

ALANA ALMEIDA FELIX

EFEITO DOS INIBIDORES DO CO-TRANSPORTADOR DE SÓDIO-GLICOSE DO TIPO 2  
SOBRE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOCITÁRIA DE CÉLULAS DO ESTROMA VASCULAR DO  
TECIDO ADIPOSEO HUMANO

BRASÍLIA

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALANA ALMEIDA FELIX

EFEITO DOS INIBIDORES DO CO-TRANSPORTADOR DE SÓDIO-GLICOSE DO TIPO 2  
SOBRE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOCITÁRIA DE CÉLULAS DO ESTROMA VASCULAR DO  
TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato.

BRASÍLIA

2024

ALANA ALMEIDA FELIX

EFEITO DOS INIBIDORES DO CO-TRANSPORTADOR DE SÓDIO-GLICOSE DO TIPO 2  
SOBRE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOCITÁRIA DE CÉLULAS DO ESTROMA VASCULAR DO  
TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Aprovada em 23 de Julho de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília**

---

**Profa. Dra. Bruna Teles Soares Beserra – Universidade Federal de Minas Gerais**

---

**Profa. Dra. Carine Royer – Universidade de Brasília**

*Dedico este trabalho a Deus, por toda força e inspiração; à minha mãe, Mariluce, por ver seu sonho realizado através de mim; ao meu filho, Davi, como exemplo de dedicação e perseverança; e à minha orientadora, Angélica, pela valiosa orientação e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por me conceder saúde, força e disposição para concluir mais essa etapa da minha vida. Sem Ele, nada disso seria possível. Em Ti repousa o meu pensamento e minha alma, em profundo reconhecimento, pois a Ti devo a própria existência e os meios de torná-la vitoriosa, e, por me fazeres acreditar que o pranto pode durar uma noite, mas o riso vem pela manhã (SI: 30:5).

À minha família, pelo amor incondicional, suporte constante e cumplicidade ao longo dessa jornada. Aos meus pais, Mariluce e Evaldo, que são minha maior fonte de inspiração e força, permanecendo sempre ao meu lado, em todos os momentos da minha vida.

Ao meu companheiro, David, pelo seu amor, paciência e constante encorajamento que me motivaram a continuar, mesmo nos momentos mais difíceis. Ao meu filho, Davi, que se tornou minha força e perseverança para a conclusão deste trabalho. Espero que, quando crescer, você se orgulhe da sua mãe e veja em mim um exemplo de resiliência e determinação.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Angélica Amorim Amato, sou profundamente grata pela orientação, paciência e dedicação ao longo desses seis anos de ensinamentos, sendo quatro de PIBICs e dois anos de mestrado. Seu apoio e sabedoria foram essenciais para o meu crescimento.

À Rilva, por sua ajuda e por sempre saber resolver e encontrar tudo no FarMol. À PIBIC, Giovana, pela colaboração e esforço durante os experimentos.

À minha amiga Jaya, que conheci durante a graduação e que permanece ao meu lado até hoje. Sua calma e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios. Sem você, esta jornada teria sido mais difícil. Sou grata por sua amizade e apoio.

Agradeço à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por me proporcionar a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos. Ao Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol) da Faculdade de Saúde - UnB pela infraestrutura e suporte oferecidos durante a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

*“É justo que muito custe o que muito vale.”*

*(Santa Teresa D'Ávila)*

## RESUMO

Os inibidores do co-transportador de sódio e glicose tipo 2 (SGLT-2) são medicamentos utilizados no tratamento da hiperglicemia no diabetes *mellitus* tipo 2, reduzindo a glicemia por meio da inibição da reabsorção renal de glicose e consequente aumento da sua excreção urinária. Estudos observacionais indicam que o tratamento com o inibidor do SGLT-2, canagliflozina, está associado à perda de massa óssea e aumento do risco de fraturas. Os mecanismos subjacentes a essa associação ainda não foram totalmente explorados, e não está definido se representam um efeito de classe, uma vez que não foi investigado se outros inibidores do SGLT-2, como dapagliflozina ou empagliflozina, afetam a saúde óssea. Os mecanismos plausíveis para explicar o aumento do risco de fraturas associado ao uso de canagliflozina incluem efeitos glicosúricos sobre as células tubulares renais, perda de peso, que pode impactar negativamente a massa óssea, e hipotensão ortostática, que aumenta o risco de quedas. Além disso, a ação direta desses fármacos em células extra-renais, como células endoteliais, miócitos e fibroblastos, também é possível, uma vez que estudos em modelos celulares indicam que eles modificam aspectos da fisiologia dessas células, que apresentam baixa expressão do SGLT-2, sugerindo a participação de outros alvos moleculares. Estudos sugerem que os inibidores do SGLT-2 podem influenciar o metabolismo lipídico e a função mitocondrial em fibroblastos e linhagens celulares tumorais. No entanto, o impacto desses fármacos na diferenciação de adipócitos, um processo relacionado ao metabolismo lipídico e à atividade mitocondrial, ainda não foi explorado. Investigar essa associação pode contribuir para uma melhor compreensão do aumento do risco de fraturas nos pacientes em tratamento com os inibidores do SGLT-2, dado os precursores comuns entre adipócitos e osteoblastos e evidências de que fármacos que direcionam a diferenciação preferencial para adipócitos comprometem a massa óssea ao reduzir a diferenciação de osteoblastos. Dessa forma, esse estudo investigou os efeitos dos inibidores do SGLT-2 canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina sobre a diferenciação de células do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano em adipócitos. As células foram induzidas a se diferenciar com a mistura isometilbutilxantina, dexametasona e insulina, na presença de veículo (controle negativo), pioglitazona ou rosiglitazona (controles positivos) e os diferentes inibidores do SGLT-2 em concentrações crescentes, durante 14 dias. Depois desse período, foram fixadas ou submetidas ao isolamento de RNA. A diferenciação adipocitária foi avaliada pela determinação do acúmulo lipídico intracelular nas células fixadas, com a coloração por Vermelho do Nilo, ou pela expressão gênica de marcadores adipogênicos (*Fabp4*, *Pparg2* e *Fsp27*), lipolíticos (*Lpl* e *Ppara*) e termogênicos (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Elovl3*), por PCR quantitativa em tempo real. Os resultados indicaram que o tratamento com os inibidores do SGLT-2 não influenciou o acúmulo lipídico intracelular durante a diferenciação adipocitária, tampouco a expressão de genes relacionados à adipogênese, lipólise e termogênese. Esses achados sugerem que as alterações observadas na massa óssea de pacientes em uso desses fármacos podem não ser atribuídas à adipogênese.

**Palavras-chave:** inibidores do co-transportador de sódio e glicose tipo 2; canagliflozina; dapagliflozina; empagliflozina; diferenciação celular; células do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano; adipogênese.

## ABSTRACT

Sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibitors are medications used to treat hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus, reducing blood glucose by inhibiting renal glucose reabsorption and consequently increasing urinary glucose excretion. Observational studies indicate that treatment with the SGLT-2 inhibitor canagliflozin is associated with increased risk of bone loss and bone fractures. The mechanisms underlying this association have not yet been fully explored, and it is not clear whether they represent a class effect, as it has not been investigated whether other SGLT-2 inhibitors, such as dapagliflozin or empagliflozin, affect bone health. Plausible mechanisms to explain increased risk of fractures associated with the use of canagliflozin include glycosuric effects on renal tubular cells leading to weight loss, which can negatively impact bone mass, and orthostatic hypotension, which increases the risk of falls. Furthermore, direct action of these drugs on some types of extrarenal cells is also possible, given that cell culture studies indicate that they modify several aspects of the physiology of endothelial cells, myocytes and fibroblasts. Notably, SGLT-2 expression in these cell types is possibly low, indicating that other molecular targets for SGLT-2 inhibitors. Studies suggest that SGLT-2 inhibitors can influence lipid metabolism and mitochondrial function in fibroblasts and tumor cell lines. However, the impact of these drugs on adipocyte differentiation, a physiological process closely related to lipid metabolism and mitochondrial activity, has not yet been explored. An investigation of this association could contribute to a better understanding of the increased risk of fractures in association with SGLT-2 inhibitors, given the common precursors between adipocytes and osteoblasts, and previous evidence that drugs that target the precursor for preferential differentiation into adipocytes, compromise bone mass by reducing osteoblast differentiation. Therefore, this study investigated the effects of SGLT-2 inhibitors canagliflozin, dapagliflozin and empagliflozin on the differentiation of stromal vascular cells from human subcutaneous adipose tissue into adipocytes. The cells were induced to differentiate with isomethylbutylxanthine, dexamethasone and insulin, in the presence of vehicle (negative control), pioglitazone or rosiglitazone (positive controls) and different SGLT-2 inhibitors in increasing concentrations, for 14 days. After this period, they were fixed or subjected to RNA isolation. Adipocytic differentiation was assessed by determining intracellular lipid accumulation in fixed cells, with Nile Red staining, or by gene expression of adipogenic (*Fabp4*, *Pparg2*, and *Fsp27*), lipolytic (*Lpl* and *Ppara*) and thermogenic (*Ucp1*, *Ppargc1a* and *Elovl3*) markers, by real-time quantitative PCR. The results indicated that treatment with SGLT-2 inhibitors does not influence intracellular lipid accumulation during adipocyte differentiation, nor the expression of genes related to adipogenesis, lipolysis, and thermogenesis. These findings suggest that changes observed in the bone mass of patients using these drugs may not be related to adipogenesis.

**Keywords:** sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors; canagliflozin; dapagliflozin; empagliflozin; cell differentiation; stromal vascular cells from human subcutaneous adipose tissue; adipogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das placas de 24 poços no ensaio de adipogênese em cultura de células. ....	24
Figura 2. Representação esquemática das placas de 12 poços no ensaio de adipogênese em cultura de células. ....	24
Figura 3. Fluxograma das etapas para isolar o RNA total usando o <i>PureLink</i> ® RNA Mini Kit. ....	27
Figura 4. O tratamento com agonistas PPAR $\gamma$ aumenta o acúmulo lipídico intracelular em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. ....	32
Figura 5. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano tratadas com agonista PPAR $\gamma$ durante a diferenciação celular em adipócitos. ....	33
Figura 6. O tratamento com os iSGLT-2 não aumenta o acúmulo lipídico intracelular em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. ....	34
Figura 7. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano tratadas com os iSGLT-2 durante a diferenciação celular em adipócitos. ....	35
Figura 8. O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes adipogênicos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. ....	37
Figura 9. O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes lipolíticos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. ....	38

Figura 10. O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes termogênicos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. ....39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos reagentes utilizados neste estudo, com seus respectivos pesos moleculares e fabricantes.....	22
Tabela 2. Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa e seus respectivos volumes.	28
Tabela 3. Condições de termociclagem durante a transcrição reversa de RNA em cDNA. ....	29
Tabela 4. Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades. ....	29
Tabela 5. Sequência dos <i>primers</i> para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real. ....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -MEM	<i>Minimum essential medium Alpha medium</i>
AMPc	Adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
C/EBP $\alpha$	Proteína alfa de ligação ao acentuador CCAAT
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Ciclo limiar
DE	Desreguladores endócrinos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEPES	Tampão ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfônico
IBMX	Isometilbutilxantina

iSGLT-2	Inibidores do co-transportador de sódio e glicose do tipo 2
LHCT05	Células do laboratório de hematologia e células-tronco do paciente 5 (Laboratório de hematologia e células-tronco, Universidade de Brasília)
LP01	Células de lipoaspirado do paciente 1 (Laboratório de hematologia e células-tronco, Universidade de Brasília)
MDI	Meio de indução
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPAR $\gamma$	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	Soro fetal bovino
SGLT-1	Co-transportador de sódio e glicose do tipo 1
SGLT-2	Co-transportador de sódio e glicose do tipo 2
SVF	Fração vascular estromal, <i>Stromal Vascular Fraction</i>
TEA	Transtorno do espectro autista
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperature</i>

TR	Transcrição Reversa
UCP1	Proteína desacopladora tipo 1
WHO	<i>World Health Organisation</i>

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
g/L	Gramas por litro
µg/mL	Microgramas por mililitro
M	Molar
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
U/mL	Unidades por mililitros
RFU	Unidade de fluorescência relativa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>PREFÁCIO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1	REAGENTES .....	22
3.2	CULTURA DE CÉLULAS.....	22
3.3	ENSAIO DE ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS .....	23
3.4	AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOCITÁRIA POR DETERMINAÇÃO DO ACÚMULO LIPÍDICO INTRACELULAR .....	25
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	25
	<b>3.5.1 Isolamento do RNA total</b> .....	26
	<b>3.5.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra</b> .....	27
	<b>3.5.3 Síntese de cDNA a partir de RNA</b> .....	28
	<b>3.5.4 PCR quantitativa em tempo real</b> .....	29
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1	EFEITOS DA PIOGLITAZONA E ROSIGLITAZONA SOBRE A ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS SVF DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO HUMANO. ....	32
4.2	EFEITOS DA CANAGLIFLOZINA, DAPAGLIFLOZINA E EMPAGLIFLOZINA SOBRE A ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS SVF DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO HUMANO. ....	34
4.3	EFEITOS DA CANAGLIFLOZINA, DAPAGLIFLOZINA E EMPAGLIFLOZINA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES RELACIONADOS À ADIPOGÊNESE, LIPÓLISE E TERMOGÊNESE. ....	36
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>

## 1 PREFÁCIO

Este trabalho de mestrado incluiu dois estudos: o primeiro é uma revisão sistemática da literatura e o segundo, um estudo experimental. A revisão sistemática teve como objetivo investigar a relação entre a exposição precoce a desreguladores endócrinos (DE) e o risco de transtorno do espectro autista (TEA) na infância e adolescência. Foram analisados 27 estudos observacionais que examinaram a exposição pré-natal a diversos DE, incluindo ftalatos, bifenilos policlorados, pesticidas organofosforados, fenóis, substâncias perfluoroalquiladas, pesticidas organoclorados, retardantes de chama bromados, dioxinas e parabenos. A revisão incluiu estudos epidemiológicos, aplicando uma metodologia que envolveu buscas em múltiplas bases de dados e avaliação independente por dois revisores. Apesar das limitações dos estudos, como tamanho de amostra e métodos de avaliação da exposição, os achados não sustentam uma associação consistente entre a exposição materna a DE durante a gravidez e o desenvolvimento de TEA. Esse trabalho foi publicado no periódico *Frontiers of Endocrinology* (<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1184546>).

O trabalho experimental, apresentado na presente dissertação no formato de artigo científico, teve como objetivo avaliar os efeitos dos inibidores do co-transportador de sódio-glicose tipo 2, canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, na diferenciação de adipócitos, visando explorar um possível mecanismo envolvido no aumento de risco de fraturas observado nos pacientes em tratamento com esses medicamentos. Este estudo envolveu a utilização de células do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano, aplicando métodos avançados de biologia molecular para avaliar os efeitos desses fármacos na adipogênese. Espera-se que os resultados e as discussões apresentadas nesta dissertação contribuam para o avanço do conhecimento na área de farmacologia e biologia molecular, oferecendo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2.

## 2 INTRODUÇÃO

Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são caracterizadas por uma etiologia incerta, de origem multifatorial e não infecciosa, com um curso prolongado e fortemente influenciadas por fatores de risco comportamentais, sejam eles modificáveis ou não (1, 2). Essas doenças frequentemente se desenvolvem de forma silenciosa, podendo levar anos para se manifestar clinicamente. As lesões causadas por essas condições resultam em complicações que são responsáveis pelo adoecimento e óbito da população. Entre as principais DCNT, destaca-se o diabetes *mellitus* (DM), que representa um problema de saúde pública de grande magnitude e impacto na sociedade (3).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - OMS), o DM consiste em uma DCNT de natureza metabólica, caracterizada por hiperglicemia crônica devido a uma deficiência na produção de insulina, na ação da insulina, ou em ambos os processos (4). A hiperglicemia persistente está associada a uma série de complicações graves, incluindo doenças cardiovasculares, retinopatia diabética, nefropatia diabética e problemas de cicatrização, o que aumenta o risco de amputações e infecções. Isso eleva significativamente a taxa de morbidade e mortalidade globais e reduz a qualidade de vida (4, 5).

A classificação do DM é essencial para direcionar o tratamento adequado e estratégias de prevenção de complicações crônicas. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) adota uma classificação baseada na etiopatogenia da doença, que compreende o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), tipo 2, o diabetes *mellitus* gestacional, bem como outros tipos específicos devido a causas variadas. Entre essas, o DM1 e DM2 são os mais reconhecidos, sendo o DM2 o mais comum (6). Essa abordagem permite uma melhor compreensão do DM e orienta a implementação de medidas preventivas e terapêuticas personalizadas.

O DM2 é a forma mais prevalente da doença, correspondendo a aproximadamente 90 a 95% de todos os casos, e tem como componentes fisiopatológicos a resistência periférica à insulina e a deficiência parcial da secreção desse hormônio pelas células beta pancreáticas. Sua prevalência tem aumentado globalmente, impulsionada por fatores como obesidade, sedentarismo, dieta inadequada e envelhecimento populacional (4, 6). Trata-se de uma enfermidade sem cura, porém pode ser oferecido tratamento com base em uma dieta balanceada e atividade física regular, além de terapia farmacológica, que consistem em anti-hiperglicemiantes (7).

Dentre as terapias medicamentosas mais atuais utilizadas para o tratamento do DM2, destacam-se os inibidores do co-transportador de sódio e glicose do tipo 2 (iSGLT-2). Os co-transportadores sódio-glicose (*Sodium-Glucose Linked Transporter* – SGLT) são proteínas de membrana essenciais que facilitam o transporte simultâneo de sódio e glicose através da membrana celular, exercendo papel crucial na absorção e reabsorção de glicose no intestino e nos rins. Existem dois subtipos principais: SGLT-1 e SGLT-2, cada um com funções e localizações distintas no corpo. O SGLT-1 é expresso principalmente nas células epiteliais do intestino delgado. Sua função é facilitar a absorção de glicose e galactose da dieta através da mucosa intestinal, além de reabsorver uma pequena fração de glicose filtrada nos rins (8-10).

O subtipo SGLT-2, por sua vez, está localizado predominantemente nas células do túbulo contorcido proximal dos néfrons nos rins e sua principal função é reabsorver a maior parte da glicose do filtrado glomerular de volta para o plasma (9). Cerca de 90% da glicose filtrada é reabsorvida pelo SGLT-2, ajudando a manter a glicemia em concentrações fisiológicas e evitando a perda excessiva de glicose na urina (11, 12). Em pacientes diabéticos, a capacidade de reabsorção de glicose é aumentada através da superexpressão do SGLT-2 e esse processo contribui significativamente para o estabelecimento do quadro de hiperglicemia (8, 10).

A importância clínica do SGLT-2 é significativa no tratamento do DM2. Os iSGLT-2, que incluem canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, são medicamentos desta classe aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (13) e disponíveis no mercado brasileiro (11). Cada um desses fármacos possui afinidades distintas pelo SGLT-2. A canagliflozina tem uma afinidade relativamente similar pelo SGLT-2 e SGLT-1, o que pode resultar em uma maior inibição da reabsorção de glicose no intestino e rins, potencialmente aumentando o risco de efeitos adversos gastrointestinais. Em contrapartida, dapagliflozina e empagliflozina demonstram uma seletividade significativamente maior pelo SGLT-2 em comparação ao SGLT-1 (12). Esta alta seletividade favorece a sua ação predominante nos rins e minimiza a interferência na absorção intestinal de glicose. Essas diferenças de afinidade podem influenciar os perfis de segurança e eficácia de cada medicamento (9).

Os iSGLT-2 atuam bloqueando a reabsorção de glicose nas células do túbulo contorcido proximal, promovendo sua excreção urinária e, conseqüentemente, reduzindo seus níveis plasmáticos (12). Esse mecanismo de ação não apenas melhora o controle glicêmico, mas também oferece benefícios adicionais, como a redução da pressão arterial (PA) e a promoção

da perda de peso. A redução da PA ocorre devido ao efeito diurético e natriurético desses medicamentos, que diminuem o volume sanguíneo e, portanto, a PA. Já a perda de peso é um efeito indireto, atribuído à excreção aumentada de glicose, que resulta em perda calórica. Além disso, a inibição do SGLT-2 proporciona um mecanismo independente de insulina para controlar a glicemia, o que é particularmente vantajoso em pacientes com resistência à insulina (13-17).

Além de seus efeitos diretos na redução da glicemia, os iSGLT-2 apresentam vantagens cardiovasculares e renais que são de particular importância para pacientes com DM2. Estudos clínicos têm demonstrado que os iSGLT-2 reduzem significativamente o risco de eventos cardiovasculares adversos maiores, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, além de diminuir as taxas de hospitalização por insuficiência cardíaca. Esse benefício é especialmente relevante, dado o elevado risco cardiovascular associado ao DM2 (18-20). Em relação aos benefícios renais, os iSGLT-2 têm mostrado a capacidade de retardar a progressão da nefropatia diabética, preservando a função renal ao reduzir a hiperfiltração glomerular e a pressão intraglomerular (21-23). Esses efeitos adicionais tornam os iSGLT-2 uma escolha valiosa não apenas para o controle hiperglicêmico, mas também para a proteção cardiovascular e renal (15).

Uma variedade de eventos adversos também está sendo associada a essa classe de medicamentos (24-26). Alguns eram esperados devido ao seu mecanismo de ação, como infecções urinárias e genitais, que resultam da maior excreção de glicose na urina, criando um ambiente favorável ao crescimento de bactérias e fungos. Outros efeitos adversos não foram previstos inicialmente, mas podem ser explicados em pacientes de risco expostos a condições predisponentes, como aqueles relacionados à depleção de volume, que podem levar à desidratação e hipotensão, e a cetoacidose diabética euglicêmica, uma condição rara, porém grave, caracterizada por níveis elevados de cetonas no sangue sem hiperglicemia significativa. Além desses, existem efeitos mais surpreendentes e ainda pouco compreendidos, como o aumento do risco de fraturas ósseas e amputações de membros inferiores.

Esses fármacos estão fornecendo resultados promissores no tratamento do DM, contudo, os mecanismos pelos quais os iSGLT-2 exercem efeitos além do controle glicêmico ainda não são completamente compreendidos. Os mecanismos plausíveis para explicar o aumento do risco de fraturas associado ao uso desses medicamentos (27-29) incluem seus efeitos glicosúricos sobre a célula tubular renal, que podem levar à perda de peso, impactando negativamente a

massa óssea, e à hipotensão ortostática, aumentando o risco de quedas. Além disso, há a possibilidade de ação direta dos iSGLT-2 em tipos celulares extra-renais. Estudos em modelos celulares sugerem que esses fármacos podem modificar aspectos da fisiologia de células endoteliais, miócitos e fibroblastos (30-34), que exibem baixa expressão do SGLT-2, sugerindo a existência de outros alvos moleculares para mediar esses efeitos.

Adicionalmente, outros estudos em modelos celulares indicam que os iSGLT-2 podem influenciar o metabolismo lipídico e a função mitocondrial em fibroblastos (34) e linhagens celulares tumorais (35). Em relação ao metabolismo lipídico, esses fármacos promovem a oxidação de ácidos graxos livres e modulam a biogênese lipídica. Além disso, eles ajudam a reduzir os níveis de triglicerídeos e aumentam o HDL-colesterol, promovendo um perfil lipídico mais saudável. Esses efeitos são atribuídos, em parte, à perda de peso induzida pelos iSGLT-2 e às mudanças na redistribuição de gordura corporal.

No que diz respeito à função mitocondrial, os iSGLT-2 têm mostrado potencial para melhorar a função mitocondrial, o que pode ser benéfico para a saúde celular. A melhora na função mitocondrial é atribuída à capacidade dessas drogas de reduzir o estresse oxidativo e promover a biogênese mitocondrial, processos que são cruciais para a manutenção da homeostase energética e a prevenção de danos celulares. No entanto, até o momento, não se explorou o impacto desses fármacos sobre a diferenciação de adipócitos, um processo fisiológico diretamente relacionado ao metabolismo lipídico e à atividade mitocondrial.

A investigação dessa associação pode contribuir para compreender melhor o aumento do risco de fraturas em pacientes que utilizam os iSGLT-2, considerando os precursores comuns entre adipócitos e osteoblastos, bem como evidências de que fármacos que direcionam precursores para a diferenciação preferencial em adipócitos comprometem a massa óssea ao reduzir a diferenciação de osteoblastos (36, 37). Dessa forma, esse estudo buscou investigar os efeitos dos iSGLT-2, canafliglozina, dapagliflozina e empagliflozina, sobre a diferenciação de células do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano em adipócitos, analisada pelo acúmulo lipídico intracelular e expressão de genes relacionados à adipogênese.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos reagentes utilizados neste estudo, com seus respectivos pesos moleculares e fabricantes.

Reagentes	Peso molecular	Fabricante
Canagliflozina	444,5	Cayman Chemical Company®
Dapagliflozina	408,9	Cayman Chemical Company®
Empagliflozina	450,9	Cayman Chemical Company®
Pioglitazona	356,4	Cayman Chemical Company®
Rosiglitazona	357,43	Cayman Chemical Company®
Dexametasona	39246	Sigma-Aldrich®
Isometilbutilxantina	222,24	Sigma-Aldrich®
Insulina	5807,57	Sigma-Aldrich®
Vermelho do Nilo	408,49	Sigma-Aldrich®
Hoechst 33342	561,93	Sigma-Aldrich®

As soluções utilizadas de canagliflozina, dapagliflozina, empagliflozina, pioglitazona e rosiglitazona foram preparadas por diluição em DMSO (Dimetilsulfóxido) para a obtenção de diferentes concentrações e mantidas a -20°C protegidas da luz. O meio de cultura utilizado para cultivar as células primárias do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano foi adquirido da *Thermo Fisher® Scientific* ( $\alpha$ -MEM, *Minimum Essential Medium Alpha Medium*).

Os kits utilizados para a síntese de cDNA e realização da PCR (Reação em cadeia da polimerase) também foram adquiridos da *Thermo Fisher® Scientific*, *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* e *PureLink® RNA Mini Kit*, respectivamente.

#### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células primárias do estroma vascular do tecido adiposo subcutâneo humano, LP01 e LHCT05, foram cedidas pelo Professor Felipe Saldanha (Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília) e cultivadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 2 g/L de bicarbonato de sódio, 0,5M de HEPES, 100 U/mL de

penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> para cultura de células, e mantidas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 ENSAIO DE ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS

O processo de adipogênese é avaliado com o estudo de alguns tipos celulares que podem ser induzidos em cultura a diferenciar-se em adipócitos. A fração vascular estromal (*Stromal Vascular Fraction - SVF*) derivada do tecido adiposo contém populações de células heterogêneas, como células progenitoras/células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos, células endoteliais, células T e macrófagos M2. A morfologia das células SVF se assemelha à dos fibroblastos e elas podem ser induzidas a se diferenciar em pré-adipócitos e tecido adiposo (38).

Assim, quando tratadas com substâncias que iniciam a cascata transcricional envolvida na adipogênese, as células adotam o formato arredondado e iniciam o acúmulo de lipídeos, que aparecem como gotículas intracelulares. As substâncias capazes de induzir a adipogênese são a isometilbutilxantina (IBMX, um inibidor de fosfodiesterase que aumenta a concentração intracelular de AMP cíclico), a dexametasona (um agonista do receptor de glicocorticoide) e a insulina. Cada componente dessa combinação ativa vias celulares específicas, importantes para a diferenciação adipocitária, formando o coquetel adipogênico (39).

O ensaio foi realizado com células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano, LP01 e LHCT05, que foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> para cultura de células, em meio de cultura α-MEM contendo 15% de SFB, até sua subconfluência. Para o ensaio de diferenciação, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura α-MEM contendo 15% de SFB até que as células atingissem 100% de confluência.

Ao alcançarem 100% de confluência, o meio de cultura foi substituído pelo meio de indução (MDI) composto por meio α-MEM contendo 15% de SFB, 0,5 mM de IBMX, 5 µg/mL de insulina e 1 µM de dexametasona durante 14 dias. Durante esse período, as células foram submetidas ao tratamento com o veículo (0,01% de DMSO, controle negativo), pioglitazona ou rosiglitazona (controle positivo), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, nas concentrações 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7,5</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6,5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5,5</sup> e 10<sup>-5</sup> M (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 µM), conforme apresentado na Figura 1. Dados anteriores do nosso grupo indicaram que concentrações mais elevadas (superiores a 10 µM – 30 e 100 µM) dos iSGLT-2 são tóxicas para

as células no ensaio de diferenciação de adipócitos. O tratamento e a troca do meio de indução foram realizados duas vezes por semana durante os 14 dias.

**Figura 1.** Representação esquemática das placas de 24 poços no ensaio de adipogênese em cultura de células.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	$10^{-8}M$	$10^{-8}M$	$10^{-8}M$
B	$10^{-7,5}M$	$10^{-7,5}M$	$10^{-7,5}M$	$10^{-7}M$	$10^{-7}M$	$10^{-7}M$
C	$10^{-6,5}M$	$10^{-6,5}M$	$10^{-6,5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-6}M$	$10^{-6}M$
D	$10^{-5,5}M$	$10^{-5,5}M$	$10^{-5,5}M$	$10^{-5}M$	$10^{-5}M$	$10^{-5}M$

A partir dos experimentos realizados com 7 concentrações de cada composto, foi selecionada a maior concentração ( $10 \mu M$ ) dos iSGLT-2, que foi utilizada para uma segunda etapa de ensaios de diferenciação, em placas de 12 poços, para análise da expressão gênica. A escolha dessa concentração se baseou nos resultados da primeira etapa, realizada em placas de 24 poços para a avaliação do acúmulo lipídico intracelular, onde não foram observadas diferenças significativas nos resultados entre as concentrações testadas. Dessa forma, a maior concentração foi selecionada para verificar se, na análise da expressão gênica, haveria alguma alteração significativa.

Os ensaios foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito anteriormente, e em condições de tratamento isolado com o iSGLT-2 e de co-tratamento com rosiglitazona e iSGLT-2, conforme apresentado na Figura 2. Ao final do período de diferenciação, o RNA total foi extraído para a quantificação da expressão do RNAm de marcadores específicos relacionados ao adipócito branco (de lipogênese e lipólise) e marcadores relacionados ao adipócito termogênico. Todos os experimentos da diferenciação foram realizados em triplicata, pelo menos 3 vezes, de forma independente.

**Figura 2.** Representação esquemática das placas de 12 poços no ensaio de adipogênese em cultura de células.

	1	2	3	4
A	DMSO	Rosi $1\mu M$	iSGLT-2 $10 \mu M$	Rosi $1\mu M$ + iSGLT-2 $10 \mu M$
B	DMSO	Rosi $1\mu M$	iSGLT-2 $10 \mu M$	Rosi $1\mu M$ + iSGLT-2 $10 \mu M$
C	DMSO	Rosi $1\mu M$	iSGLT-2 $10 \mu M$	Rosi $1\mu M$ + iSGLT-2 $10 \mu M$

Rosi: rosiglitazona, iSGLT-2: inibidor do co-transportador de sódio e glicose do tipo 2.

Em todos os ensaios com as células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano, LP01 e LHCT05, foi incluído tratamento apenas com o controle negativo (DMSO) e com o controle positivo, agonistas do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR $\gamma$ ), pioglitazona ou rosiglitazona.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOCITÁRIA POR DETERMINAÇÃO DO ACÚMULO LIPÍDICO INTRACELULAR

Ao final do ensaio de diferenciação em adipócitos, no décimo quarto dia, foi analisado o acúmulo lipídico intracelular por meio da coloração com o Vermelho do Nilo (*Nile Red*) e, para normalização dos resultados, com o corante de ácido nucleico Hoechst 33342. Para isso, as células foram lavadas com tampão PBS 1x (*Phosphate buffered saline*) e fixadas com formaldeído a 3,7% em tampão PBS 1x, por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS 1x mais duas vezes e coradas com uma solução previamente preparada com o corante lipídico Vermelho do Nilo (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o corante de ácido nucleico Hoechst 33342 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), durante 15 minutos. Ao término do processo, a solução com os corantes foi descartada e as células foram lavadas com tampão PBS 1x mais duas vezes.

O acúmulo lipídico foi quantificado por meio da determinação das unidades de fluorescência relativa (RFUs) no equipamento EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer), expresso pela medida da RFU do corante Vermelho do Nilo normalizado para a medida da RFU do corante Hoechst 33342. As imagens foram fotodocumentadas no microscópio *Zeiss Axio Observer D1 Inverted Microscope* nos aumentos de 5 e 20 vezes.

### 3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A adipogênese também foi avaliada pela expressão do RNAm de marcadores específicos relacionados à adipogênese (*Fabp4*, *Pparg2* e *Fsp27*), lipólise (*Lpl* e *Ppara*) e termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Elovl3*). Para isso, o RNA celular total foi isolado com a utilização do *PureLink*® RNA Mini Kit (*ThermoScientific*) e sua concentração e pureza foram avaliadas em um espectrofotômetro de microvolume *NanoDrop*<sup>TM</sup> *One/One*<sup>c</sup> (*ThermoScientific*). O cDNA foi sintetizado utilizando kit comercial *High-Capacity cDNA*

*Reverse Transcription Kit (ThermoScientific)* e a PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o kit Power SYBR® Green 2X (*ThermoScientific*). Como gene referência, foi utilizado o *36B4* e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.5.1 Isolamento do RNA total

O RNA total foi extraído de cultura primária de células SVF tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 1  $\mu$ M (controle positivo), iSGLT-2 em sua maior concentração de  $10^{-5}$  M (10  $\mu$ M) e co-tratamento com rosiglitazona 1  $\mu$ M e iSGLT-2 10  $\mu$ M, ao final do ensaio de adipogênese.

A extração do RNA total das células foi realizada com o *PureLink® RNA Mini Kit (ThermoScientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras são lisadas e homogeneizadas na presença de isotiocianato de guanidina, um composto capaz de proteger o RNA de RNases endógenas (40). Após a homogeneização, o etanol é adicionado à amostra. A amostra é então processada por meio de uma coluna contendo uma membrana transparente à base de sílica à qual o RNA se liga. Quaisquer impurezas são efetivamente removidas por lavagem subsequente (41). O RNA total purificado é então eluído em água livre de RNase (*RNase-Free Water*). Todas essas etapas estão ilustradas no fluxograma da figura 3.

Ao final do ensaio de diferenciação das placas de 12 poços, o meio de cultura das células foi removido e o tampão de lise (*Lysis Buffer*) preparado com 2-mercaptoetanol (conforme as recomendações do fabricante) foi adicionado a amostra. Com o auxílio de seringas com agulhas de calibre 18, o lisado de células das placas foi homogeneizado e transferido para microtubos de 1,5 mL. Depois disso, foi adicionado etanol 70% as amostras e essa mistura foi então homogeneizada em agitador de tubos (vórtex), para dispersar qualquer precipitado visível que possa ter formado após a adição de etanol. As amostras foram transferidas para as colunas (com o tubo de coleta) e centrifugadas a 12.000 xg, por 15 segundos à temperatura ambiente, para remoção de debris celulares. Após isso, foi adicionado o tampão de lavagem I (*Wash Buffer I*) e as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg, por 15 segundos à temperatura ambiente novamente. As colunas foram transferidas para um novo tubo de coleta. Em seguida, foi adicionado o tampão de lavagem II com etanol (*Wash Buffer II*) e as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg, por 15 segundos à temperatura ambiente mais uma vez. Esse

procedimento foi realizado duas vezes. As colunas foram centrifugadas a 12.000 xg, por 1 minuto, para secar a membrana que o RNA está ligado e o tubo de coleta foi trocado por um microtubo de 1,5 mL. Por fim, a água livre de RNase (*RNase-Free Water*) foi adicionada às colunas, que foram incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida, centrifugadas a 12.000 xg, por 2 minutos à temperatura ambiente, para eluir o RNA da membrana para o microtubo de 1,5 mL. As amostras foram armazenadas no *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

**Figura 3.** Fluxograma das etapas para isolar o RNA total usando o *PureLink*® RNA Mini Kit.



Fonte: Adaptado do Manual *PureLink*® RNA Mini Kit (*ThermoScientific*).  
Disponível em: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fpurelink\\_rna\\_mini\\_kit\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fpurelink_rna_mini_kit_man.pdf).

### 3.5.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra

A quantificação e o grau de pureza das amostras de RNA total foram determinados no espectrofotômetro de microvolume *NanoDrop*<sup>TM</sup> *One/One*<sup>c</sup> (*ThermoScientific*), utilizando-se 1  $\mu\text{L}$  das amostras de RNA purificado.

A concentração de RNA total é fornecida automaticamente pelo equipamento em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , determinada pelo seguinte cálculo:  $(\text{DO } 260 \text{ nm} \times 40) / 1000$ , em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento de onda 260 nm. O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, é calculado pela

razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras com grau de pureza entre 1,7 e 2,0, visto que estes valores representam baixa contaminação por proteínas (42).

### 3.5.3 Síntese de cDNA a partir de RNA

Para a realização da análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativa em tempo real, é necessário que o RNA purificado das amostras seja convertido em cDNA de fita simples por meio da transcrição reversa (TR). O cDNA foi sintetizado utilizando kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoScientific)*.

Os reagentes que compõe esse kit e foram utilizados neste ensaio estão apresentados na tabela 2. Os reagentes foram colocados no gelo para descongelamento e posterior uso. A partir desses componentes e seus respectivos volumes, foi manipulado o mix de TR, de acordo com as recomendações do fabricante, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa e seus respectivos volumes.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume/Reação (µL)</b>
<i>10X RT Buffer</i>	2
<i>25X dNTP Mix (100mM)</i>	0,8
<i>10X RT Random Primers</i>	2
<i>MultiScribe™</i>	1
<i>Reverse Transcriptase</i>	1
<i>Rnase Inhibitor</i>	1
<i>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</i>	3,2
<b>Total por reação</b>	<b>10</b>

No preparo das reações de TR de cDNA, foi pipetado 10µL do mix de TR e 10µL da amostra de RNA na parede de cada microtubo, totalizando 20 µL de volume final da amostra. Os microtubos foram centrifugados rapidamente para eliminar qualquer bolha de ar e colocados no termociclador. As condições de termociclagem durante a TR estão apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3.** Condições de termociclagem durante a transcrição reversa de RNA em cDNA.

	<b>Passo 1</b>	<b>Passo 2</b>	<b>Passo 3</b>	<b>Passo 4</b>
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

### 3.5.4 PCR quantitativa em tempo real

Como mencionado anteriormente, a PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o kit Power SYBR® Green 2X (*ThermoScientific*). O produto de amplificação de cada amostra foi determinado pela utilização do SYBR Green, um fluoróforo que se intercala na dupla fita de DNA e, quando excitado por luz, emite fluorescência, de forma que a intensidade do sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do produto de amplificação na amostra, a cada ciclo da PCR. O sinal fluorescente é detectado por um detector no equipamento de PCR e, ao final da reação, é possível determinar o Ct (*cycle threshold* / ciclo limiar), que corresponde ao número de ciclos de reação necessários para a amplificação tornar-se exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*), em duplicatas, para volume final de 10 µL, de acordo com instruções do fabricante. Uma reação controle negativo, ou seja, sem amostra de RNA total, foi realizada para cada par de *primers* a fim de verificar possíveis contaminações. Os reagentes utilizados na reação estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Mix Power SYBR Green® RT PCR (2X)</i>	5
cDNA 5ng/mL	2
<i>Primer foward 10 µM</i>	0,5
<i>Primer reverse 10 µM</i>	0,5
Água Milli-Q	2
Total	10

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). As sequências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Sequência dos *primers* para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<b>Gene</b>	<b>Proteína correspondente</b>	<b>Sequência do primer</b>
<b>36B4</b> (gene referência)	Fosfoproteína ribossomal ácida humana P0	F: AACTCTGCATTCTCGCTTCC R: ATCCGTCTCCACAGACAAGG
<b>Fabp4</b>	Proteína ligante de ácidos graxos tipo 4	F: AAAGTCAAGAGCACCATAACC R: TTCAATGCGAACTTCAGTCC
<b>Pparg2</b>	Receptor $\gamma$ 2 ativado por proliferadores peroxissomais	F: GCGATTCCTTCACTGATAC R: TCAAAGGAGTGGGAGTGGTC
<b>Fsp27</b>	Proteína específica de gordura 27	F: CAGACAAGCCCTTCTTCCTG R: TTATGGGAGAGGGACAGTGG
<b>Lpl</b>	Lipase lipoprotéica	F: AGGAGCATTACCCAGTGTCC R: GGCTGTATCCCAAGAGATGGA
<b>Ppara</b>	Receptor $\alpha$ ativado por proliferadores peroxissomais	F: ACATCCAAGAGATTTTCGCAATCCA R: GAAAGCGTGTCCGTGATGACC
<b>Ucp1</b>	Proteína desacopladora tipo 1	F: TCAGACTTCAAGCACAGAGCCA R: GGAGTAGTCCCTTTCCAAAGACCC
<b>Ppargc1<math>\alpha</math></b>	Coativador-1 $\alpha$ do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PGC-1 $\alpha$ )	F: ATCAGACCTGACACAACACGGA R: ACCATAGCTGTCTCCATCATCCC
<b>Elovl3</b>	Elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 3	F: AGGTCATAGAACTCGGAGACACAG R: GCAGGCACTTTGTTCTTGTATCCA

F: primer forward; R: primer reverse.

As condições de termociclagem durante a PCR foram:

- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos) e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);

· Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): realizado após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação  $T_m$  (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR se apresenta 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A  $T_m$  é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado.

A expressão relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo  $\Delta\Delta Ct$ , com normalização para o gene de referência (*36B4*). Para isso, os valores de  $Ct$  obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do  $Ct$  obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*36B4*), sendo obtido o  $\Delta Ct$ .

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de  $Ct$  ou  $\Delta\Delta Ct$ . Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intervenção}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$ .

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

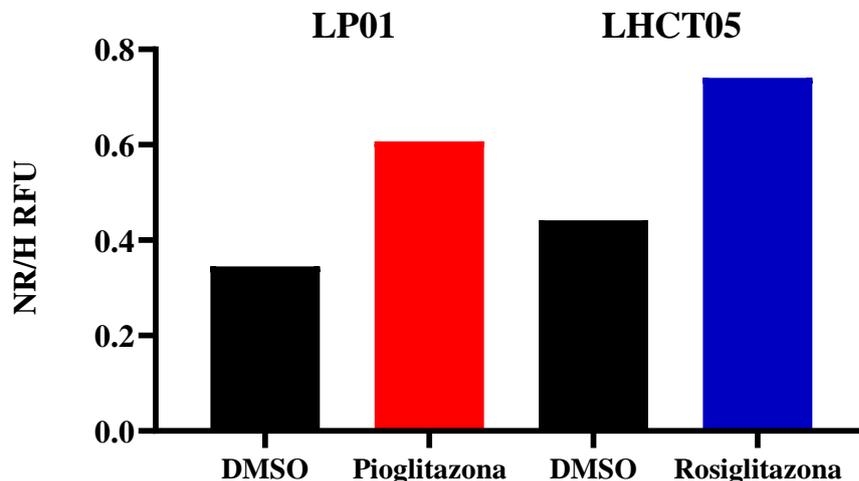
Os resultados do acúmulo lipídico intracelular foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos resultados em relação ao controle negativo (células induzidas a se diferenciar na presença do controle negativo, DMSO). Os resultados da análise de expressão gênica, calculados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito anteriormente, foram descritos em relação também ao controle negativo.

O teste estatístico empregado para análise da expressão gênica foi a análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls, utilizando os programas GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, Systat versão 12 e Sigmaplot versão 11. O critério de significância para todas as análises foi o valor  $p < 0,05$ .

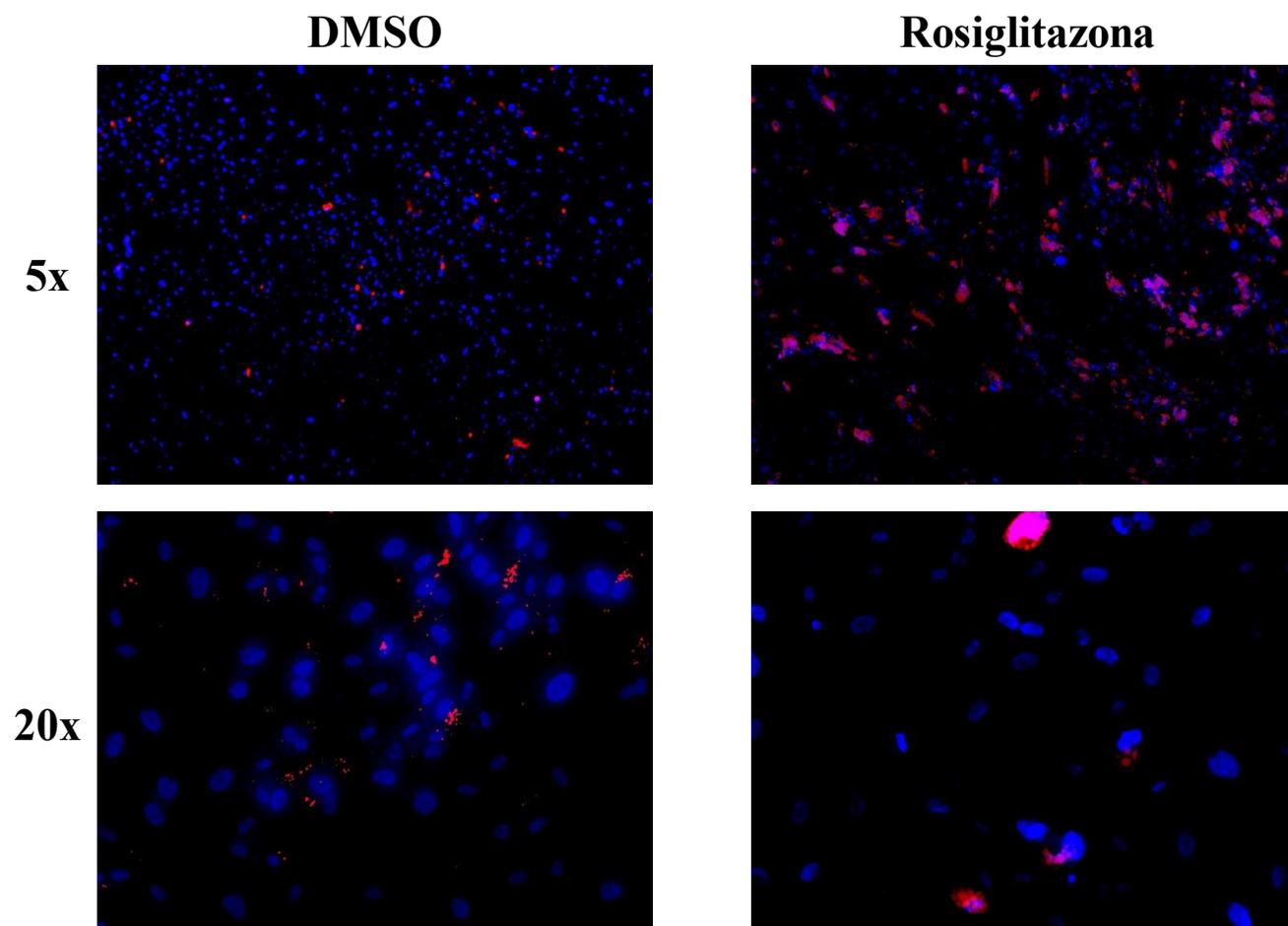
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da pioglitazona e rosiglitazona sobre a adipogênese em cultura de células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano.

Foi realizado, inicialmente, rastreamento da adipogênese em cultura com a utilização de células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano, LP01 e LHCT05, induzidas a se diferenciar em adipócitos com a exposição à combinação IBMX, dexametasona e insulina, e avaliadas, ao final do período de diferenciação, quanto ao acúmulo lipídico intracelular por meio da coloração com o Vermelho do Nilo e, para normalização dos resultados, com o corante de ácido nucleico Hoechst 33342. Estas células foram tratadas, durante todo o período de diferenciação, com o controle negativo (DMSO) e com o controle positivo, agonistas do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (pioglitazona ou rosiglitazona). Na Figura 4, são apresentados os resultados obtidos na maior concentração de pioglitazona ou rosiglitazona nas três linhagens celulares. Como esperado, foi observado aumento de acúmulo lipídico intracelular nas células tratadas com pioglitazona e rosiglitazona, na concentração de  $10^{-5}$  M (10  $\mu$ M), em relação às células tratadas com apenas DMSO, durante a diferenciação celular em adipócitos.



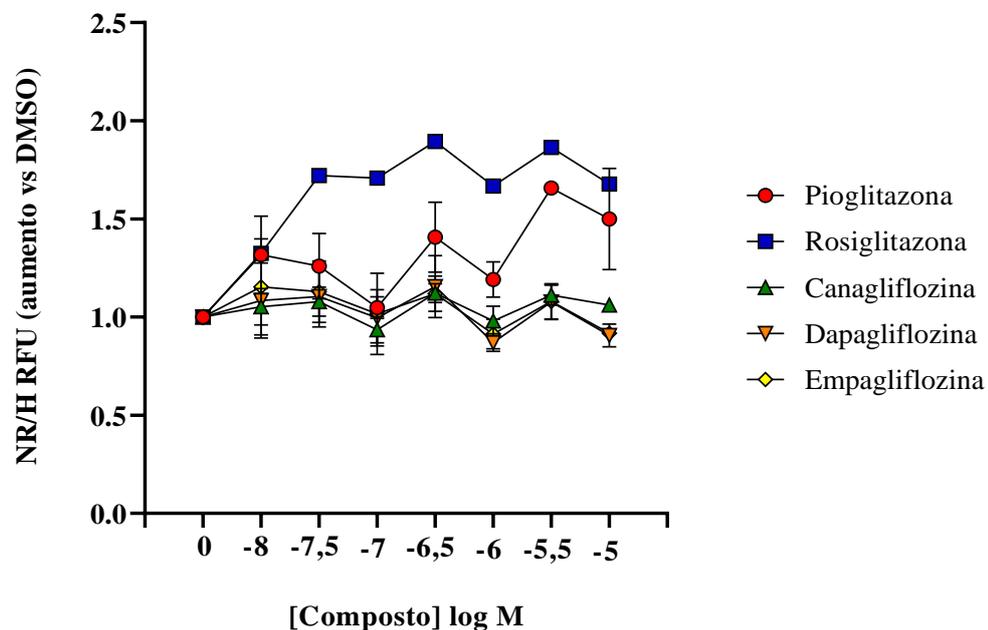
**Figura 4.** O tratamento com agonistas PPAR $\gamma$  aumenta o acúmulo lipídico intracelular em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com o veículo (0,01% de DMSO), pioglitazona ou rosiglitazona (10  $\mu$ M) durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, as células foram fixadas e depois coradas com o Nile Red e Hoechst 33342, para análise de acúmulo lipídico intracelular e ácidos nucleicos, respectivamente. A fluorescência do Nile Red (RFU) foi normalizada para a de Hoechst. N = 1, realizado em triplicata.



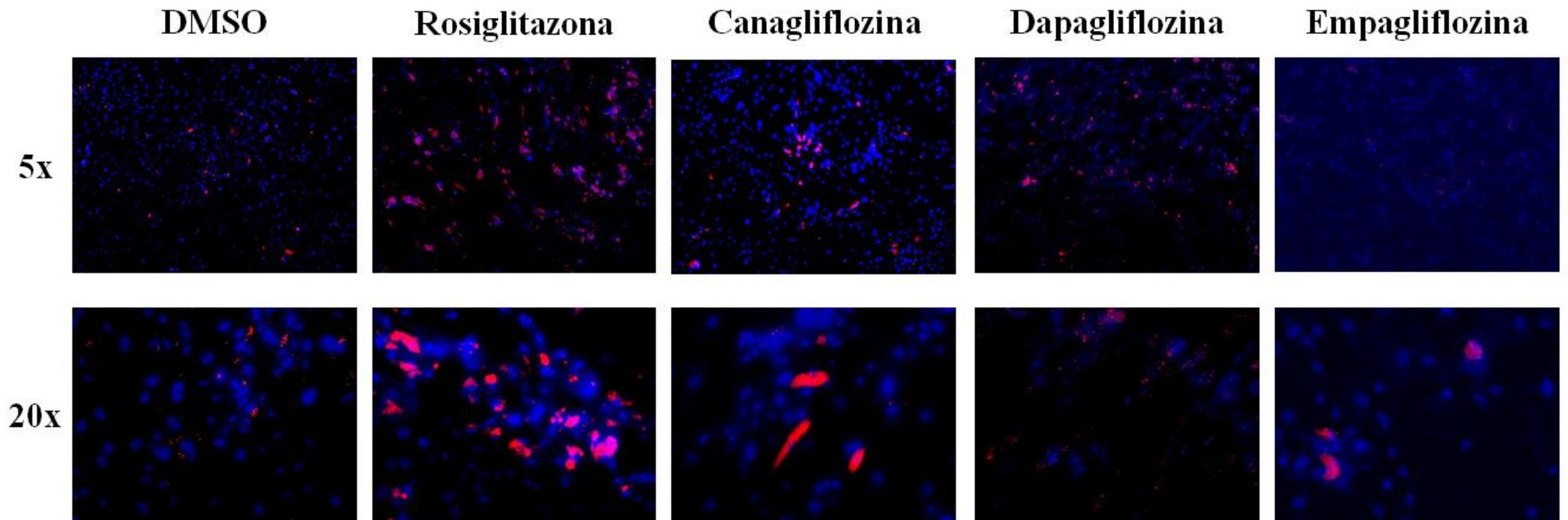
**Figura 5. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano tratadas com agonista PPAR $\gamma$  durante a diferenciação celular em adipócitos.** Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com o veículo (0,01% de DMSO) e rosiglitazona (10  $\mu$ M) durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, as células foram fixadas e depois coradas com o Nile Red e Hoechst 33342, e observadas por microscópio de fluorescência (aumento de 5X e 20X).

#### 4.2 Efeitos da canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina sobre a adipogênese em cultura de células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano.

A atividade dos iSGLT-2 estudados foi avaliada em um contexto fisiológico, representada pela diferenciação, em cultura, de células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano em adipócitos. Para este ensaio, as células foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com a exposição à combinação IBMX, dexametasona e insulina, e avaliadas, ao final do período de diferenciação, quanto ao acúmulo lipídico intracelular pela coloração com o Vermelho do Nilo e, para normalização dos resultados, com o corante de ácido nucleico Hoechst 33342. Estas células foram tratadas, durante todo o período de diferenciação, com o controle negativo (DMSO), controle positivo (pioglitazona ou rosiglitazona), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, nas concentrações  $10^{-8}$ ,  $10^{-7,5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6,5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5,5}$  e  $10^{-5}$  M. Não foi observado aumento significativo de acúmulo lipídico intracelular nas células tratadas com os iSGLT-2, quando comparado com o controle positivo (pioglitazona e rosiglitazona), durante a diferenciação celular em adipócitos, conforme apresentado nas Figura 6 e 7.



**Figura 6.** O tratamento com os iSGLT-2 não aumenta o acúmulo lipídico intracelular em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com veículo (0,01% de DMSO), controle positivo (pioglitazona ou rosiglitazona), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, nas concentrações  $10^{-8}$ ,  $10^{-7,5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6,5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5,5}$  e  $10^{-5}$  M durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, as células foram fixadas e depois coradas com o Vermelho do Nilo e Hoechst 33342, para análise de acúmulo lipídico intracelular e ácidos nucleicos, respectivamente. A fluorescência do Vermelho do Nilo (RFU) foi normalizada com o de Hoechst. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM dos resultados em relação ao controle negativo (DMSO). N = 3, sendo duas LP01 e uma LHCT05.

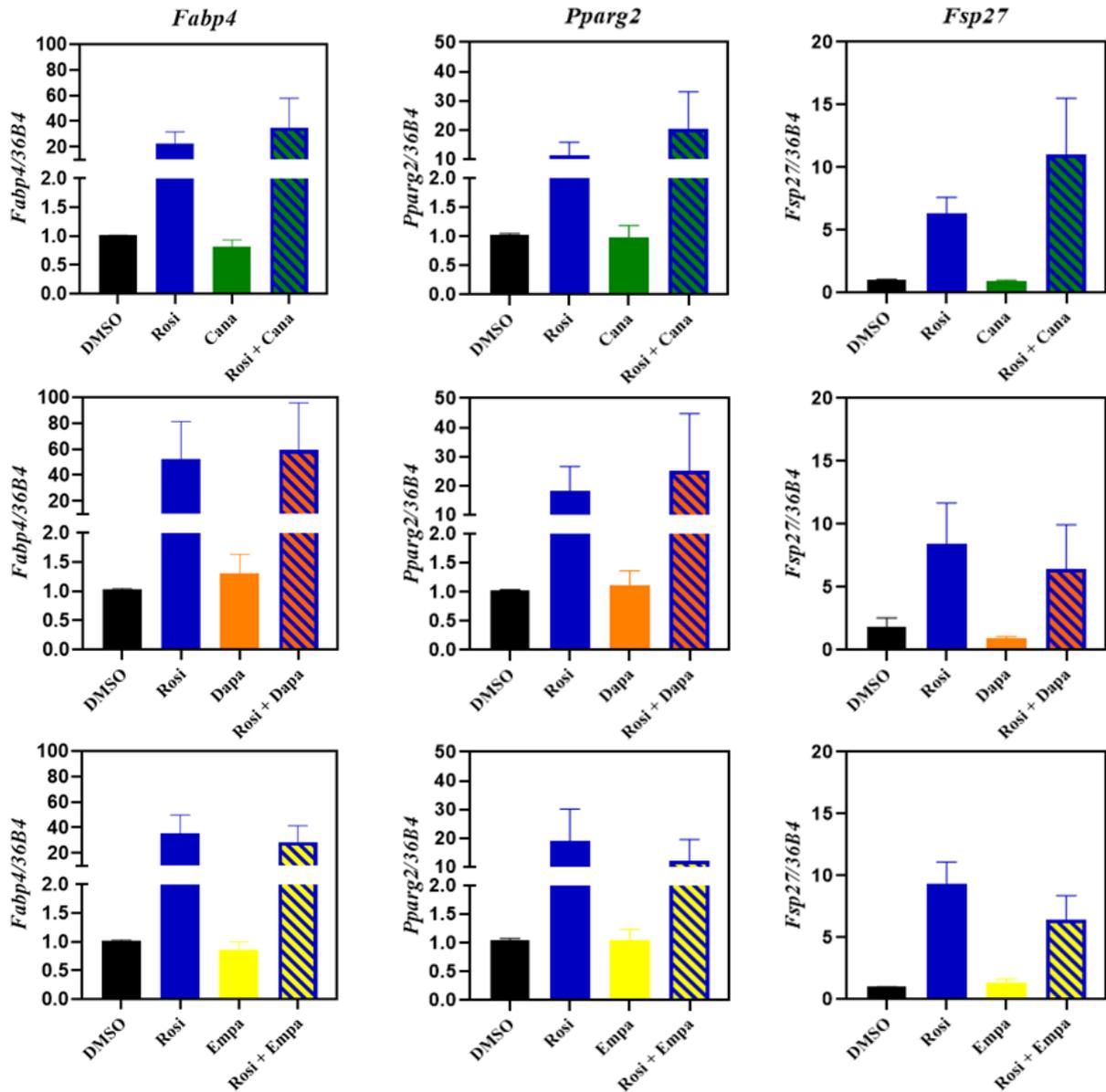


**Figura 7. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano tratadas com os iSGLT-2 durante a diferenciação celular em adipócitos.** Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com veículo (0,01% de DMSO), controle positivo (rosiglitazona), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, na concentração  $10^{-5}$  M durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, as células foram fixadas e depois coradas com o Vermelho do Nilo e Hoechst 33342, e observadas por microscópio de fluorescência (aumento de 5X e 20X).

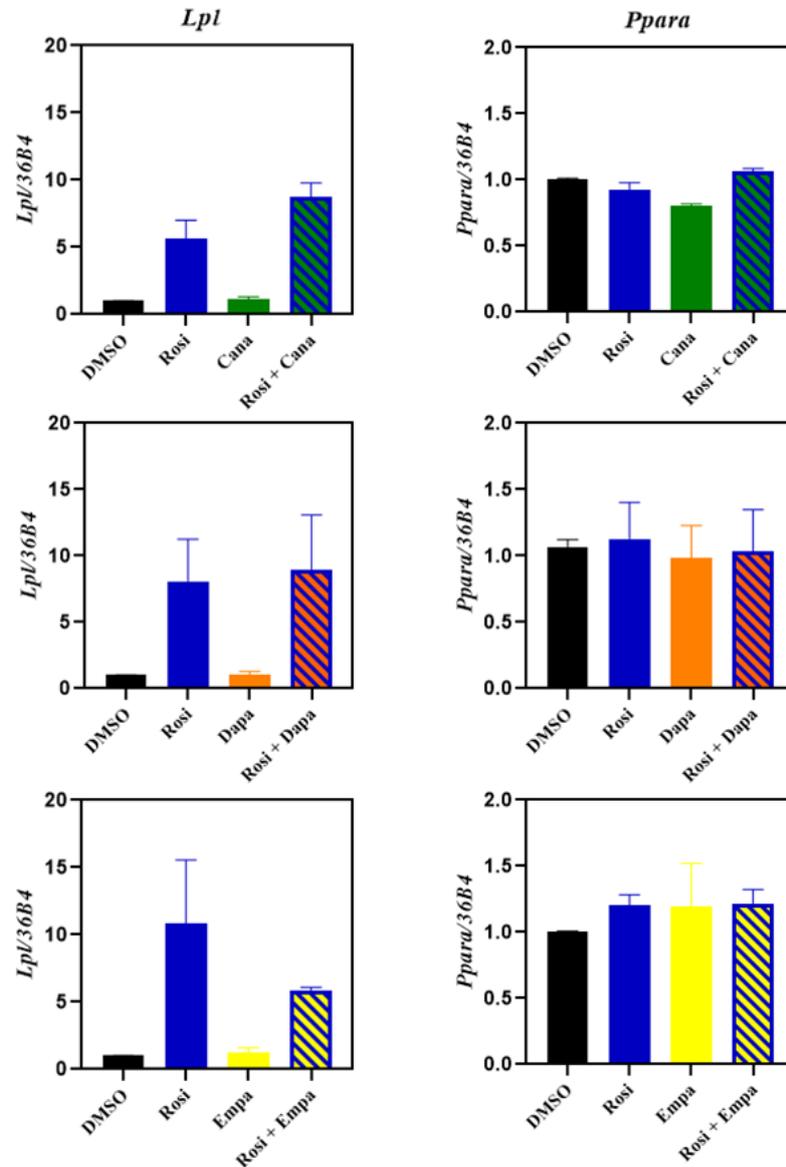
### **4.3 Efeitos da canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina sobre a expressão gênica de marcadores relacionados à adipogênese, lipólise e termogênese.**

A adipogênese em cultura foi avaliada também pela determinação de marcadores específicos relacionados à adipogênese (*Fabp4*, *Pparg2* e *Fsp27*), lipólise (*Lpl* e *Ppara*) e termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Elovl3*). Para o estudo em questão, as células foram tratadas com controle negativo (DMSO), rosiglitazona 1  $\mu$ M (controle positivo) e, respectivamente, canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina (iSGLT-2), na concentração 10  $\mu$ M. Além disso, foi testado o efeito da rosiglitazona em associação aos iSGLT-2 para avaliar se estes últimos alterariam (ampliando ou diminuindo) o efeito adipogênico da rosiglitazona, que já é comprovado.

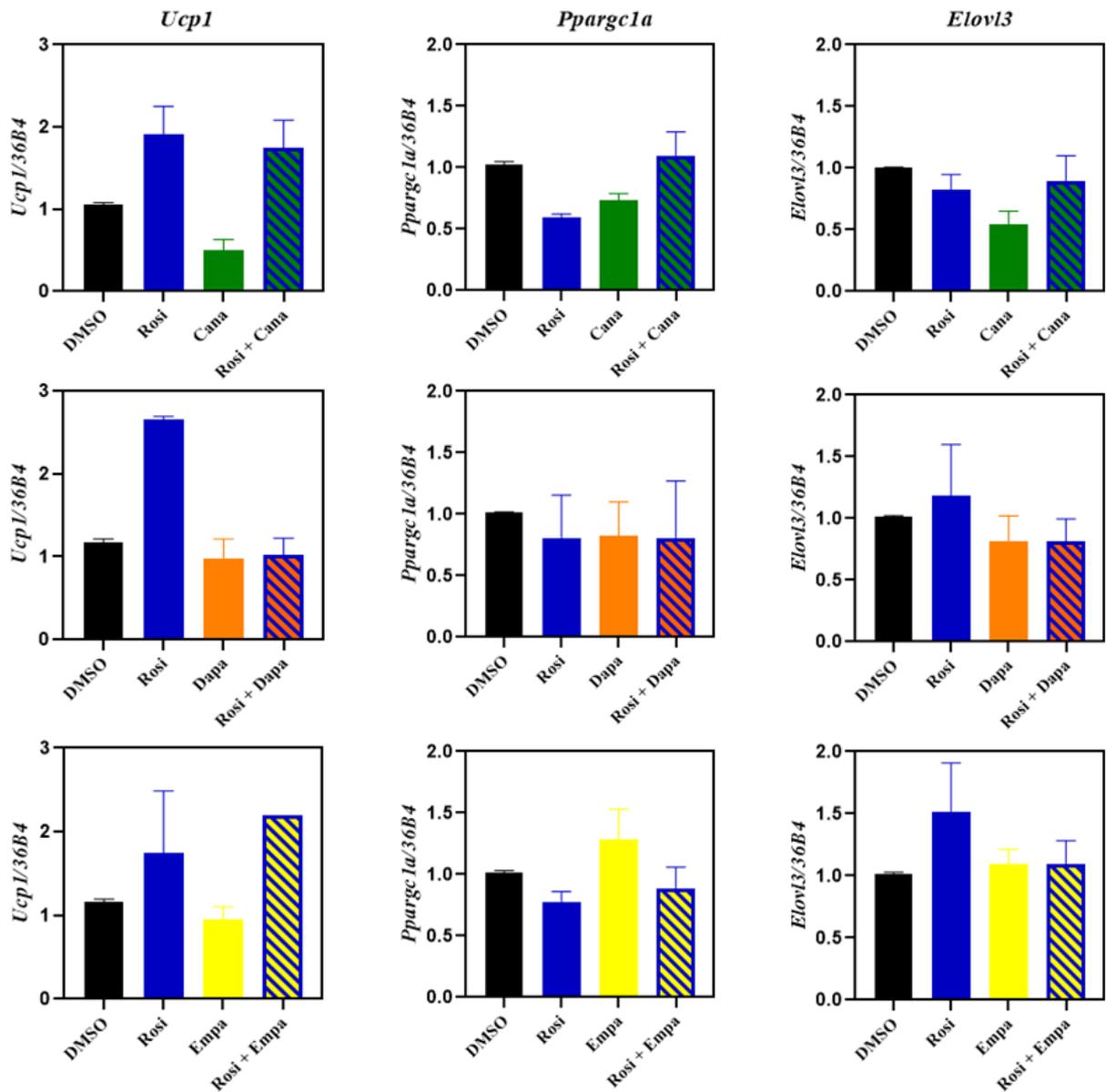
O tratamento com os iSGLT-2, canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina mostrou não influenciar na expressão de genes relacionados à adipogênese (*Fabp4*, *Pparg2* e *Fsp27*), lipólise (*Lpl* e *Ppara*) e termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Elovl3*) em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante o processo de diferenciação adipocitária em cultura, conforme apresentado nas Figura 8, 9 e 10.



**Figura 8.** O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes adipogênicos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com veículo (0,01% de DMSO), controle positivo (rosiglitazona 1 $\mu$ M), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, na concentração 10  $\mu$ M durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de genes adipogênicos, normalizado para *36B4* (gene referência). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM dos resultados em relação ao controle negativo (DMSO). Dados analisados por ANOVA, seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ . N = 3, sendo uma LP01 e duas LHCT05. Rosi: rosiglitazona; Cana: canagliflozina; Dapa: dapagliflozina; Empa: empagliflozina.



**Figura 9.** O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes lipolíticos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos. Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com veículo (0,01% de DMSO), controle positivo (rosiglitazona 1 $\mu$ M), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, na concentração 10  $\mu$ M durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de genes lipolíticos, normalizado para 36B4 (gene referência). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM dos resultados em relação ao controle negativo (DMSO). Dados analisados por ANOVA, seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ . N = 3, sendo uma LP01 e duas LHCT05. Rosi: rosiglitazona; Cana: canagliflozina; Dapa: dapagliflozina; Empa: empagliflozina.



**Figura 10. O tratamento com os iSGLT-2 não influencia na expressão de genes termogênicos em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação celular em adipócitos.** Células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano foram tratadas com veículo (0,01% de DMSO), controle positivo (rosiglitazona 1 $\mu$ M), canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, na concentração 10  $\mu$ M durante a diferenciação adipocitária com o MDI por 14 dias. Ao final do ensaio, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de genes termogênicos, normalizado para *36B4* (gene referência). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM dos resultados em relação ao controle negativo (DMSO). Dados analisados por ANOVA, seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ . N = 3, sendo uma LP01 e duas LHCT05. Rosi: rosiglitazona; Cana: canagliflozina; Dapa: dapagliflozina; Empa: empagliflozina.

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo da adipogênese frequentemente envolve células SVF derivadas do tecido adiposo, que inclui vários tipos celulares como células-tronco mesenquimais e pré-adipócitos (43). Essas células podem se diferenciar em adipócitos sob condições apropriadas, refletindo seu papel na função e metabolismo do tecido adiposo. No presente estudo, células primárias SVF do tecido adiposo subcutâneo humano foram expostas aos iSGLT-2 e avaliadas quanto ao acúmulo lipídico intracelular durante sua diferenciação celular em adipócitos. Além disso, também foi investigado a expressão do RNAm de marcadores específicos relacionados ao adipócito branco (de lipogênese e lipólise) e ao adipócito termogênico.

Os resultados deste estudo indicam que o tratamento com os iSGLT-2, canagliflozina, dapagliflozina ou empagliflozina não influencia no acúmulo lipídico intracelular de células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante o processo de diferenciação adipocitária em cultura, quando comparado com o tratamento com pioglitazona ou rosiglitazona (controles positivos). Além disso, o tratamento com esses iSGLT-2 também mostrou não influenciar na expressão de genes relacionados à adipogênese (*Fabp4*, *Fsp27* e *Pparg2*), lipólise (*Lpl* e *Ppara*) e termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Elovl3*). No entanto, é importante destacar que estudos anteriores já relataram efeitos termogênicos desses fármacos (51-53). Ainda assim, até o momento, não foram observados efeitos significativos desses medicamentos nos processos lipogênico e lipolítico, sugerindo que os mecanismos subjacentes aos efeitos metabólicos desses medicamentos podem ser mais complexos e multifacetados do que inicialmente previsto.

A adipogênese consiste no processo fisiológico de diferenciação de células precursoras em adipócitos maduros, desempenhando um papel essencial na regulação do metabolismo energético e na manutenção da homeostase lipídica. É regulada por fatores de transcrição específicos, como PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (proteína alfa de ligação ao acentuador CCAAT) (44), que promovem a expressão de genes adipogênicos, incluindo *Fabp4* e *Fsp27* e *Pparg2*. Esses genes são fundamentais para a formação e a função dos adipócitos, facilitando tanto o armazenamento de lipídios quanto a regulação metabólica (43, 45, 46).

Além da adipogênese e lipogênese, os processos de lipólise e termogênese são vitais para a manutenção do balanço energético. A lipólise é responsável pela quebra dos triglicerídeos armazenados nos adipócitos, em ácidos graxos livres e glicerol, que são liberados na circulação para fornecer energia (47). É regulada por proteínas como a lipase lipoprotéica e

o receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais, codificadas, respectivamente, pelos genes *Lpl* e *Ppara*. Essas proteínas atuam na hidrólise de triglicerídeos em lipoproteínas e na regulação da oxidação de ácidos graxos, respectivamente. Esses genes e seus produtos desempenham um papel importante na regulação do metabolismo lipídico em resposta a demandas energéticas variáveis, como o jejum ou atividade física intensa (48).

A termogênese, especialmente em adipócitos marrons, é mediada por produtos de genes específicos que facilitam a dissipação de energia na forma de calor, contribuindo significativamente para a regulação do balanço energético. Entre estes genes, destaca-se o *Ucp1*, que codifica a proteína desacopladora tipo 1 (UCP1). Essa última desempenha um papel fundamental na termogênese adaptativa ao desacoplar a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, permitindo a liberação de energia na forma de calor. *Ppargc1 $\alpha$*  é outro gene crucial, que codifica o coativador-1 $\alpha$  do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais e regula a biogênese mitocondrial, além de promover a expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, aumentando assim, a capacidade termogênica dos adipócitos marrons (49). E *Elovl3*, que codifica a elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa 3, que está envolvida na elongação de ácidos graxos de cadeia longa, uma atividade essencial para a função mitocondrial (50). Esses genes e seus produtos, portanto, regulam esse processo, destacando a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo energético e lipídico no adipócito.

Alguns estudos já evidenciaram os efeitos dos iSGLT-2 em adipócitos maduros. Yang e colaboradores (51) investigaram os efeitos da canagliflozina em adipócitos, incluindo acúmulo lipídico intracelular e expressão de genes relacionados à adipogênese. Células SVF isoladas de tecido adiposo subcutâneo de camundongos foram induzidas a se diferenciar em adipócitos maduros e, em seguida, foram tratadas com 10  $\mu$ M de canagliflozina por 48 horas. A coloração com óleo vermelho O indicou que o tratamento com esse iSGLT-2 não influenciou no acúmulo lipídico intracelular em adipócitos maduros. Adicionalmente, a análise da expressão gênica revelou que o tratamento com canagliflozina não afeta os níveis de RNAm dos genes *Fabp4* e *Lpl*. Em contraste, aumentou significativamente a expressão de *Ucp1*, sugerindo uma possível ativação da termogênese.

Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que o tratamento com canagliflozina estimula a fosforilação de AMPK (Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina) e eleva a expressão de *Ppargc1 $\alpha$* , indicando um aumento na biogênese mitocondrial e na oxidação de

ácidos graxos. A ativação de AMPK é importante para o metabolismo lipídico, pois promove a oxidação de ácidos graxos livres das reservas de gordura e inibe a lipogênese, contribuindo para a redução do acúmulo de gordura nos adipócitos e impactando diretamente a formação de novos adipócitos. Esses processos são fundamentais para a manutenção da homeostase energética e para prevenção da formação excessiva de tecido adiposo (51).

Outras pesquisas envolvendo os iSGLT-2, dapagliflozina e empagliflozina, também associam esses compostos ao aumento na expressão dos genes *Ucp1* e *Pparg1α*. Xiang e colaboradores (52) investigaram o impacto da dapagliflozina sobre o amarronzamento do tecido adiposo branco em pré-adipócitos 3T3-L1. Essas células foram diferenciadas em adipócitos maduros e, em seguida, tratadas com 0,6 mM de ácido palmítico por 24 horas para induzir o acúmulo lipídico, simulando uma condição de excesso de gordura. Esse acúmulo de lipídios foi suprimido pela introdução do tratamento com 2 μM de dapagliflozina. A coloração com óleo vermelho O confirmou uma redução significativa no acúmulo de lipídios nas células tratadas com esse composto em adipócitos maduros em uma condição excessiva de lipídeos. Além disso, o tratamento com esse iSGLT-2 também mostrou um aumento significativo na expressão dos genes *Ucp1* e *Pparg1α*. Esses resultados sugerem que a dapagliflozina tem um efeito significativo na modulação do metabolismo lipídico, promovendo a redução do acúmulo de lipídios e o aumento da capacidade termogênica dos adipócitos.

Ainda nesse estudo, observou-se um aumento na expressão de RNAm de genes relacionados à lipogênese, sob tratamento com apenas ácido palmítico, porém quando a dapagliflozina foi introduzida, esses efeitos nas células foram revertidos. O aumento na expressão de genes associados à biogênese mitocondrial e à oxidação de ácidos graxos, bem como a reversão dos efeitos lipogênicos induzidos pelo ácido palmítico, destacam o potencial terapêutico da dapagliflozina no tratamento de condições relacionadas ao excesso de gordura e à disfunção metabólica.

Xu e colaboradores (53) também exploraram os efeitos da empagliflozina no amarronzamento do tecido adiposo branco e na função mitocondrial. Pré-adipócitos 3T3-L1 foram diferenciados em adipócitos maduros e, em seguida, foram tratados com 4 μM de empagliflozina. O tratamento com esse composto diminuiu significativamente o tamanho das gotículas lipídicas e o conteúdo lipídico total dos adipócitos maduros. A expressão gênica foi analisada para avaliar os efeitos da empagliflozina na indução do fenótipo do tecido adiposo marrom e na biogênese mitocondrial. Os resultados demonstraram que o tratamento com

empagliflozina também aumentou a expressão de *Ucp1* e *Ppargc1a*. Esses achados sugerem que, assim como a dapagliflozina, a empagliflozina promove o amarronzamento do tecido adiposo branco e potencializa a produção de energia mitocondrial.

A análise do presente estudo e a comparação com essas pesquisas anteriores revelam resultados consistentes e divergentes em relação aos efeitos dos iSGLT-2 na adipogênese, lipólise e termogênese. Enquanto este estudo não encontrou mudanças significativas na expressão de genes relacionados à adipogênese, lipólise e termogênese durante a diferenciação celular em adipócitos de células humanas, outros estudos, como os de Yang (2020), Xiang (2024) e Xu (2021), relataram aumento na expressão de genes termogênicos e redução do acúmulo lipídico intracelular em adipócitos maduros de linhagens celulares murinas. As convergências entre os estudos incluem o foco na expressão de genes específicos como *Ucp1* e *Ppargc1a*, que são indicadores-chave da atividade termogênica.

As diferenças metodológicas podem explicar as discrepâncias nos resultados observados entre os estudos. O presente estudo utilizou células SVF humanas, enquanto outros estudos empregaram células SVF de camundongos ou linhagens celulares 3T3-L1. A origem das células é um fator crítico, pois células humanas podem responder de maneira diferente aos tratamentos comparadas às células murinas, devido a diferenças intrínsecas na biologia celular e na expressão gênica entre diferentes espécies (54, 55). Além disso, as condições experimentais variam significativamente entre os estudos. Por exemplo, a indução do acúmulo lipídico com ácido palmítico pode criar um ambiente celular que promove diferentes respostas metabólicas e de sinalização em comparação com as condições do presente estudo (56).

Os diferentes modelos de tratamento, como a duração da exposição aos iSGLT-2 e as concentrações utilizadas, também podem influenciar os resultados. É possível, ainda, que o efeito varie de acordo com o período da adipogênese em que o tratamento foi realizado, antes ou após a indução da diferenciação adipocitária (54). Por fim, os contextos de tratamento, incluindo fatores como o ambiente de cultivo celular, a presença de outros fatores de crescimento ou hormônios, e a saúde metabólica basal das células (57), podem influenciar significativamente as respostas aos iSGLT-2.

O presente estudo ainda considerou a possível relação entre o uso dos iSGLT-2 e a perda de massa óssea, além do aumento do risco de fraturas, preocupações comumente observadas em pacientes em tratamento com esses medicamentos. Achados anteriores indicam que as

tiazolidinedionas, como pioglitazona e rosiglitazona, promovem a diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea em adipócitos, em detrimento dos osteoblastos, resultando em perda óssea e aumento do risco de fraturas (36, 37). No entanto, os resultados desse estudo sugerem que os iSGLT-2, incluindo canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, não promovem a adipogênese em células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo humano durante sua diferenciação em adipócitos. Isso implica que, diferentemente das tiazolidinedionas, os iSGLT-2 não induzem a conversão de células precursoras em adipócitos, preservando a população de precursores osteogênicos e evitando a perda óssea associada. Não é possível descartar, contudo, que em células precursoras originadas da medula óssea, o efeito fosse diferente do observado no presente estudo, de modo que a origem da célula precursora adipocitária poderia ter influência sobre os fatores capazes de modificar a diferenciação em adipócitos.

Adicionalmente, os iSGLT-2 podem afetar a saúde óssea por mecanismos indiretos, como a modulação de fatores hormonais e metabólicos que influenciam a remodelação óssea (58). Por exemplo, a redução dos níveis de glicose plasmática, um efeito esperado dos iSGLT-2, pode influenciar negativamente a atividade osteoblástica. Além disso, a glicosúria induzida pelos iSGLT-2 pode levar à perda de minerais essenciais através da urina, contribuindo para a redução da densidade mineral óssea. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos precisos pelos quais os iSGLT-2 afetam a saúde óssea, incluindo a análise da expressão de genes osteogênicos e a homeostase mineral, a fim de determinar a segurança a longo prazo desses medicamentos sem comprometer a saúde óssea dos pacientes.

Entre os pontos fortes do presente estudo, destacam-se o uso de células primárias humanas, com maior potencial de reproduzir os processos fisiológicos e patológicos que ocorrem *in vivo*, além do uso dos diferentes iSGLT-2 atualmente em uso clínico, a canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina. Além disso, foi analisada a expressão de genes que codificam produtos relacionados a diferentes processos fisiológicos no adipócito, a adipogênese/lipogênese, lipólise e termogênese. Como limitações, destaca-se o uso de um único tipo de precursor adipocitário, as células SVF derivadas de tecido adiposo subcutâneo. Considerando que células precursoras provenientes de outros depósitos de tecido adiposo, ou mesmo da medula óssea ou do sangue do cordão umbilical, podem ser influenciadas de modo diferente no decorrer do processo de adipogênese, não é possível extrapolar o resultado de

ausência e influência do iSGLT-2 no processo de diferenciação adipocitária de outros tipos celulares.

Em conclusão, os dados do presente estudo sugerem que a exposição de células SVF derivadas do tecido adiposo subcutâneo humano aos iSGLT-2, incluindo canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina, não influencia no acúmulo lipídico intracelular ou na expressão de genes relacionados à adipogênese, lipólise e termogênese durante a diferenciação em adipócitos. Além disso, a preservação da população de precursores osteogênicos sugere um potencial perfil mais seguro dos iSGLT-2 em relação à saúde óssea, comparado às tiazolidinedionas. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais esses medicamentos afetam o metabolismo lipídico e a saúde óssea, a fim de garantir sua segurança e eficácia a longo prazo no tratamento de desordens metabólicas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOULART, F.A.A. **Doenças crônicas não transmissíveis: estratégias de controle e desafios para os sistemas de saúde**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2011.
2. MALTA, D.C.; MERHY, E.E. O percurso da linha do cuidado sob a perspectiva das doenças crônicas não transmissíveis. **Interface Comunic. Saúde. Educ.**, v. 14, n. 34, p. 593-605, 2010.
3. **BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**. Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
4. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Diabetes. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> >. Acesso em: 11 mar. 24.
5. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Clannad, 2019. Disponível em: < <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf> >. Acesso em: 11 mar. 2024.
6. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Classificação do diabetes. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2023**. Disponível em: < <https://diretriz.diabetes.org.br/classificacao-do-diabetes/> >. Acesso em: 11 mar. 2024.
7. SMELTZER, S.C.; BARE, B.G. Brunner & Suddarth: Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. 9a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2002.
8. DA CONCEIÇÃO, R.A.; DA SILVA, P.N.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o Tratamento do Diabetes Tipo II: Uma Visita ao Passado e um Olhar para o Futuro. **Rev. Virtual Quim.**, v.9, n. 2, p. 514-534, 2017.
9. SZEKERES, Z.; TOTH, K.; SZABADOS, E. The Effects of SGLT2 Inhibitors on Lipid Metabolism. **Metabolites**. v. 11, n. 87, 2021.
10. DONG, B. et al. The Extraglycemic Effect of SGLT-2is on Mineral and Bone Metabolism and Bone Fracture. **Front. Endocrinol.** (Lausanne)., v. 13, e918350, 2022.
11. SOUSA, C. T. et al. Os inibidores do cotransportador de sódio e glicose 2 são alternativas viáveis no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2? **Electronic Journal of Pharmacy**, v. XII, n. 4, p. 93-100, 2015.
12. STEVEN, S. et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. **Redox Biology**., v. 13, p. 370–385, 2017.
13. SINGH, M.; KUMAR, A. Risks Associated with SGLT2 Inhibitors: An Overview. **Current Drug Safety**., v. 13, n. 2, 2018.
14. DA SILVA, D. G. et al. Inibidores do cotransportador de sódio e glicose do tipo 2: efeitos além da glicosúria. **Brasília Med.**, v. 52, n. 3/4, p. 116-125, 2015.

15. SCHEEN, A. J. SGLT2 Inhibitors: Benefit/Risk Balance. **Current Diabetes Reports.**, Volume 16, n. 92, 2016.
16. SCHEEN, A. J. An update on the safety of SGLT2 inhibitors. **Expert Opinion on Drug Safety**, 2019.
17. YARIBEYGI, H.; MALEKI, M.; REINER, Z.; JAMIALAHMADI, T.; SAHEBKAR, A. Mechanistic View on the Effects of SGLT2 Inhibitors on Lipid Metabolism in Diabetic Milieu. **J. Clin. Med.**, v.11, n.21, p. 6544, 2022.
18. NEAL, B.; PERKOVIC, V.; MAHAFFEY, K.W. et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v. 377, p. 644-657, 2017.
19. WIVIOTT, S.D.; RAZ, I.; BONACA, M.P. et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v. 380, p. 347-357, 2019.
20. ZINMAN, B.; WANNER, C.; LACHIN, J.M. et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v. 373 p. 2117-2128, 2015.
21. FERNANDEZ-FERNANDEZ, B. et al. Canagliflozin and Renal Events in Diabetes with Established Nephropathy Clinical Evaluation and Study of Diabetic Nephropathy with Atrasentan: what was learned about the treatment of diabetic kidney disease with canagliflozin and atrasentan? **Clin Kidney J.**, v. 12, n. 3, p. 313-321, 2019.
22. NELINSON, D. S.; SOSA, J. M.; CHILTON, R. J. SGLT2 inhibitors: a narrative review of efficacy and safety. **J. Osteopath. Med.**, v. 121, n.2, p. 229–239, 2021.
23. WANNER, C.; INZUCCHI, S.E.; LACHIN, J.M.; et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, p. 323–334, 2016.
24. SINGH, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Safety of SGLT2 Inhibitors in Patients with Diabetes Mellitus. **Current Drug Safety.**, v. 14, 2019.
25. DONNAN, J.R.; GRANDY, C.A.; CHIBRIKOV, E., et al. Comparative safety of the sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open.**, v. 9, e022577, 2019.
26. MCGILL, J. B.; SUBRAMANIAN, S. Safety of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors. **The American Journal of Cardiology.**, v. 124, Issue S1, 2019.
27. ALBA, M.; XIE, J.; FUNG, A.; DESAI, M. The effects of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, on mineral metabolism and bone in patients with type 2 diabetes mellitus. **Current medical research and opinion**, v. 32, p. 1375-1385, 2016.
28. BILEZIKIAN, J.P. et al. Evaluation of bone mineral density and bone biomarkers in patients with type 2 diabetes treated with canagliflozin. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 101, p. 44-51, 2016.
29. WATTS, N. B. et al. Effects of canagliflozin on fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism.**, v. 101, p. 157-166, 2016.

30. PERKOVIC, V. et al. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine*, v. 380, p. 2295-2306, 2019.
31. FRALICK, M. et al. Fracture risk after initiation of use of canagliflozin: a cohort study. ***Annals of internal medicine***, v. 170, p.155-163, 2019.
32. MANCINI, S.J. et al. Canagliflozin inhibits interleukin-1beta-stimulated cytokine and chemokine secretion in vascular endothelial cells by AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms. ***Scientific reports***, v. 8, n. 5276, 2018.
33. HAWLEY, S. A., et al. The Na<sup>+</sup>/Glucose Cotransporter Inhibitor Canagliflozin Activates AMPK by Inhibiting Mitochondrial Function and Increasing Cellular AMP Levels. ***Diabetes.***, v. 65, 2016.
34. SCHMIDT, K.; SCHMIDT, A.; GROß, S.; JUST, A.; PFANNE, A.; FUCHS, M.; JORDAN, M.; MOHR, E.; PICH, A.; FIEDLER, J.; THUM, T. SGLT2 inhibitors attenuate endothelial to mesenchymal transition and cardiac fibroblast activation. ***Sci. Rep.***, v. 14, n. 1, p.16459, 2024.
35. VILLANI, L. A. The diabetes medication Canagliflozin reduces cancer cell proliferation by inhibiting mitochondrial complex-I supported respiration. ***Molecular metabolism.***, v. 5, p. 1048-1056, 2016.
36. JACKSON, K.; MOSELEY, K. F. Diabetes and Bone Fragility: SGLT2 Inhibitor Use in the Context of Renal and Cardiovascular Benefits. ***Curr. Osteoporos. Rep.***, 2020.
37. VESTERGAARD, P. Bone metabolism in type 2 diabetes and role of thiazolidinediones. ***Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.***, v. 16, p. 125–131, 2009.
38. HAN, S. et al. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. ***Crit Rer Eukaryot Gene Expr.***, v. 25, n. 2, p. 145-152, 2015.
39. ROSEN, E. D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. ***Genes Dev.***, v. 14, n. 11, p. 1293-1307, 2000.
40. CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; AND RUTTER, W. Z. Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonucleases. ***Biochem.***, v. 18, p. 5294-5299, 1979.
41. VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, v. 76, p. 615-619, 1979.
42. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. ***Anal Biochem.***, v. 162, n. 1, p.156-159, 1987.
43. GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. ***Physiol. Rev.***, v. 78, p. 783-809, 1998.
44. DE QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab.***, v. 53, n. 5, 2009.

45. CHANG, R. C et al. Cannabidiol Promotes Adipogenesis of Human and Mouse Mesenchymal Stem Cells via PPAR $\gamma$  by Inducing Lipogenesis but Not Lipolysis. **Biochem Pharmacol.**, v. 197, 114910, 2022.
46. NTAMBI, J. M.; KIM, Y. C. Adipocyte differentiation and gene expression. **J. Nutr.**, v. 130, p. 3122S-3126S, 2000.
47. DUNCAN, R.E.; AHMADIAN, M.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 27, p. 79-101, 2007.
48. ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R.; EICHMANN, T.O.; KOHLWEIN, S.D.; HAEMMERLE, G.; LASS, A.; MADEO, F. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metab.**, v. 15, n. 3, p. 279-291, 2012.
49. PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocr. Rev.**, v. 24, n. 1, p. 78-90, 2003.
50. WESTERBERG, R. et al. ELOVL3 is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 8, p. 4958-4968, 2006.
51. YANG, X. et al. The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-Sirt1-Pgc-1 $\alpha$  signalling pathway. **Adipocyte**, v. 9, n. 1, p. 484-494, 2020.
52. XIANG, L. et al. Dapagliflozin promotes white adipose tissue browning though regulating angiogenesis in high fat induced obese mice. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v.25, n. 26, 2024.
53. XU, L. et al. Empagliflozin Induces White Adipocyte Browning and Modulates Mitochondrial Dynamics in KK Cg-Ay/J Mice and Mouse Adipocytes. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 745058, 2021.
54. CRISTANCHO, A.G.; LAZAR, M.A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 12, n. 11, p. 722-734, 2011.
55. ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, n. 7121, p. 847-853, 2006.
56. LISTENBERGER, L.L et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 100, n. 6, p. 3077-3082, 2003.
57. ROSEN, E.D; SPIEGELMAN, B.M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 20-44, 2014.
58. WANG, J.; LI, X.; LI, Y.; LEI, C. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on bone metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **BMC Endocr. Disord.**, v. 24, n. 1, p. 52, 2024.