v. 13, n. 2, p. 100-9, Fev. 2017
- ADIELS, M., TASKINEN, M.R, BORÉN, J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. **Curr Diab Rep**. v. 8, n.1, p. 60-4. Fev. 2008
- AGHAMOHAMMADZADEH, R., HEAGERTY, A.M. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. **Ann Med**. v. 1, p. s74-84, Jun. 2012
- AHIMA, R.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring)**. v.14, n.5, p. 242S-249S, Ago. 2006
- AHIMA, R.S., FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**. v. 11, n.8, p. 327-32, Out. 2000
- AHLQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **American journal of physiology**. v. 153, n.3, p. 586-600. Jun 1948
- ALLEN, S.L., BEECH, D.J., FOSTER, R.W, MORGAN, G.P, Small RC Electrophysiological and other aspects of the relaxant action of isoprenaline in guinea-pig isolated trachealis. **Br J Pharmacol** v.86, p. 843-54, Dez. 1985.
- ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. v.19, n.4, p. 471-82, Dez. 2005
- ARNER, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. **Trends Endocrinol Metab**. v. 14, n.3, p. 137-45, Abr. 2003
- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., BRICHARD, S., RENCUREL, F., CUSIN, I., JEANRENAUD, B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. **Metabolism**. v.44, n.2, p. 228-33, Fev. 1995
- AYALA-LOPEZ, N., WATTS, S.W. New actions of an old friend: perivascular adipose tissue's adrenergic mechanisms. **Br J Pharmacol**. v. 174, n.40, p. 3454-65, Out. 2017
- AYALA-LOPEZ, N., MARTINI, M., JACKSON, W.F, DARIOS, E., BURNETT, R., SEITZ, B., FINK, G.D., WATTS, S.W. Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. **Pharmacol Res Perspect**. v. 2, n.3, p. e00041, Jun. 2014
- BALISTRERI, C.R., CARUSO, C., CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators Inflamm**. 2010

BARBE, P., MILLET, L., GALITZKY, J., et al. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3 adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 907–913, Mar. 1996.

BARTELT, A., BRUNS, O.T., REIMER, R., HOHENBERG, H., ITTRICH, H., PELDSCHUS, K., KAUL, M.G., TROMSDORF, U.I., WELLER, H., WAURISCH, C., EYCHMÜLLER, A., GORDTS, P.L., RINNINGER, F., BRUEGELMANN, K., FREUND, B., NIELSEN, P., MERKEL, M., HEEREN, J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nat Med**. v. 17, n. 2, p. 200-5, Fev. 2011.

BARTELT, A., HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nat Ver Endocrinol**. v. 10, n.1, p. 24-36, Jan. 2014

BAYS, H. Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. v. 21, n.5, p. 345-51, Out. 2014

BERBÉE, J.F., BOON, M.R., KHEDOE, P.P., BARTELT, A., SCHLEIN, C., WORTHMANN, A., KOOIJMAN, S., HOEKE, G., MOL, I.M., JOHN, C., JUNG, C., VAZIRPANAH, N., BROUWERS, L.P., GORDTS, P.L., ESKO, J.D., HIEMSTRA, P.S., HAVEKES, L.M., SCHEJA, L., HEEREN, J., RENSEN, P.C. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. **Nat Commun**. v. 6, p. 6356, Mar. 2015

BERMAN, D.M., NICKLAS, B.J., ROGUS, E.M., DENNIS, K.E., GOLDBERG, A.P. Regional differences in adrenoceptor binding and fat cell lipolysis in obese, postmenopausal women. **Metabolism**. v.47, n.4, p. 467-73, Abr. 1998.

BJÖRNTORP, P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord**. V.20, n.4, p. 291-302, Abr. 1996

BLAAK, E. Gender differences in fat metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.4, n.6, p. 499-502, Nov. 2001

BONAVENTURA, D., LUNARDI, C.N., RODRIGUES, G.J., NETO, M.A., BENDHACK L,M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**.v.18, n.4, p. 287-95, Jun. 2008.

BOO, Y.C., SORESCU, G.P., BAUER, P.M., FULTON, D., KEMP, B.E., HARRISON, D.G., SESSA, W.C., JO, H. Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. **Free Radic Biol Med**. v.35, n.7, p. 729-41, Out. 2003.

BORECKY, J., MAIA, I.G., ARRUDA, P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. **Biosci Rep**. v. 21, p. 201–212, Abr. 2001.

BOUILLAUD, F., RICQUIER, D., THIBAUT, J., WEISSENBACH, J. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the

mitochondrial uncoupling protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 82, n. 2, p. 445-8, Jan. 1985.

BRANDT, K., GEARY, N., LANGHANS, W., LEONHARDT, M. Mercaptoacetate fails to block the feeding-inhibitory effect of the beta3-adrenergic receptor agonist CGP 12177A. **Physiol Behav.** v. 89, n.2, p. 128-32, Set. 2006

BRONNIKOV, G., BENGTSSON, T., KRAMAROVA, L., GOLOZOUBOVA, V., CANNON, B., NEDERGAARD, J. Beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. **Endocrinology.** v.140, n.9, p. 4185-97, Set. 1999

BROOKS, G.A., WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol.** v.45, n.6, p.1009-1015, Dez. 1978 .

BROWN, N.K., ZHOU, Z., ZHANG, J., ZENG, R., WU, J., EITZMAN, D.T., CHEN, Y.E., CHANG, L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.34, n.8, p. 1621-30, Ago. 2014

BRUNT, E.M., WONG, V.W., NOBILI, V., DAY, C.P., SOOKOIAN, S., MAHER, J.J., BUGIANESI, E., SIRLIN, C.B., NEUSCHWANDER-TETRI, B.A., RINELLA, M.E. Nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Rev Dis Primers.** v. 1, p. 15080, Dez. 2015

CALMASINI, F.B., DE OLIVEIRA, M.G., ALEXANDRE, E.C., DA SILVA, F.H., DA SILVA, C.P.V., CANDIDO, T.Z., ANTUNES, E., MÓNICA, F.Z. Long-term treatment with the beta-3 adrenoceptor agonist, mirabegron ameliorates detrusor overactivity and restores cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in obese mice. **Neurourol Urodyn.** v. 36, n. 6, p. 1511-1518, Ago. 2017

CANNON, B., NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev.** v. 84, n.1, p. 277-359, Jan. 2004.

CARVALEIRA, J.B., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia.** v.46, n.4, p. 419-25, 2002

CHANG L, VILLACORTA L, LI R, HAMBLIN M, XU W, DOU C, ZHANG J, WU J, ZENG R, CHEN YE. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. **Circulation.**v.126, n. 9, p. 1067-1078, Ago. 2012

CHATTERJEE TK, STOLL LL, DENNING GM, HARRELSON A, BLOMKALNS AL, IDELMAN G, ROTHENBERG FG, NELTNER B, ROMIG-MARTIN SA, DICKSON EW, RUDICH S, WEINTRAUB NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. **Circ Res.** v.104, n.4, p. 541-9, Fev. 2009

CHEN, B., LAM, K.S., WANG, Y., WU, D., LAM, M.C., SHEN, J., WONG, L., HOO, R.L., ZHANG, J., XU, A. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** v.341, n.2, p. 549-56, Mar. 2006

CHEN, H.Y., LIU, Q., SALTER, A.M., LOMAX, M.A. Synergism between cAMP and PPAR $\gamma$  Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. **PPAR Res.** Mar. 2013

CHERNOGUBOVA, E., CANNON, B., BENGTSSON, T. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. **Endocrinology.** v. 145, n.1, p. 269-80, Jan. 2004

COMMINS, S.P., MARSH, D.J., THOMAS, S.A., WATSON, P.M., PADGETT, M.A., PALMITER, R., GETTYS, T.W. Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue. **Endocrinology.** v.140, n.10, p. 4772-8, Oct. 1999

COULTER, A.A., BEARDEN, C.M., LIU, X., KOZA, R.A., KOZAK, L.P. Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of Pgc-1 alpha and Ucp1 during conversion of white to brown fat. **Physiol Genomics.** v. 14, n.2, p. 139-47, Jul. 2003

CUI, H., LÓPEZ, M., RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nat Rev Endocrinol.** v.13, n.6, p. 338-51, Jun. 2017

CUSI, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. **Gastroenterology.** v. 142, n.4, p. 711-25, Apr. 2012

CYPESS, A.M., LEHMAN, S., WILLIAMS, G., TAL, I., RODMAN, D., GOLDFINE, A.B., KUO, F.C., PALMER, E.L., TSENG, Y.H., DORIA, A., KOLODNY, G.M., KAHN, C.R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med.** v. 360, n.15, p. 1509-17, Apr. 2009.

CYPESS, A.M., WEINER, L.S., ROBERTS-TOLER, C., FRANQUET ELÍA, E., KESSLER, S.H., KAHN, P.A., ENGLISH, J., CHATMAN, K., TRAUGER, S.A., DORIA, A., KOLODNY, G.M. Activation of human brown adipose tissue by a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist. **Cell Metab.** v. 21, n.1, p. 33-8, Jan. 2015

DAVIS, E., LOIACONO, R., SUMMERS, R.J. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. **Br J Pharmacol.** v.154, n.3, p. 584-97, Jun. 2008

DE SOUZA, C.J., BURKEY, B.F. Beta 3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. **Curr Pharm Des.** v.7, n.14, p. 1433-49, Set. 2001.

DESSY C, BALLIGAND JL. Beta3-adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues emerging concepts and therapeutic perspectives. **Adv Pharmacol.** v. 59, p. 135-63, Fev. 2010.

DESSY, C., MONIOTTE, S., GHISDAL, P., HAVAUX, X., NOIRHOMME, P., BALLIGAND, J.L. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. **Circulation**. v.110, n.8, p. 948-54, Ago. 2004.

DI MEO, S., IOSSA, S., VENDITTI, P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. **J Endocrinol**. v. 233, n. 1, p. R15-42, Abr. 2017

DONNELLY, K.L., SMITH, C.I., SCHWARZENBERG, S.J., JESSURUN, J., BOLDT, M.D., PARKS, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**. v. 115, n. 5, p. 1343-51, Mai. 2005

EASON, M.G., KUROSE, H., HOLT, B.D., RAYMOND, J.R., LIGGETT, S.B. Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. **J Biol Chem**. v.267, n.22, p. 15785-801, Ago. 1992

ELTINK, C., LEE, J., SCHADDELEE, M., ZHANG, W., KERBUSCH, V., MEIJER, J., VAN MARLE, S., GRUNENBERG, N., KOWALSKI, D., DROGENDIJK, T., MOY, S., IITSUKA, H., VAN GELDEREN, M., MATSUSHIMA, H., SAWAMOTO, T. Single dose pharmacokinetics and absolute bioavailability of mirabegron, a  $\beta_3$  adrenoceptor agonist for treatment of overactive bladder. **Int J Clin Pharmacol Ther**. v. 50, n. 11, p. 838-50, Nov. 2012

EMILSSON, V., SUMMERS, R.J., HAMILTON, S., LIU, Y.L., CAWTHORNE, M.A. The effects of the beta3-adrenoceptor agonist BRL 35135 on UCP isoform mRNA expression. **Biochem Biophys Res Commun**. 1998

EMORINE, L.J., MARULLO, S., BRIEND-SUTREN, M.M., PATEY, G., TATE, K., DELAVIER-KLUTCHKO, C., STROSBURG, A.D. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. **Science**. v. 245, n.4922, p. 1118-21, Set. 1989

FEDORENKO, A., LISHKO, P.V., KIRICHOK, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. **Cell**. v. 151, n. 2, p. 400-13, Out. 2012.

FERNÁNDEZ-AFONSO MS, GIL-ORTEGA M, GARCÍA-PRIETO CF, ARANGUEZ I, RUIZ-GAYO M, SOMOZA B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **Int J Endocrinol** Nov. 2013

FERRANTE, A.W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J Intern Med**. v.262, n.4, p.408-14, Out. 2007

FERRÉ, P., FOUFELLE, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. **Horm Res**. v. 68, n.2, p. 72-82, Nov. 2007

FITZGIBBONS TP, CZECH MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. **J Am Heart Assoc.**v.3, n.2, p.e000582, Mar. 2014

FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ALONSI-VALE, M.I.C., LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Endocrinol Metab.** v. 50, n. 2, Abr. 2006

FÖRSTERMANN, U., SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.**v.33. n.7, p. 829-37, Abr. 2012.

FRAYN, K. N., KARPE, F., FIELDING, B.A., MACDONALD, I.A., COPPACK, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 27, n.8, p. 875-88, Ago. 2003

FREDERICH, R.C., HAMANN, A., ANDERSON, S., LÖLLMANN, B., LOWELL, B.B., FLIER, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med.** v.1, n.12, p.1311-4, Dez. 1995

FRONTINI, A., CINTI, S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell Metab.** v. 11, p. 253–56, Abr. 2010.

FU, L., ISOBE, K., ZENG, Q., SUZUKAWA, K., TAKEKOSHI, K., KAWAKAMI, Y. The effects of beta(3)-adrenoceptor agonist CL-316,243 on adiponectin, adiponectin receptors and tumor necrosis factor-alpha expressions in adipose tissues of obese diabetic KKAy mice. **Eur J Pharmacol.** v. 584, n. 1, p. 202-6, Abr. 2008

FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** v.288, p. 373-6, Jul. 1980.

GALIC, S., OAKHILL, J.S., STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol.** v.316, n.2, p.129-39, Mar. 2010

GAO, Y.J., LU, C., SU, L.Y., SHARMA, A.M., LEE, R.M. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br J Pharmacol.** v.151, n.3, p. 323-31, Jun. 2007

GHORBANI, M., TEIMOURIAN, S., FARZAD, R., ASL, N.N. Apparent histological changes of adipocytes after treatment with CL 316,243, a  $\beta$ -3-adrenergic receptor agonist. **Drug Des Devel Ther.** v. 9, p. 669-76, Fev. 2015

GIL-ORTEGA M, STUCCHI P, GUZMÁN-RUIZ R, CANO V, ARRIBAS S, GONZÁLEZ MC, RUIZ-GAYO M, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS, SOMOZA B. Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. **Endocrinology.** V.151, n.7, p. 3299-306, Jul. 2010.



GINSBERG, H.N., ZHANG, Y.L., HERNANDEZ-ONO, A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. **Arch Med Res.** v. 36, n. 3, p. 232-40, Mai. 2005

GOODPASTER, B.H., WOLF, D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 5, n.4, p. 219-26, Dez. 2004

GORDON, C.J. Relationship between preferred ambient temperature and autonomic thermoregulatory function in rat. **Am J Physiol.** v. 252, n. 6, p. R1130-7, Jun. 1987

GORDON, C.J. The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. **Physiol Behav.** v. 179, p. 55-66, Out. 2017 1;179:55-66.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav.** v. 47, n. 5, p. 963-91, Mai. 1990

GRANNEMAN JG, LAHNERS KN, CHAUDHRY A. Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. **Mol Pharmacol.** v.44, n.2, p. 264-70, Ago. 1993

GREENSTEIN, A.S., KHAVANDI, K., WITHERS, S.B., SONOYAMA, K., CLANCY, O., JEZIORSKA, M., LAING, I., YATES, A.P., PEMBERTON, P.W., MALIK, R.A., HEAGERTY, A.M. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. **Circulation.** v. 119, n. 12, p. 1661-70, Mar. 2009

GUILHERME, A., VIRBASIOUS, J.V., PURI, V., CZECH, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 9, n.5, p. 367-77, Mai. 2008

GUYTON, A.C., HALL, J.E. Tratato de fisiologia médica. Ed. Elsevier. 12ª edição. 2011

HAGENFELDT, L. WAHREN, J., PERNOW, B., RAF, L. Uptake of individual free fatty acids by skeletal muscle and liver in man. **J Clin Invest.** v.51, n.9, p. 2324-2330, Set. 1972

HAINER, V. Beta3-adrenoreceptor agonist mirabegron - a potential antiobesity drug? **Expert Opin Pharmacother.** v.17, n.6, p. 2125-27, Nov. 2016

HAN, T.S., VAN LEER, E.M., SEIDELL, J.C., LEAN, M.E. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. **BMJ.** v. 311, n. 7017, p. 1401-5, Nov. 1995

HANY, T.F., GHAREHPAPAGH, E., KAMEL, E.M., BUCK, A., HIMMS-HAGEN, J., VON SCHULTHESS, G.K. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** v.29, n. 10, p. 1393-8, Out. 2002

HARTZELL, H.C. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 52, p. 165-247, Mai. 1988

HIMMS-HAGEN, J., CUI, J., DANFORTH, E.J.R., TAATJES, D.J., LANG, S.S., WATERS, B.L., CLAUS, T.H. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 266, p. R1371–R1382, Abr. 1994.

HIMPENS, B., MISSIAEN, L., CASTEELS, R. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in vascular smooth muscle. **J Vasc Res**. v.32, n.4, p. 207-19, Jul. 1995.

HUBE, F., LIETZ, U., IGEL, M., JENSEN, P.B., TORNVIST, H., JOOST, H.G., HAUNER, H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. **Horm Metab Res**. v. 28, n. 12, p. 690-3, Dez. 1996

IITSUKA, H., VAN GELDEREN, M., KATASHIMA, M., TAKUSAGAWA, S., SAWAMOTO, T. Pharmacokinetics of Mirabegron, a  $\beta$ 3-Adrenoceptor Agonist for Treatment of Overactive Bladder, in Healthy East Asian Subjects. **Clin Ther**. v. 37, n. 5, p. 1031-44, Mai. 2015

IITSUKA, H., VAN GELDEREN, M., KATASHIMA, M., TAKUSAGAWA, S., SAWAMOTO, T. JIANG, S.Z., LU, W., ZONG, X.F., RUAN, H.Y., LIU, Y. Obesity and hypertension. **Exp Ther Med**. v.12, n.4, p. 2395-2399, Out. 2016

KADOWAKI, T., YAMAUCHI, T., KUBOTA, N., HARA, K., UEKI, K., TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**. v. 116, n. 7, p. 1784-92, Jul. 2006

KAJIMURA, S., SAITO, M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. **Annu Rev Physiol**. v. 76, p. 225-49, Nov. 2014.

KERSHAW, E.E., FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. v.89, n.6, p. 2548-56, Jun. 2004

KERSTEN, S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. **Biochim Biophys Acta**. v. 1841, n. 7, p. 919-33, Jul. 2014

KIM, S.N., JUNG, Y.S., KWON, H.J., SEONG, J.K., GRANNEMAN, J.G., LEE, Y.H. Sex differences in sympathetic innervation and browning of white adipose tissue of mice. **Biol Sex Differ**. v. 7, p. 67, Dez. 2016

KIRSTEIN, S.L., INSEL, P.A. Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. **Pharmacol Rev**. v. 56, n.1, p. 31-52, Mar. 2004

KOLDITZ, C.I., LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 13, n.4, p. 377-81, Jul. 2010

KORHONEN, T., SAARELA, S. Role of adiposity hormones in the mouse during fasting and winter-acclimatization. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 140, n. 2, p. 217-23, Fev. 2005

KOTRONEN, A., VEHKAVAARA, S., SEPPÄLÄ-LINDROOS, A., BERGHOLM, R., YKI-JÄRVINEN, H. Effect of liver fat on insulin clearance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 293, n. 9, p. E1709-15, Dez. 2007

KOZA, R.A., HOHMANN, S.M., GUERRA, C., ROSSMEISL, M., KOZAK, L.P. Synergistic gene interactions control the induction of the mitochondrial uncoupling protein (*Ucp1*) gene in white fat tissue. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 34486-92, Nov. 2000.

KRAVTSOV, G.M., HWANG, I.S., TANG, F. The inhibitory effect of adrenomedullin in the rat ileum: cross-talk with beta3-adrenoceptor in the serotonin-induced muscle contraction. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 308, n. 1, p. 241-8, Jan. 2004.

KURYSZKO, J., SŁAWUTA, P., SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Pol J Vet Sci.** v. 19, n.2, p. 441-6, Dez. 2016

LAFONTAN, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. **Diabetes Metab.** v.40, n.1, p. 16-28, Fev. 2014

LAFONTAN, M., LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Prog Lipid Res.** v. 48, n. 5, p. 275-97, Set. 2009

LANDS, A.M., A. ARNOLD, J.P. MCAULIFF, F.P. LUDUENA AND T.G. BROWN, JR., Differentiation of receptors activated by sympathomimetic amines, **Nature.** v. 214 n. 597. Abr. 1967

LANTHIER, N., LECLERCQ, I.A. Adipose tissues as endocrine target organs. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v. 28, n. 4, p. 545-58, Ago. 2014

LEE, Y.H., KIM, S.N., KWON, H.J., GRANNEMAN, J.G. Metabolic heterogeneity of activated beige/brite adipocytes in inguinal adipose tissue. **Sci Rep.** v. 7, p. 39794, Jan. 2017

LEE, Y.H., PETKOVA, A.P., MOTTILLO, E.P., GRANNEMAN, J.G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta_3$  adrenoceptor activation and high-fat feeding. **Cell Metab.** v. 15, n.4, p. 480-91, Abr. 2012

LEHNINGER, NELSON, D.L., COX, M.M., Princípios de bioquímica. Ed Sarvier. 4ª edição, 2007.

LEIRIA LO, SOLLON C, CALIXTO MC, LINTOMEN L, MÓNICA FZ, ANHÊ GF, DE NUCCI G, ZANESCO A, GRANT AD, ANTUNES E. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. **PLoS One.**v.7, n.11, p. e48507, Nov. 2012.

LI, H., MATHENY, M., SCARPACE, P.J. Beta 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. *Am J Physiol.* v. 272, p. E1031–6, Jun. 1997.

LÖHN, M., DUBROVSKA, G., LAUTERBACH, B., LUFT, F.C., GOLLASCH, M., SHARMA, A.M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* v. 16, n.9, p. 1057-63, Jul. 2002

LUO, L., LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol.* v. 231, n. 3, p. R77-R99, Dez. 2016

LUO, X., JIA, R., ZHANG, Q., SUN, B., YAN, J.. Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice. *Int J Mol Sci.* v. 23, n. 17, Mai. 2016

LYNCH, G.S., RYALL, J.G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev.* v. 88, n. 2, p. 729-67, Abr. 2008

LYNES, M.D., LEIRIA, L.O., LUNDH, M., BARTELT, A., SHAMSI, F., HUANG, T.L., TAKAHASHI, H., HIRSHMAN, M.F., SCHLEIN, C., LEE, A., BAER, L.A., MAY, F.J., GAO, F., NARAIN, N.R., CHEN, E.Y., KIEBISH, M.A., CYPESS, A.M., BLÜHER, M., GOODYEAR, L.J., HOTAMISLIGIL, G.S., STANFORD, K.I., TSENG, Y.H. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nat Med.* v. 23, n. 11, p. 1384, Nov. 2017

MAEDA, N., FUNAHASHI, T., SHIMOMURA, I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* v.4, n.11, p. 627-34, Nov. 2008

MANN, J., TRUSWELL, A.S. Essentials of Human Nutrition. Oxford University Press 2 ed, New York. 2009

MATSUSHITA, M., YONESHIRO, T., AITA, S., KAMEYA, T., SUGIE, H., SAITO, M. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond).* v. 38, n. 6, p. 812-7, Jun. 2014

MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F., TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* v. 28, n. 7, p. 412-9, Jul. 1985

MAURIÈGE, P., IMBEAULT, P., LANGIN, D., LACAILLE, M., ALMÉRAS, N., TREMBLAY, A., DESPRÉS, J.P. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *J Lipid Res.* v.40, n.9, p. 1559-71, Set. 1999

MIYOSHI, H., NAKAYA, Y. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 193, n. 1, p. 240-7, Mai. 1993.

MOHELL, N., DICKER, A. The  $\beta$ 3-adrenergic radioligand [3H]CGP- 12177, generally classified as an antagonist, is a thermogenic agonist in brown adipose tissue. **Biochem J.** v. 261, p. 401–405, Jun. 1989.

MONTAGUE, C.T., PRINS, J.B., SANDERS, L., ZHANG, J., SEWTER, C.P., DIGBY, J., BYRNE, C.D., O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes.** v.47, n.9, p. 1384-91, Set. 1998

MONTEIRO, C.A., MONDINI, L., SOUZA, A.L.M., POPKIN, B.M. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: MONTEIRO, C.A. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. São Paulo: Hucitec, 1995. p.247-55

MÖSSENBÖCK, K., VEGIOPOULOS, A., ROSE, A.J., SIJMONSMA, T.P., HERZIG, S., SCHAFMEIER, T. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. **PLoS One.** v. 9, n.10, p. e110428, Out. 2014.

MOTTILLO, E.P., BALASUBRAMANIAN, P., LEE, Y.H., WENG, C., KERSHAW, E.E., GRANNEMAN, J.G. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation. **J Lipid Res.** v. 55, n. 11, p. 2276-86, Nov. 2014

MORAK, M., SCHMIDINGER, H., RIESENHUBER, G., RECHBERGER, G.N., KOLLROSER, M., HAEMMERLE, G., ZECHNER, R., KRONENBERG, F., HERMETTER, A. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. **Mol Cell Proteomics.** v.11, n.12, p. 1777-89, Dez. 2012

MORETTI, C., LANZOLLA, G., MORETTI, M., GNESSI, L., CARMINA, E. Androgens and Hypertension in Men and Women: a Unifying View. **Curr Hypertens Rep.** v.19, n.5, p. 44, Mai. 2017

MUND, R.A., FRISHMAN, W.H. Brown adipose tissue thermogenesis:  $\beta$ 3 adrenoreceptors as a potential target for the treatment of obesity in humans. **Cardiol Rev.** v. 21, n.6, p. 265-9, Nov. 2013

NEDERGAARD, J., BENGTSSON, T., CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 293, n. 2, p. E444-52, Ago. 2007.

NEDERGAARD, J., CANNON, B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. **Cell Metab.** v. 20, n. 3, p. 396-407, Set. 2014 Sep 2;20(3):396-407.

NEDERGAARD, J., CANNON, B. UCP1 mRNA does not produce heat. **Biochim. Biophys.** v. 1831, p. 943–49, Mai. 2013.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Med.** v. 15, n. 1, p. 45, Fev. 2017

- NGUYEN, N.L., RANDALL, J., BANFIELD, B.W., BARTNESS, T.J. Central sympathetic innervations to visceral and subcutaneous white adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 306, n.6, p. R375-86, Mar. 2014.
- OKAMATSU-OGURA, Y., NIO-KOBAYASHI, J., IWANAGA, T., TERAOKA, A., KIMURA, K., SAITO, M. Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 236, n. 11, p. 1274-81, Nov. 2011
- OMACHI, A., ISHIOKA, K., UOZUMI, A., KAMIKAWA, A., TODA, C., KIMURA, K., SAITO, M. Beta3-adrenoceptor agonist AJ-9677 reduces body fat in obese beagles. **Res Vet Sci**. v. 83, n. 1, p. 5-11, Ago. 2007
- OMAR, A., CHATTERJEE, T.K., TANG, Y., HUI, D.Y., WEINTRAUB, N.L. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.34, n. 8, p. 1631-6, Ago. 2014
- PADILLA J, JENKINS NT, VIEIRA-POTTER VJ, LAUGHLIN MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 304, n. 7, p. R543-52, Abr. 2013
- PAULI, J.R. Obesidade e diabetes: bases moleculares da etiopatogenia, Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular, Sarvier Editora de Livros Médicos. v.1, 2011
- PÉNICAUD, L., COUSIN, B., LELOUP, C., LORSIGNOL, A., CASTEILLA, L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. **Nutrition**. v. 16, n.10, p. 903-8, Out. 2000
- PINKAS, J., GUJSKI, M., WIERZBIŃSKA-STEPNIAK, A., OWOC, A., BOJAR, I. The polymorphism of estrogen receptor  $\alpha$  is important for metabolic consequences associated with menopause. **Endokrynol Pol**. v. 67, n.6, p 608-14, Nov. 2016
- POHER, A.L., VEYRAT-DUREBEX, C., ALTIRRIBA, J., MONTET, X., COLIN, D.J., CAILLON, A., LYAUTEY, J., ROHNER-JEANRENAUD, F. Ectopic UCP1 Overexpression in White Adipose Tissue Improves Insulin Sensitivity in Lou/C Rats, a Model of Obesity Resistance. **Diabetes**. v.64, n.11, p. 3700-12, Nov. 2015
- PROENÇA, A.R., SERTIÉ, R.A., OLIVEIRA, A.C., CAMPAÑA, A.B., CAMINHOTTO, R.O., CHIMIN, P., LIMA, F.B. New concepts in white adipose tissue physiology. **Braz J Med Biol Res**. v. 47, n.3, p. 192-205, Fev. 2014.
- REVELO, X.S., LUCK, H., WINER, S., WINER, D.A. Morphological and inflammatory changes in visceral adipose tissue during obesity. **Endocr Pathol**. v. 25, n.1, p. 93-101, Mar. 2014
- RINELLA, M.E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **JAMA**. v. 313, n. 22, p. 2263-73, Jun. 2015

ROBERTS-TOLER, C., O'NEILL, B.T., CYPESS, A.M. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. **Obesity (Silver Spring)**. v. 23, n. 9, p. 1765-70, Set. 2015

ROBIDOUX, J., CAO, W., QUAN, H., DANIEL, K.W., MOUKDAR, F., BAI, X., FLOERING, L.M., COLLINS, S. Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. **Mol Cell Biol**.v.25, n.13, p. 5466-79, Jul. 2005

ROCHA, V.Z., LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Ver Cardiol**.v. 6, n. 6, p. 399-409, Jun. 2009

ROMERO-CALVO, I., OCÓN, B., MARTÍNEZ-MOYA, P., SUÁREZ, M.D., ZARZUELO, A., MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O., DE MEDINA, F.S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem**. v. 401, n. 2, p. 318-20, Jun. 2010.

ROSENBAUM, M., LEIBEL, R.L. The physiology of body weight regulation: relevance to the etiology of obesity in children. **Pediatrics**. v. 101, n.3, p. 525-39, Mar. 1998

ROZEC, B., GAUTHIER, C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. **Pharmacol Ther**. v.111, n.3, p.652-73, Set. 2006

ROZEC, B., SERPILLON, S., TOUMANIANTZ, G., SÈZE, C., RAUTUREAU, Y., BARON, O., NOIREAUD, J., GAUTHIER, C. Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. **J Am Coll Cardiol**.v.46, n. 2, p. 351-9, Jul. 2005.

SANYAL, A., NAUMANN, J., HOFFMANN, L.S., CHABOWSKA-KITA, A., EHRLUND, A., SCHLITZER, A., ARNER, P., BLÜHER, M., PFEIFER, A. Interplay between Obesity-Induced Inflammation and cGMP Signaling in White Adipose Tissue. **Cell Rep**. v. 18, n.1, p. 225-36, Jan. 2017

SAWA, M., HARADA, H. Recent developments in the design of orally bioavailable beta3-adrenergic receptor agonists. **Curr Med Chem**. v. 13, n.1, p. 25-37, Out. 2006.

SAXTON, S., WITHERS, S., OHANIAN, J. HEAGERTY, A. Yia 03-09 noradrenergic receptor function in healthy and obese perivascular adipose tissue. **J Hypertens**. v. 34, n. 1, Set. 2016

SCHLEIN, C., HEEREN, J. Implications of thermogenic adipose tissues for metabolic health. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. v.30, n. 4, p. 487-96, Ago. 2016

SELBY, J.V., FRIEDMAN, G.D., QUESENBERRY, C.P. JR. Precursors of essential hypertension. The role of body fat distribution pattern. **Am J Epidemiol.** v. 129, n.1, p. 43-53, Jan 1989

SHIRAGA, E.C., Aspectos psicológicos de obesos grau II antes e depois da cirurgia bariátrica. A doença obesidade e a atuação da equipe multidisciplinar no tratamento cirúrgico da obesidade. Ed. Franques & M.S. São Paulo, 2006

SHULMAN, G.I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. **N Engl J Med.** v.371, n. 12, p. 1131-41, Set. 2014

SMITH, U., KAHN, B.B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. **J Intern Med.** v.280, n.5, p. 465-75, Nov. 2016

SMITKA, K., MAREŠOVÁ, D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. **Prague Med Rep.** v.116, n. 2, p. 87-111, 2015

SPIGHI, A., TARTAGNI, E., D'ADDATO, S., DORMI, A., BORGHI, C. Lipid-lowering treatment in patients at high cardiovascular risk discharged from an Italian hospital. **J Cardiovasc Med (Hagerstown).** v. 14, n. 4, p. 270-5, Abr. 2013

SVEDBERG, J., BJÖRNTORP, P., SMITH, U., LÖNNROTH, P. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. **Diabetes.** v. 39, n.5, p. 570-4, Mai. 1990

SYMONDS, M.E., HENDERSON, K., ELVIDGE, L., BOSMAN, C., SHARKEY, D., PERKINS, A.C., BUDGE, H. Thermal imaging to assess age-related changes of skin temperature within the supraclavicular region co-locating with brown adipose tissue in healthy children. **J Pediatr.** v.161, n. 5, p. 892-8, Nov. 2012

SZASZ, T., WEBB, R.C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clin Sci (Lond).** v.122, n.1, p. 1-12, Jan. 2012

TAKASU, T., UKAI, M., SATO, S., MATSUI, T., NAGASE, I., MARUYAMA, T., SASAMATA, M., MIYATA, K., UCHIDA, H., YAMAGUCHI, O. Effect of (R)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} acetanilide (YM178), a novel selective beta3-adrenoceptor agonist, on bladder function. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 321, n. 2, p. 642-7, Mai. 2007

TAKUSAGAWA, S., VAN LIER, J.J., SUZUKI, K., NAGATA, M., MEIJER, J., KRAUWINKEL, W., SCHADDELEE, M., SEKIGUCHI, M., MIYASHITA, A., IWATSUBO, T., VAN GELDEREN, M., USUI, T. Absorption, metabolism and excretion of [(14)C]mirabegron (YM178), a potent and selective  $\beta(3)$ -adrenoceptor agonist, after oral administration to healthy male volunteers. **Drug Metab Dispos.** v. 40, n.4, p. 815-24, Abr. 2012

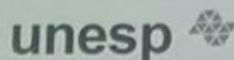
TARTAGLIA, L.A., DEMBSKI, M., WENG, X., DENG, N., CULPEPPER, J., DEVOS, R., RICHARDS, G.J., CAMPFIELD, L.A., CLARK, F.T., DEEDS, J.,



- MUIR, C., SANKER, S., MORIARTY, A., MOORE, K.J., SMUTKO, J.S., MAYS, G.G., WOOL, E.A., MONROE, C.A., TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**. v.83, n.7, p.1263-71, Dez. 1995
- TAVERNIER, G., BARBE, P., GALITZKY, J., BERLAN, M., CAPUT, D., LAFONTAN, M., LANGIN, D. Expression of beta3-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes. **J Lipid Res**.v.37, n.1, p. 87-97, Jan. 1996.
- TCHERNOF, A., LAMARCHE, B., PRUD'HOMME, D., NADEAU, A., MOORJANI, S., LABRIE, F., LUPIEN, P.J., DESPRÉS, J.P. The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. **Diabetes Care**. v. 19, n. 6, p. 629-37, Jun. 1996
- TEMPLEMAN, N.M., SKOVSRØ, S., PAGE, M.M., LIM, G.E., JOHNSON, J.D. A causal role for hyperinsulinemia in obesity. **J Endocrinol**. v. 232, n.3, p. R173-R183, Mar. 2017
- TIRUPPATHI, C., MINSHALL, R.D., PARIA, B.C., VOGEL, S.M., MALIK, A.B. Role of calcium signaling in the regulation of endothelial permeability. **Vasc Pharmacol**, v.39, n.4/5, p. 173-85, Nov. 2002.
- TOLEDO, F.G., GOODPASTER, B.H. The role of weight loss and exercise in correcting skeletal muscle mitochondrial abnormalities in obesity, diabetes and aging. **Mol Cell Endocrinol**. v. 379, n. 1, p. 30-4, Out. 2013
- TOWNSEND, K.L., TSENG, Y.H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. **Trends Endocrinol Metab**. v.25, n.4, p. 168-77, Abr. 2014.
- TROCHU, J.N., LEBLAIS, V., RAUTUREAU, Y., BÉVÉRELLI, F., LE MAREC, H., BERDEAUX A., GAUTHIER, C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. **Br J Pharmacol**. v.128, n.1, p. 69-76, Set. 1999
- TRPKOVIC, A., RESANOVIC, I., STANIMIROVIC, J., RADAK, D., MOUSA, S.A., CENIC-MILOSEVIC, D., JEVREMOVIC, D., ISENOVIC, E.R. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v. 52, n. 2, p. 70-85, Out. 2015
- TSUKUMO, D.M., CARVALHO-FILHO, M.A., CARVALHEIRA, J.B., PRADA, P.O., HIRABARA, S.M., SCHENKA, A.A., ARAÚJO, E.P., VASSALLO, J., CURI, R., VELLOSO, L.A., SAAD, M.J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**. v. 56, n.8, p. 1986-98, Ago. 2007.
- TYAGI, P., TYAGI, V. Mirabegron, a  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist for the potential treatment of urinary frequency, urinary incontinence or urgency associated with overactive bladder. **IDrugs**. v. 13, n. 10, p. 713-22, Out. 2010

- VAN DAM, A.D., BOON, M.R., BERBÉE, J.F.P., RENSEN, P.C.N., VAN HARMELEN, V. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. **Eur J Pharmacol.** v. 816, n. 82-92, Dez. 2017
- VAN DE VOORDE J, BOYDENS C, PAUWELS B, DECALUWÉ K. Perivascular adipose tissue, inflammation and vascular dysfunction in obesity. **Curr Vasc Pharmacol.** v. 12, n. 3, p. 403-11, Mai. 2014
- VAN GAAL, L.F., MERTENS, I.L., DE BLOCK, CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature.** v.444, n.7121, p. 875-80, Dez. 2006
- VIRTANEN, K.A., LIDELL, M.E., ORAVA, J., HEGLIND, M., WESTERGRÉN, R., NIEMI, T., TAITTONEN, M., LAINE, J., SAVISTO, N.J., ENERBÄCK, S., NUUTILA, P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med.** v. 360, n. 15, p. 1518-25, Abr. 2009.
- WANG, G.L., SEMENZA, G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 90, n.9, p. 4304-8, Mai. 1993
- WANG, S, KAMAT, A., PERGOLA, P., SWAMY, A., TIO, F., CUSI, K. Metabolic factors in the development of hepatic steatosis and altered mitochondrial gene expression in vivo. **Metabolism.** v. 60, n. 8, p. 1090-9, Ago. 2011
- WARGENT, E.T., O'DOWD, J.F., ZAIBI, M.S, GAO, D., BING, C., TRAYHURN, P., CAWTHORNE, M.A., ARCH, J.R., STOCKER, C.J. Contrasts between the effects of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein, a putative  $\beta$ 3/2-adrenoceptor agonist and the  $\beta$ 3/2-adrenoceptor agonist BRL35135 in C57Bl/6 (ob/ob) mice. **J Endocrinol.** v. 216, n. 2, p. 157-68, Jan. 2013
- WARNER, A., KJELLSTEDT, A., CARRERAS, A., BÖTTCHER, G., PENG, X.R., SEALE, P., OAKES, N., LINDÉN, D. Activation of  $\beta$ 3-adrenoceptors increases in vivo free fatty acid uptake and utilization in brown but not white fat depots in high-fat-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 311, n. 6, p. E901-10, Dez. 2016
- WERSTIUK, E.S., LEE, R.M. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. **Can J Physiol Pharmacol** v. 78, p. 433-52, Jun. 2000
- WHITE, P.A., CERCATO, L.M., ARAUJO, J.M., SOUZA, L.A., SOARES, A.F., BARBOSA, A.P., NETO, J.M., MARCAL, A.C., MACHADO, U.F., CAMARGO, E.A., SANTOS, M.R., BRITO, L.C. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. **Arq Bras Endocrinol Metabol** v. 57, n.5, p. 339-45, 2013.
- WU, C., CHENG, W., SUN, Y., DANG, Y., GONG, F., ZHU, H., LI, N., LI, F., ZHU, Z. Activating brown adipose tissue for weight loss and lowering of blood glucose levels: a microPET study using obese and diabetic model mice. **PLoS One.** v. 9, n. 12, p. e113742, Dez. 2014

- XIAO, C., GOLDFOG, M., GAVRILOVA, O., REITMAN, M.L. Anti-obesity and metabolic efficacy of the  $\beta$ 3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22°C. **Obesity (Silver Spring)**. v. 23, n. 7, p. 1450-9, Jul. 2015
- YOKOZAWA, T., NAKAGAWA, T., KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **J Agric Food Chem**. v. 50, n. 12, p. 3549-52, Jun. 2002
- YOSHITOMI, H., YAMAZAKI, K., ABE, S., TANAKA, I. Differential regulation of mouse uncoupling proteins among brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in chronic beta 3 adrenergic receptor agonist treatment. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 253, n. 1, p. 85-91, Dez. 1998
- YUNO, K., ONISHI, Y., ARIMA, A., ZAIZEN, K., AOKI, Y., NAKAGAWA, S., SCHNEIDKRAUT, M.J., MIYAMAE, Y. Effect of mirabegron on plasma gonadotropic and steroidal hormone levels in rats after two weeks of oral administration. **J Toxicol Sci**. v. 39, n. 3, p. 507-14, Jun. 2014.
- ZACHAREWICZ, E., HESSELINK, M.K.C, SCHRAUWEN, P. Exercise counteracts lipotoxicity by improving lipid turnover and lipid droplet quality. **J Intern Med**. 2018
- ZANESCO, A., ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther**. v.114, n.3, p. 307-17, Jun. 2007.
- ZANESCO, A.; PUGA, G. Doenças cardiometabólicas e exercícios físicos. Editora Revinter, 2013.
- ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Anim Sci**. v. 40, n. 2, p. 198-201, Mar. 1990
- ZHAO, J., TIAN, Y., XU, J., LIU, D., WANG, X., ZHAO, B. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats. **Lipids Health Dis**. v. 10, p. 225, Dez. 2011
- ZHAO, J., UNELIUS, L., BENGTSSON, T., CANNON, B., NEDERGAARD, J. Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. **Am J Physiol**. v. 267, n. 4, p. c969-79, Out. 1994
- ZHENG, K.Q., ZHANG, S.Z., HE, Y., ZHANG, L., ZHANG, K.L., HUANG, D.J., SUN, Y. Association between cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and variations in lipid levels in patients with coronary heart disease. **Chin Med J (Engl)**. v.117, n.9, p. 1288-92, Set. 2004
- ZOUHAL, H., LEMOINE-MOREL, S., MATHIEU, M.E., CASAZZA, G.A., JABBOUR, G. Catecholamines and obesity: effects of exercise and training. **Sports Med**. v. 43, n.7, p. 591-600, Jul. 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAL  
CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 02/2015

Instituição: <b>UNESP – IB – CRC</b>	Departamento: Educação Física
Protocolo nº: 0135	Data de Registro CEUA: 09.01.2015
<b>Projeto de Pesquisa:</b> "Efeitos do Mirabegron, um agonista $\beta_3$ adrenérgico seletivo, nas respostas cardiometabólicas de camundongos obesos"	
<b>Subprojeto(s) vinculado(s):</b> "Efeito do tratamento com Mirabegron nas alterações funcionais, bioquímica e moleculares do trato urinário inferior e vasculatura induzidas pela obesidade em camundongos" – Orientanda: Fabíola Monica Taufic Iglesias	

Pesquisador Responsável: ANGELINA ZANESCO

Orientando(a): Carmem Peres Valgas da Silva

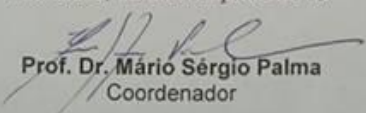
Colaborador(es): Fabíola Monica Taufic Iglesias

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC <input type="checkbox"/> Mestrado <input checked="" type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Outros – (Especificar)
---------------------	---

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **23ª reunião ordinária**, realizada em **18/03/2015**:

<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Aprovou</b> o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que <b>atendidas as pendências</b> apontadas na reunião (vide anexo), <b>aprova</b> o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	<b>Referendou</b> o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou <b>retornar</b> ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	<b>Não Aprovou</b> .
<input type="checkbox"/>	<b>Retirou</b> , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 18 de março de 2015.

  
**Prof. Dr. Mário Sérgio Palma**  
Coordenador

