

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCIÉLE ROMERO MACHADO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA HISTONA DEACETILASE 3 EM UM MODELO DE
OBESIDADE EM CAMUNDONGOS**

Uruguiana

2018

FRANCIÉLE ROMERO MACHADO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA HISTONA DEACETILASE 3 EM UM MODELO DE
OBESIDADE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^a Dr^a. Silvana Peterini Boeira

Coorientador: Prof^o Dr. Leandro Cattelan Souza

Uruguiana

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M149e Machado, Franciéle Romero
Efeito da inibição da histona deacetilase 3 em um modelo de
obesidade em camundongos / Franciéle Romero Machado.
58 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2018.
"Orientação: Silvana Peterini Boeira".

1. Epigenética. 2. Hiperlipídica. 3. Metabolismo. 4.
Inflamação. I. Título.

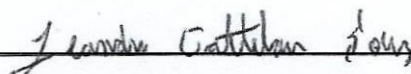
FRANCIÉLE ROMERO MACHADO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA HISTONA DEACETILASE 3 EM UM MODELO DE
OBESIDADE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 18 de julho de 2018.

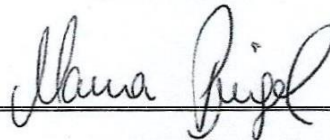
Banca examinadora:



Prof^o. Dr. Leandro Cattelan Souza

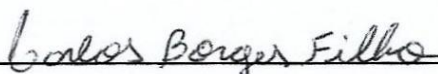
Coorientador

UNIPAMPA



Prof^a. Dr^a. Marina Prigol

UNIPAMPA



Dr. Carlos Borges Filho

UNIPAMPA

Dedico esta dissertação aos meus pais Nelton e Cleudir, professores e amigos que acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso. Que através de palavras me motivam a prosseguir estudando.

AGRADECIMENTOS

Primariamente agradecer a Deus que é minha força, pois através da fé pude vencer meus medos e concluir as etapas necessárias para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Nelton e Cleudir pelo seu apoio, motivação em prosseguir meus estudos, sempre torcendo pelas minhas realizações. Pela compreensão durante minha rotina de estudante e mais ainda pelo seu amor.

Ao meu namorado Fabrício pelo seu amor e sua amizade, por sempre me motivar e acreditar no meu potencial.

A minha orientadora Dra. prof^a Silvana Boeira por todos os ensinamentos prestados ao decorrer da pós, desde a produção do projeto, ensinamentos relacionados à docência e todos os processos até conclusão dessa dissertação.

Ao Dr. prof^o Cristiano Jesse pela atenção ao sanar as dúvidas que tive durante a pós e por todos os aprendizados. Além de sua participação e suas contribuições para a execução dessa pesquisa.

Ao meu coorientador prof^o Dr. Leandro Cattelan pela coorientação e sua colaboração muito importante prestada nessa dissertação.

Aos membros do LAFTAMBIO pela convivência, ajuda para condução do experimento e pelas amizades durante a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelas vivências proporcionadas e aos professores que me possibilitaram novos conhecimentos e me despertaram mais o interesse pela ciência.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento para execução dessa pesquisa e por ter me concedido a bolsa de mestrado.

“A pesquisa é um questionamento constante, enraizado em nós desde que nascemos. Esse questionamento é nossa meta e assim como é nossa vida, buscar algo novo sempre se faz necessário”.

Franciéle Machado

RESUMO

A epigenética é o estudo das mudanças hereditárias relacionadas à expressão gênica sem envolver alterações na sequência do DNA. Dentre os mecanismos epigenéticos, a deacetilação das histonas catalizada por histonas deacetilases (HDACs) reprimem a transcrição. Fatores dietéticos influenciam as histonas, sendo importante interligar obesidade e aspectos epigenéticos. A HDAC3 ainda é pouco relatada em estudos metabólicos e pode ser inibida pelo RGFP966, inibidor seletivo tipo benzamida. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da HDAC3 em camundongos induzidos à obesidade via dieta hiperlipídica. Trata-se de um estudo experimental conduzido com 32 camundongos C57BJ/6 adultos (n=8), onde foram administradas dieta padrão (NPD) ou dieta rica em lipídeos (HFD) por 120 dias. Durante o dia 91 ao dia 120 dia foi administrado o RGFP966 (50 mg/kg; via subcutânea) para causar a hiperacetilação. O peso corporal foi aferido semanalmente e no 120º dia os animais foram submetidos à eutanásia com pentobarbital (180 mg/kg; via intraperitoneal) e o sangue e o hipocampo foram coletados para as análises bioquímicas. Foram analisados os seguintes parâmetros sanguíneos: glicose, insulina, perfil lipídico, leptina e adiponectina. No hipocampo foram analisados: interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os resultados do presente estudo demonstraram que a HFD aumentou o peso corporal, os níveis plasmáticos de glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) comparado ao controle, enquanto o RGFP966 (50 mg/Kg) reduziu esses níveis. A lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma teve valores menores nos camundongos com HFD, contudo o uso do RGFP966 levou ao acréscimo significativo dessa lipoproteína. As interleucinas IL-6, IL-1 β e TNF- α no hipocampo aumentaram significativamente no grupo com HFD comparando com o grupo NPD. Em contraste, o inibidor RGFP966 reduziu as interleucinas, atenuando o processo inflamatório causado pela HFD. Quanto aos níveis de adipocinas, a HFD aumentou drasticamente os níveis de leptina e reduziu os níveis de adiponectina no plasma. O uso do inibidor atenuou essas alterações, pois sua administração no grupo HFD evitou a redução da adiponectina e o aumento da leptina, atuando na regularização da sinalização da ingesta alimentar e homeostase energética. Constata-se que a inibição seletiva da HDAC3 pelo RGFP966 modulou as alterações no peso corporal, parâmetros bioquímicos, adipocinas no sangue e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo mesmo com administração de HFD, evidenciando que a enzima HDAC3 está envolvida nas alterações decorrentes da obesidade. Assim, a inibição da HDAC3 pode proteger contra o ganho de peso, alterações metabólicas e inflamatórias demonstrando ser um importante alvo terapêutico para estudos relacionados à obesidade.

Palavras-chave: Epigenética. Dieta Hiperlipídica. Metabolismo. Inflamação

ABSTRACT

Epigenetics is the study of hereditary changes related to gene expression without involving changes in DNA. Among the epigenetic mechanisms, histone deacetylase-catalyzed histone deacetylation (HDACs) represses the transcription. Dietary factors influence the histones, being important to interconnect obesity and epigenetic aspects. HDAC3 is still poorly reported in metabolic studies and may be inhibited by RGFP966, a selective inhibitor of the type benzamide. The objective of present study was to investigate the role of HDAC3 in mice induced to obesity via a hyperlipid diet. This is an experimental study conducted with 32 C57BJ / 6 adult mice (n = 8), where normal pellet diet (NPD) or high fat diet (HFD) were administered for 120 days. During the day 91 to day 120 was administered the RGFP966 (50 mg/kg; subcutaneously via) to cause hyperacetylation. Body weight was measured weekly and on day 120 animals were euthanized with pentobarbital (180 mg/kg; intraperitoneal via) and the blood and the hippocampus were collected for biochemical analysis. The following blood parameters were analyzed: glucose, insulin, lipid profile, leptin and adiponectin. In the hippocampus were analyzed: interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The results of the present study demonstrated that HFD increased body weight, plasma glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol and low density lipoprotein (LDL) levels compared to control, while RGFP966 (50 mg / kg) reduced these levels. Plasma high density lipoprotein (HDL) had lower values in HFD mice, however the use of RGFP966 led to a significant increase of this lipoprotein. The interleukins IL-6, IL-1 β and TNF- α in the hippocampus increased significantly in the HFD group compared to the NPD group. In contrast, the inhibitor RGFP966 reduced interleukins, attenuating the inflammatory process caused by HFD. As for adipokine levels, HFD dramatically increased leptin levels and reduced plasma adiponectin levels. The use of the inhibitor attenuated these changes, since its administration in the HFD group avoided the reduction of adiponectin and the increase of leptin, acting in the regularization of food intake signaling and energetic homeostasis. It was found that the selective inhibition of HDAC3 by RGFP966 modulated changes in body weight, biochemical parameters, blood adipokines and proinflammatory cytokines in the hippocampus even with HFD administration, evidencing that the HDAC3 enzyme is involved in the alterations resulting to obesity. Thus, the inhibition of HDAC3 may protect against weight gain, metabolic and inflammatory changes proving to be an important therapeutic target for studies related to obesity.

Keywords: Epigenetic. Hyperlipidic Diet. Metabolism. Inflammation

SUMÁRIO

PARTE I

1 INTRODUÇÃO	10
2 EPIGENÉTICA	11
3 HISTONAS E MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	13
3.1 Histonas Deacetilases	17
3.2 Histona Deacetilase 3	19
3.3 Inibidores de Deacetilases	20
3.3.1 Inibidor RGFP966.....	23
4. OBESIDADE	24
4.1 Obesidade e modelo de dieta hiperlipídica.....	25
4.2 Obesidade e Epigenética	27
5 OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo geral	29
5.2 Objetivos específicos	29

PARTE II

Abstract	31
1. Introduction.....	32
2. Materials and Methods	34
2.1 Reagents	34
2.2 Animals.....	34
2.3 Experimental protocol.....	34
2.4 Biochemical parameters	35
2.5 Adipokines levels.....	35
2.5 Inflammatory parameters.....	35
2.7 Statistical Analysis.....	36
3. Results	36
3.1 Increase of the body weight.....	36

3.2 The analysis of the biochemical parameters	36
3.3 Effect of HFD and RGFP966 in the inflammatory parameters.....	37
3.4 Effects of inhibition of HDAC3 in adipokines	38
4. Discussion	38
5. References	44

PARTE III

CONCLUSÃO.....	50
PERSPECTIVAS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO.....	58

1 INTRODUÇÃO

A epigenética descreve as interações entre o genótipo e o ambiente, formadores de traços característicos definidos como fenótipo. Os mecanismos epigenéticos afetam a expressão gênica e como os genes são expressos sem alterar o sequenciamento do DNA (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009).

As modificações epigenéticas podem ocorrer pela modulação estrutural da cromatina afetando a transcrição, pois alteram sua conformação permitindo o acesso dos fatores transcricionais. Nesse processo ocorre ativação da transcrição via Histonas acetiltransferases (HATs) ou repressão da transcrição via histonas deacetilases (HDACs). As HDACs são enzimas que participam na remoção de grupos acetil de resíduos acetilados das histonas reprimindo a transcrição gênica (ALLS et al., 2007).

As HDACs podem ser inibidas por compostos que atuam inibindo a deacetilação da lisina dentro das caudas N-terminais da histona resultando na hiperacetilação destas, uma vez que o equilíbrio entre HATs e HDACs é afetado. Os alvos farmacológicos com inibidores são um alvo promissor em pesquisas que envolvem o tratamento do câncer, doenças neurológicas, sinalização hormonal e doenças metabólicas (SETO & YOSHIDA, 2014).

A inibição, por exemplo, atua na melhora de déficits cognitivos na doença de Alzheimer, doença de Huntington; sinalização da insulina, aumento da captação de glicose; processos celulares como apoptose, necrose, crescimento celular. Existem vários tipos de inibidores, inibidores de amplo espectro e inibidores seletivos. Entre esses inibidores está o composto RGFP966 que é um inibidor seletivo da HDAC3 pertencente à classe I (JIA et al., 2016; REMSBERG et al., 2016; SUN et al., 2012).

Diante do crescente aumento da obesidade na população, a inibição da HDAC3 pelo RGFP966 trata-se de um alvo potencial para pesquisas que visam elucidar mecanismos epigenéticos e sua relação com patologias decorrentes da alimentação. A obesidade é caracterizada pelo excesso de gordura corporal decorrente da elevada ingestão de calorias e baixo gasto energético, favorecendo um desbalanço energético. Além disso, vários aspectos contribuem para o desenvolvimento da obesidade, como comportamento, ambiente, fatores genéticos e epigenéticos (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017; HARVEY & FERRIER, 2012). Dentre

os efeitos adversos estão o elevado risco de aterosclerose, Diabetes Mellitus (DM) Tipo 2, câncer e envolvimento da obesidade em processos neurodegenerativos (FONTANA & HU, 2014).

É fato que fatores dietéticos ou nutricionais podem intervir na epigenética, no qual a dieta e nível de massa corporal de obesos influenciam tais mecanismos modificando a expressão gênica de um indivíduo (PARK et al., 2017). Exemplificando, segundo estudos anteriores a HDAC9 relaciona-se com a obesidade, visto que possui função no tecido adiposo e potencial terapêutico na obesidade. Ainda, a expressão de HDAC5 pode estar modificada em ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura e esta enzima é primordial a sinalização da leptina e ingesta alimentar (CHATTERJEE et al.; 2014; KABRA et al., 2016). No entanto, não se sabe qual função da HDAC3 e sua influência na obesidade pela sua inibição.

Assim, busca-se neste trabalho elucidar quais as alterações causadas pela inibição seletiva da HDAC3 em animais induzidos à obesidade. A obesidade pode ser capaz de influenciar os mecanismos epigenéticos e propiciar alterações a nível metabólico, as quais são condicionadas pela obesidade e dietas ricas em gordura. Cabe compreender, se a inibição da HDAC3 pelo inibidor RGFP966 resultaria na regulação das desordens intrínsecas causadas através de uma dieta rica em gordura, tais como no perfil bioquímico, hormonal e inflamatório.

2 EPIGENÉTICA

O termo Epigenética foi designado por Conrad Waddington (1905-1975) em 1942, conceituado como: “a interação causal entre genes e seus produtos formam um fenótipo”, sendo utilizado para descrever interações relacionadas entre o genótipo e o ambiente, formadores de traços característicos definidos como fenótipo. O significado do termo é originado de epi- (grego: επί – sobre, acima, exterior) – genética. Resumidamente epigenética é o mecanismo exógeno que modifica a expressão dos genes, ou seja, a forma como os genes são expressos sem alterar a sequência do DNA (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009).

As alterações epigenéticas podem ser herdadas ao longo do tempo por meio de divisões subsequentes da célula, sendo que cada tipo celular possui seu próprio

perfil e expressão gênica única, inclusive a cromatina com uma assinatura distintiva e que pode modular a transcrição dos genes (ALLS et al., 2007; SHA & BOYER, 2009). A conformação estrutural da cromatina explica a origem das modificações epigenéticas, pois cada tipo de célula em nosso corpo é geneticamente idêntica, porém há uma diferenciação fenotípica em outros tipos de células e tecidos. Assim, as células desempenham diferentes papéis em vários tecidos, o que possibilita o funcionamento normal do corpo humano (SADIKOVIC et al., 2008).

A regulação epigenética possui como agentes atuantes os corretores transcripcionais ou cofatores, responsáveis pelo recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina. Os corretores são agentes intermediários, que interagem com os fatores de transcrição e enzimas modificadoras da cromatina. De acordo com a natureza do corretor é determinada a sua ação, como coativadores exercendo papel ativador ou correpressor, o qual atua inibindo a transcrição (PERISSI et al., 2010). Frequentemente os corretores agem como uma plataforma para que proteínas adicionais reguladoras sejam ligadas, pois coativadores e correpressores recrutam respectivamente as Histonas acetiltransferases (HATs) e Histonas deacetilases (HDACs) (MOTTIS; MOUCHIROUD; AUWERX, 2013).

Os mecanismos epigenéticos podem ser influenciados pelo estilo de vida e pela dieta modificando a expressão dos genes. Os componentes inclusos na dieta modificam uma série de mecanismos como a estabilidade do genoma, expressão de proteínas e mudanças a nível metabólico. Os componentes bioativos da alimentação estão nas causas de doenças crônicas como doença cardiovascular, diabetes e câncer (VAHID et al., 2015).

Além disso, mecanismos reguladores epigenéticos são de suma importância para o correto funcionamento neural, desde mecanismos básicos como replicação de DNA, regulação da transcrição, reparo do DNA e regulação do ciclo celular (PODOBINSKA et al., 2017).

O estudo da epigenética abrange um campo de pesquisa complexo e que visa compreender mais profundamente os mecanismos de diversas doenças, as quais têm sido alvo dos pesquisadores ao decorrer dos anos. Dentre os diversos mecanismos que podem ser abordados, as modificações epigenéticas são eventos fisiológicos de um organismo e podem implicar de alguma forma no desenvolvimento ou tratamento de doenças. Por exemplo, sabe-se que o desenvolvimento de

síndromes metabólicas se associa a fatores genéticos, mas também ambientais que incluem dieta e prática de exercício. Isso é válido, pois o ambiente pode participar na regulação da expressão de genes interligados ao metabolismo dos lipídeos e carboidratos através da alteração do epigenoma, que contempla também padrões de acetilação de histona alterados na cromatina (DESVERGNE; MICHALIK; WAHLI, 2006).

Ademais, existe uma vasta abordagem sobre a epigenética e o desenvolvimento de vários tipos de câncer. Vários fatores levam ao crescimento maligno do câncer nos indivíduos, sejam anormalidades epigenéticas e genéticas. As alterações epigenéticas particularmente ocorrem de forma precoce durante o crescimento neoplásico até se desenvolver um tumor maligno (SADIKOVIC et al., 2008).

Portanto o enfoque nessa temática abrangendo o campo da epigenética está cada vez mais crescente, porém a abordagem sobre aspectos metabólicos e nutricionais ainda permanece escassa.

3 HISTONAS E MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

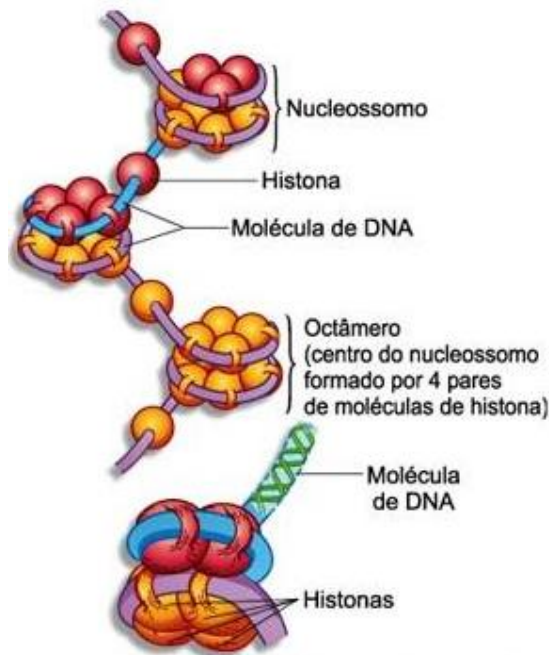
Nas células eucarióticas a cromatina é composta pelo DNA, histonas e proteínas não histonas. A organização é pelo nucleossomo, unidade de DNA dividida em duas espirais que se enrolam em torno dos octâmeros constituídos de quatro proteínas histonas (COSGROVE & WOLBERGER, 2005).

Os nucleossomos são a unidade básica da cromatina, composto por 147 pares de bases de DNA ao redor de um octâmero. Acreditava-se que a função estrutural que permitia a condensação e organização do DNA no núcleo celular fosse à única função, porém foi descoberta sua função no controle da expressão gênica. Essa expressão poderia ser afetada pela interação das proteínas componentes do nucleossomo com o DNA, ocorrendo maiores ou menores interações entre ambos (COSGROVE & WOLBERGER, 2005)

As histonas que formam o octâmero estão sob forma de dímero H2A-H2B e tetrâmero H3-H4 associado com a histona H1 que é o ligante que une os nucleossomos. Esse octâmero é constituído de duas unidades cada de H2A, H2B, H3 e H4 (LUGER et al., 2012; RAMAKRISHNAN, 1997). Já a histona H1 não está presente no centro nucleossômico, porém está ligada a cadeia de DNA ligante. A

especificidade dessa histona é maior quanto ao tecido e à espécie, de forma que desempenham papel importante ao facilitar o empacotamento dos nucleossomos em estruturas mais compactas (HARVEY & FERRIER, 2012). Na Figura 1 pode ser observado como o DNA é enovelado pelas histonas formando o octâmero.

Figura 1- Organização molecular da cromatina



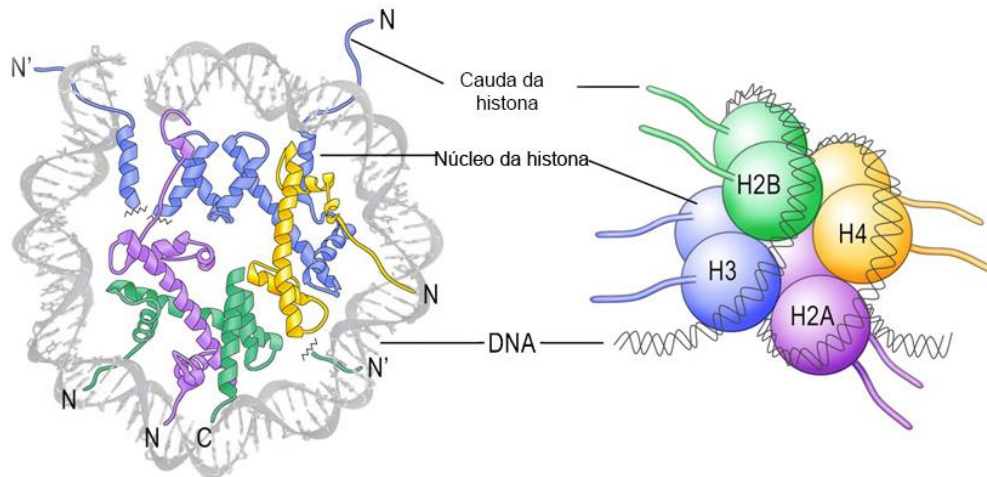
Fonte: CHI et al. (2010)

Quimicamente as histonas são pequenas proteínas constituídas de um domínio globular C-terminal (carboxi-terminal) e uma cauda N-terminal (amino-terminal) e são altamente básicas. As histonas são carregadas positivamente em pH fisiológico, devido seu alto conteúdo de lisina e arginina que confere estabilidade estrutural do núcleo e na compactação da cromatina. Assim, as ligações iônicas com as histonas são formadas, pois o DNA é carregado negativamente unindo as cargas opostas.

As histonas possuem um domínio central na interação histona-histona e no enrolamento do DNA em volta do nucleossomo e um segundo domínio próximo ao exterior da partícula do nucleossomo montado. Este é o domínio N-terminal (amino-terminal) rico em lisina e o local para as interações covalentes (NELSON & COX, 2014). Na Figura 2 são apresentados os domínios C-terminal e a cauda N-terminal das histonas.

Tanto as histonas e os íons positivamente carregados neutralizam grupos fosfato do DNA carregados negativamente. A interação internucleossômica entre as caudas N-terminais e DNA ou outros locais de histonas possibilita a estrutura dos nucleossomos (HARVEY & FERRIER, 2012).

Figura 2- A relação entre as histonas e o DNA



Adaptado de: GRÄFF & MANSUY (2008)

Os eucariotos tem a conformação estrutural da cromatina alterada por ações enzimáticas das histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDAC), ocorrendo ativação ou repressão da transcrição de genes como parte do controle epigenético. Várias formas de cromatina podem ser encontradas ao longo dos cromossomos e aproximadamente 10% da cromatina em uma célula eucariótica estão em forma mais condensada que no restante da cromatina (NELSON & COX, 2014). A heterocromatina é a cromatina na forma condensada com transcrição inativa enquanto a outra porção, menos condensada é denominada eucromatina.

Quando em regiões da cromatina ocorre a expressão ativa de genes, estas regiões são parcialmente descondensadas e denominam-se como eucromatina, ou seja, parte da eucromatina, mas não toda é ativa na transcrição. As regiões ativas dos cromossomos são diferentes da heterocromatina de três formas: modificação covalente dos nucleossomos, posicionamento dos nucleossomos e presença de variantes de histonas. O processo de remodelação da cromatina envolve uma série de enzimas (NELSON & COX, 2014).

Um mecanismo regulador da estrutura da cromatina e transcrição dos genes é o estado de acetilação das histonas. A acetilação é um processo reversível e relacionado à ativação transcricional, enquanto a desacetilação representa a repressão transcricional de genes. Existem dois tipos de enzimas que possibilitam o equilíbrio entre estado acetilado e deacetilado das histonas: HATs e HDAC, respectivamente (PANG & ZHUANG, 2010).

As HATs são enzimas catalizadoras da transferência de grupos acetil, utilizando Acetil-CoA como doador de grupo acetila para o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina da histona. É um processo comum e seus níveis relacionados com a ativação da transcrição na cromatina através neutralização da carga positiva das histonas por ação nos seus grupos ϵ -amino. A adição de acetil ao grupo amino de resíduos lisina, diminui as interações eletrostáticas entre DNA e a cauda de histona, resultando no rearranjo da cromatina em forma estrutural relaxada. Desta forma, com o DNA exposto é facilitado o acesso dos fatores de transcrição ao gene-alvo e ocorrem significativos acréscimos na transcrição gênica (VERDONE; CASERTA; DI MAURO, 2005).

Cabe ressaltar que a acetilação de resíduos de lisina também pode ocorrer em proteínas não histonas, como os fatores de transcrição afetando a transcrição gênica e demais processos da célula (SETO & YOSHIDA, 2014)

As HATS podem categorizadas em dois tipos, de acordo com o local onde são encontradas no organismo: Tipo A, encontradas no núcleo e participam na transferência de grupo acetil (Acetil-CoA) para o grupo ϵ -NH₂ da N-cauda da histona, divididas em três subclasses. Quanto as HATs do Tipo B: atuam no citoplasma mediante transferência de grupo acetil (Acetil-CoA) para ϵ -NH₂ da histona livre antes da deposição no DNA (PESERICO & SIMONE, 2011). A doação do Acetil-Coa para acetilação é proveniente do *pool* citoplasmático, enquanto o *pool* mitocondrial é obtido para a produção energética. O processo de acetilação gera um acetato livre que se incorpora à Coenzima A (CoA) através da enzima Acetil-Coa sintase II (SAKAKIBARA et al., 2009).

As HDACs possuem uma ação antagônica às HATs, visto que catalizam a remoção de grupos acetil de resíduos acetilados, restaurando a carga positiva. Confere a cromatina uma estrutura densa e condensada regulando e reprimindo a transcrição (SETO & YOSHIDA, 2014).

Alguns substratos regulam positivamente a ação das HDACs como acetil-CoA, malonil-CoA e HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA), enquanto que CoA livre inibe a atividade das HDACs. Os estudos cinéticos demonstram que os intermediários metabólicos podem influenciar na atividade das HDACs (VOGELAUER et al., 2012).

Estudos anteriores avaliaram os papéis das HDACs em diferentes tipos de alterações no metabolismo humano e desenvolvimento de patologias, etc. Sabe-se que a regulação do metabolismo de glicose e energia é desempenhada por HDAC de classe II, como SIRT1 ou SIRT3. Além disso, membros da classe IIa, os quais fazem parte HDAC 4, HDAC 5, HDAC 7 e HDAC 9 estão envolvidos no controle da glicose hepática, disfunção do tecido adiposo, adipogênese e diferenciação muscular. Inúmeros processos fisiológicos podem ser regulados, tais como metabolismo, homeostase da glicose, diferenciação, proliferação celular, senescência e expectativa de vida, diferenciação de adipócitos (CHATTERJEE et al., 2011; ZHOU et al., 2014)

As histonas ainda podem ser modificadas através de outros mecanismos, como pela metilação de resíduos, ubiquitinação, acetilação ou sumoilação e fosforilação modificando as estruturas proteicas nos resíduos de aminoácidos (GUPTA-AGARWAL et al., 2014). As modificações de histonas mais abordadas ao decorrer dos anos incluem a acetilação e metilação dos resíduos de lisina. No entanto existe uma série de processos nos quais existe o envolvimento de histonas, que devem ser mais profundamente estudados como a deacetilação.

3.1 Histonas Deacetilases

As HDACs são enzimas conhecidas por seu papel repressor da transcrição gênica e cada HDAC possui relevância devido as suas formas de ação. Foram identificadas 18 HDACs em mamíferos e estas divididas em 2 categorias: HDACs zinco-dependente e HDACs adenina nicotinamida dinucleotídeo (NAD)-dependente. Essas categorias podem ainda serem divididas em quatro subfamílias denominadas: Classes I, II, III e IV. As classes I, II e IV são distribuídas como primeira categoria e classe III como segunda categoria, de acordo com organização do domínio e identidade da sequência (GREGORETTI et al., 2004).

A Classe I de HDACs é composta por (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) e contém um domínio catalítico N-terminal com aproximadamente 400 aminoácidos; Classe II é dividida em subclasses IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) e IIb (HDAC6 e HDAC10) com 600 a 1200 resíduos e presença da extensão N-terminal com funções regulatória (classe IIa) ou dois domínios catalíticos (classe IIb); Classe III (SIRT1 a SIRT7) e a classe IV possui somente (HDAC11) (WEST & JOHNSTONE, 2014).

Quanto à localização das HDACs, as pertencentes à Classe I estão localizadas quase que exclusivamente no núcleo; Classe II: podem encontrar-se tanto dentro quanto fora do núcleo, pela capacidade de deslocamento de um meio ao outro em resposta a sinais celulares, exceto a HDAC10 que é encontrada no núcleo; Classe III: localizadas primariamente em compartimentos celulares diferentes, com SIRT1, SIRT6 e SIRT7 no núcleo, porém SIRT1 pode estar no citoplasma de alguns tipos celulares, SIRT2 no citoplasma e SIRT3, SIRT4 e SIRT5 localizado na mitocôndria; Classe IV: a HDAC11 reside no núcleo. As classes de deacetilases foram nomeadas conforme a ordem em que foram descobertas, sendo a primeira isolada a HDAC1 (RUIJTER et al., 2003).

A função das HDACs parece ser regulada de acordo com características intrínsecas, abundância, compartimentação celular e associação com cofatores. Como cada tipo celular necessita de um padrão de expressão específico, assim é norteadada a expressão de HDAC. Além da deacetilação de histonas, outras proteínas não-histonas podem ser alvo das HDACs como p53, E2F, alfa-tubulina e MyoD, demonstrando a complexidade dessa enzima em vários eventos celulares (RUIJTER et al., 2003).

As enzimas HDACs raramente tem ação isolada, pois ocorre a formação de um complexo para repressão da transcrição, no qual estão envolvidas outras proteínas com funções de recrutamento ou remodelação da cromatina. A etapa inicial envolve um sinal no próprio DNA, onde grupos de metilo ligados a resíduos de citosina situados 5' para guanosinas no DNA, nas ilhas CpG (região do DNA) são responsáveis diretamente pelo recrutamento do complexo HDAC. A HDAC é importante nesse recrutamento, porém quando sua atividade é inibida a transcrição do gene nem sempre é restaurada completamente (ZHU et al., 2001).

As HDACs possuem sítio ativo íon zinco-dependente que exibem características tanto de metalo-proteases e serina, porém os mecanismos que

conduzem a deacetilação não estão esclarecidos. O núcleo catalítico das classes I e II é amplamente conservado, compartilhando o mesmo mecanismo catalítico. O local de ligação das HDACs zinco-dependentes possui um compacto domínio α/β composto por uma central com 8 filamentos folha- β flanqueada em ambos os lados por muitas α -hélices. A estrutura secundária possui elementos que são conservados parcialmente através de toda família de HDACs (MICELLI & RASTELLI, 2015).

De acordo com MACDONALD & ROSKAMS (2008) cada tipo de HDAC possui particularidades em relação a sua expressão. Por exemplo nos múltiplos estágios de desenvolvimento os diferentes tipos de HDACs podem ser expressos, como a HDAC1 que é mais expressa em células-tronco neurais em camundongos e nas células da Glia. Já a expressão de HDAC2 é encontrada nos progenitores neurais e nos neurônios pós-mitóticos, embora esteja ausente na maior parte das células da Glia. Nesse caso demonstra ser necessária à expressão sequencial de HDACs específicos devido às diferenciações dos subtipos glial e neuronal.

Atualmente, soube-se que a atividade HDAC pode encontrar-se aumentada em desordens como na esquizofrenia, resultado este apontado por uma pesquisa que demonstrou que pacientes esquizofrênicos tinham a atividade HDAC aumentada nas células mononucleares do sangue periférico humano em comparação a pacientes saudáveis (PANG et al., 2016). Em alguns casos presume-se que a inibição da atividade é uma alternativa fundamental para tratamento de patologias. Já em relação a parâmetros de memória, diversos estudos apontam que as HDACs são notáveis reguladores negativos de potencialização e memória a longo prazo (MALVAEZ et al., 2013).

3.2 Histona Deacetilase 3

A Histona Deacetilase 3 (HDAC3) foi descoberta em 1997, um ano após o isolamento da HDAC1. A HDAC3 é uma histona deacetilase pertencente de Classe I, bastante expressa no cérebro, com expressão de genes elevada no hipocampo e em células do Sistema Nervoso Central (SNC) como oligodendrócitos. A HDAC3 é conhecida por ser um regulador negativo crítico do processo de aprendizagem e memória, inclusive com papel regulador informação sensorial específica na memória a longo prazo (BROIDE et al., 2007; McQUOWN et al., 2011; PHAN & BIESZCZAD, 2016).

A HDAC3 faz parte do componente enzimático, complexo co-repressor do receptor nuclear, no qual faz parte N-CoR (co-repressor de hormônio nuclear) e SMRT (mediador de silenciamento para receptores retinóides e tireóides), os quais são recrutados pelos receptores do hormônio nuclear a fim de regular a transcrição na ausência de hormônio (RUIJTER et al., 2003). O NCoR possui quatro domínios de repressão e um domínio nuclear de interação do receptor. A ligação de HDAC3 ocorre nos resíduos 420-488 de NCoR, designado como domínio de ativação da deacetilase e essa ligação é necessária para ativação da HDAC3 (HARTAM et al., 2005).

Quanto à localização, esta é reportada no núcleo com recrutamento do seu complexo por HDACs 4, 5 e 7 quando eles estão ligados ao DNA por co-repressores. Entretanto a HDAC3 possui um sinal de importação e um sinal de exportação nuclear que sugere sua localização também no citoplasma da célula (YANG et al., 2002). Desta forma, é uma enzima essencial para ação fisiológica normal de vários receptores de hormônios nucleares e um componente catalítico crítico em patologias como o câncer em que é interrompida a função desse receptor (ALCALAY et al., 1991). Na HDAC3 pode haver a ocorrência de atividade catalítica aumentada através da ligação de outra molécula como a proteína emerin que quando ligada a HDAC3 aumenta seu V_{max} , ou seja, a ligação muda sua conformação e leva ao aumento de sua atividade enzimática (DEMMERLE; KOCH; HOLASKA, 2012).

3.3 Inibidores de Deacetilases

A deacetilação das histonas pode ser inibida pelos inibidores das histonas deacetilases (HDACIs) que são compostos que inibem a ação enzimática das HDACs, evitando a deacetilação da lisina dentro das caudas N-terminais. A inibição das HDACs resulta na hiperacetilação das histonas e relaxamento da conformação do DNA, contribuindo para a ativação transcricional de alguns genes. Esses inibidores são geralmente investigados para o tratamento de diversas doenças que incluem câncer, desordens fibróticas e outras doenças (SUENAGA et al., 2002; TANG et al., 2013).

Primeiramente, eles foram desenvolvidos como drogas anticâncer, embora apresentem potencial para aplicação médica para o tratamento das demais doenças.

Dentre alguns desses papéis, estão a potencialização da resposta imune do hospedeiro, diminuição da angiogênese, melhora no déficit motor e atividade exploratória, neuroproteção na doença de Huntington, regulação de vias metabólicas, etc. (JIA et al., 2016; LUNDH et al., 2015; MICELLI & RASTELLI, 2015; REMSBERG et al., 2016).

Atualmente, sabe-se que muitos inibidores de HDACs atuam bloqueando o acesso ao sítio ativo da HDAC de maneira reversível ou irreversível. O mecanismo de ação dos inibidores é similar, pois grande parte deles compartilha um domínio de ligação ao zinco, podendo ligar-se ao canal do sítio ativo por imitar o substrato no qual a enzima se ligaria. O mecanismo mais relevante desses inibidores consiste em quelar-se com íon Zn^{+2} que é essencial para a função catalítica das enzimas deacetilases, interrompendo sua ação enzimática. Conforme a estrutura química os inibidores são ordenados em quatro classes: ácidos graxos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos e benzamidas (JIA et al., 2016).

Os ácidos graxos de cadeia curta são compostos pequenos, com estrutura simples que inibem seletivamente as HDAC de classe I e classe IIA. Os HDACs mais notáveis dentro dessa classe incluem valproato (VPA, ácido valproico, usado também como sal de sódio), butirato de sódio, butirato de fenilo, ácido butírico e ácido 4-fenil tio butanóico. Os inibidores que possuem um espectro maior são os hidroxâmicos, que inibem as HDACs de classes I, II e IV com ações muito parecidas. Esse grupo é composto pela tricostatina A (TSA), ácido suberoilânilida hidroxâmico (SAHA) (JIA et al., 2016).

A quarta classe são os peptídeos cíclicos os quais tem são predominantemente de origem natural como a trapoxina derivada de fungos (TPX), bactéria Depsipeptideo (romidepsin, FK-228) e derivados, que são seletivos de forma moderada para HDAC de classe I.

Diferentemente das outras HDACs as benzamidas são uma classe seletiva contendo MS-275 e RGFP136, inibindo a HDAC de classe I, mais seletivamente incluída à HDAC1 e HDAC3, respectivamente. Essa classe também possui outros inibidores, como RGFP966 ((E)-N-(2-amino-4-fluorofenil)-3-(1-cinamil-1 H -pirazol-4-yl)acril-amida) que é um inibidor seletivo da HDAC3 (JIA et al., 2016).

A HDAC possui um domínio catalítico formado por uma extensão de aminoácidos com um conjunto deles conservados. O sítio ativo tem o formato de uma bolsa tubular curvada e com fundo mais largo. A remoção do grupo acetil

necessita da presença do Zn^{+2} , sendo que este átomo está ligado ao sítio de ligação. Além disso, demais cofatores são necessários para a atividade da HDAC e o mecanismo de ação do inibidor consiste em deslocar o zinco desse sistema, o tornando disfuncional (RUIJTER et al., 2003).

Após o mecanismo inibitório são aparentes alterações na expressão gênica, resultando em hiperacetilação e ocorrência de maior recrutamento de fatores de transcrição do DNA. O uso desses inibidores pode definir alterações sobre as HDACs, seja um inibidor de amplo espectro que inibe mais de um tipo de HDAC, ou inibindo especificamente uma classe ou um tipo de HDAC. Essas enzimas podem apresentar uma elevada homologia, tornando-se mais complexa a identificação de um inibidor que atue seletivamente sobre um tipo específico de HDAC (RUITJER et al., 2003).

A inibição de HDACs possui caminhos promissores, podendo atuar sobre diferentes mecanismos inclusive os relacionados à resistência de hormônios. Segundo MUNSTER et al. (2011) a utilização de agentes combinados como o inibidor Voronistat e o medicamento Tamoxifeno revertem a resistência hormonal de pacientes com câncer de mama. É sugerido que a expressão de HDAC2 é um marcador preditivo e a hiperacetilação das histonas um marcador útil para eficácia farmacodinâmica da combinação. Em indivíduos com essa doença a inibição resultou em regressão tumoral ou estabilização do câncer.

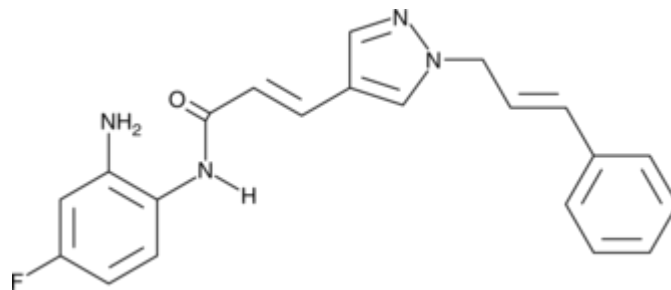
As HDACs ainda podem exercer papéis reguladores na sinalização da insulina como na ligação da HDAC2 com IRS-1 que é o substrato do receptor de insulina 1. Logo com a administração do inibidor tricostatina A (TSA) ou o silenciamento de genes HDAC2 a acetilação de IRS-1 é ativada e atenua parcialmente à resistência à insulina (SUN; ZHOU, 2008).

Existem inibidores seletivos que propiciam sugerir um alvo e compreender quais os processos que se alteram mediante inibição de uma HDAC. As HDACs de classe I apresentam um domínio catalítico 58% idênticos entre as HDAC1 e HDAC3. Uma classe nova de inibidores pode demonstrar um nível de seletividade 10 vezes maior para HDAC3 quando se compara a ação sobre HDAC1 e HDAC2. Dentre esses tipos de inibidores, está incluído o inibidor seletivo para HDAC3, o RGFP966 (WELLS et al., 2013).

3.3.1 Inibidor RGFP966

O composto RGFP966 (Figura 3) é utilizado como um inibidor de classe I das HDACs, altamente seletivo para HDAC3 sobre HDAC1 e HDAC2, mas não detectada atividade para outros subtipos de HDACs. O RGFP966 é um inibidor com ligação do tipo competitiva. O seu IC₅₀ é de 0,8 µM para HDAC3 e não apresenta nenhuma inibição efetiva para outra HDAC em concentrações até 15 µM (MALVAEZ et al., 2013).

Figura 3- Fórmula química do inibidor RGFP966.



Fonte: MALVAEZ et al.(2013)

Quimicamente este composto trata-se de um *N*- (2- amino-4- fluorofenil) carboxamida, com nome químico (E)-N-(2-amino-4-fluorofenil)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-yl) acrilamida e fórmula química C₂₁H₁₉FN₄O.

O tratamento com o RGFP966 em duas linhas celulares linfoma cutâneo de células T (CTCL) 24 horas antes da análise Western blot demonstrou um aumento na acetilação em H3K9/K14, H3K27 e H4K5. O inibidor atuou aumentando a apoptose, associado com dano ao DNA e reduzindo o crescimento celular de CTCL. Tal mecanismo está interligado a uma significativa diminuição na velocidade de bifurcação da replicação do DNA, evento que ocorre dentro da primeira hora do tratamento com o RGFP966 (WELLS et., 2013).

A inibição da HDAC3 através do RGFP966 também demonstra aumentar os processos de memória relacionados à extinção do comportamento de busca de drogas. Nesse caso, a inibição farmacológica é positiva, pois facilita à extinção da procura de drogas, perdendo o comportamento resistente e ocasionando uma experiência de aprendizagem inicial de memória e as HDACs seriam como reguladores negativos (MALVAEZ et al., 2013).

4. OBESIDADE

A obesidade é um distúrbio relacionado à regulação do peso corporal, caracterizada pelo armazenamento em excesso de gordura corporal. A etiologia da obesidade é multifatorial e abrange fatores de aspecto social, comportamental, ambiental e genéticos. Atualmente, observa-se um estilo de vida sedentário e a presença de uma ampla variedade de alimentos que contribuem para a epidemia da obesidade. A alimentação além da necessidade energética de um indivíduo resulta em um balanço energético positivo, ou seja, mais energia é consumida do que despendida. Dessa forma é originado um balanço energético positivo crônico, além de outros fatores envolvidos como indivíduos vulneráveis geneticamente e epigeneticamente (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017; HARVEY & FERRIER, 2012).

Efeitos adversos são causados, como aumento do risco de aterosclerose, processos de neurodegeneração, desenvolvimento de Diabetes Mellitus (DM) Tipo 2 e câncer. Além disso, as desordens decorrentes da obesidade se associam a um tempo de vida menor, pois é associada ao aumento da morbidade e mortalidade devido às condições de saúde consequentes do acúmulo de gordura em excesso (FONTANA & HU, 2014). De acordo com o paradoxo da obesidade, os indivíduos obesos idosos possuem maiores condições de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronariana do que aqueles indivíduos que apresentam peso normal (CHAPMAN, 2010).

Apontada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo pela Organização Mundial da Saúde, a obesidade tende a crescer no decorrer dos anos. Projeta-se que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos encontrem-se com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos. Levantamentos recentes no Brasil destacam que mais de 50% da população apresenta-se acima do peso normal, com classificação na faixa de sobrepeso e obesidade. Outro fator preocupante é em crianças, pois estaria em torno de 15 % (ABESO, 2018).

Outro caminho importante é o metabolismo obeso, como os sistemas humorais e neuronais que participam do controle da homeostase energética. Contudo, o caminho para abrandar o crescente desenvolvimento da obesidade permanece com obstáculos, por causa do conhecimento limitado de mecanismos relacionados à resistência à ação de hormônios metabólicos como grelina e leptina. A obesidade acarreta num defeito no qual um organismo desenvolve resistência a

ação desses hormônios chaves do metabolismo, essenciais no controle neuroendócrino da homeostase de energia. Os hormônios são elo de comunicação da informação para o sistema nervoso central (SNC) sobre o status nutricional e os níveis atuais das reservas energéticas (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017).

Figura 4- A obesidade e as consequências do acúmulo de gordura.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018)

Além disso, na obesidade as citocinas e proteínas de fase aguda relacionadas à inflamação estão aumentadas. Esse processo inflamatório pode ter início por meio das alterações bioquímicas associadas à obesidade como a hiperlipidemia, resistência à ação da insulina e síndrome metabólica. Dessa forma a inflamação trata-se de uma consequência da obesidade (YUDKIN et al., 1999).

4.1 Obesidade e modelo de dieta hiperlipídica

Os modelos experimentais para a obesidade induzidos via dieta hiperlipídica são utilizados pelos pesquisadores com a finalidade de compreender elementos relacionados na fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades. Esses modelos refletem em um experimento as alterações metabólicas encontradas na obesidade humana (WEST & YORK, 1998).

Segundo estudo de WHITE et al. (2013) um modelo de obesidade associado à resistência à ação da insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia foi induzido em um período de 10 semanas através de dietas hiperlipídica com 60% de

lipídios. Ocorreu aumento do peso do tecido adiposo, além do índice de adiposidade maior. Nesse experimento utilizaram linhagem Swiss, mas sabe-se que linhagens isogênicas (C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J, A/J) são as mais propícias ao desenvolvimento da obesidade devido sua uniformidade genética.

Abaixo a tabela apresenta as características nutricionais da dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH):

Tabela 1- Composição das dietas

Ingredientes	DP		HFD	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	415,0	1.660	14,3	57,2
Farelo de soja	305,0	1.281	410,0	1.722
Sacarose	80,0	320	80,0	320
Maltodextrina	70,0	280	70,0	280
Banha	0,0	0	302,0	2.718
Óleo de soja	0,0	0	0,0	0
Ác. graxo soja	50,0	350	50,0	350
Celulose microcrista	31,7	0	25,4	0
L-cistina	1,8	7,2	1,8	7,2
Cloreto colina	1,5	0	1,5	0
Butil-hidroxitolueno	0,014	0	0,028	0
Mix min. mod 50 gps	35,0	0	35,0	0
Mix vitamina	10,0	40	10,0	40
Total	1000,0	3.938	1000,0	5.494

Dieta padrão (DP): 73,9% de carboidratos, 14,8% de proteínas e 9,8% de lipídeos.

*High fat diet (HFD): 26,13% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57,6% de lipídeos.

* Tradução: Dieta rica em gordura.

Adaptado de: WHITE et al. (2013)

A indução por dieta com 58,7% de lipídicos após 8, 15 e 19 semanas apresentou efeito no peso corporal e coxins adiposos em camundongos C57BL/6J. Houve significativa elevação do peso corporal em 11,4%, 23,1% e 30,5%, respectivamente (LIN et al., 2000).

Um aumento da adiposidade, além de ser oriundo de uma elevada ingestão calórica também é consequência do tipo de gordura introduzida na composição dietética. Existem diferenças, pois a adição de gorduras do tipo saturada e monoinsaturada promovem pronunciadamente a obesidade e resistência à insulina quando comparada à gordura poli-insaturada, visto que aumentam a lipogênese e o depósito de microvesículas de gordura no fígado. Dentre as gorduras, a banha de

porco (composta de gordura saturada e monoinsaturada) trata-se de uma forma indicada para geração de um modelo válido de roedor obeso e com alterações a nível metabólico (WHITE et al., 2013).

Em concordância com outros autores, a composição da dieta hiperlipídica condiz com o tipo de gordura utilizada e seus percentuais necessários para caracterizar uma dieta com elevado teor de gordura.

4.2 Obesidade e Epigenética

Fatores nutricionais ou dietéticos tem extrema relevância, pois é apontado que fatores dietéticos podem inferir modificações epigenéticas levando a disfunção metabólica, visto que, a Síndrome metabólica se trata de um fenótipo progressivo e tem como característica a presença de obesidade, DM tipo 2, dislipidemia, hipertensão ou resistência à insulina, sendo os sintomas iniciais e a progressão resultantes das interações genes-dieta. A dieta e alterações em nível de massa corporal de obesos podem influenciar os mecanismos epigenéticos de um indivíduo associado a mudanças na expressão gênica (PARK et al., 2017).

Frequentemente a obesidade associa-se à aceleração do envelhecimento e fenótipos degenerativos. O aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) relaciona-se ao envelhecimento epigenético acelerado nas células sanguíneas de pessoas de meia-idade, porém não se exclui a possibilidade desse resultado estar presente ao longo da vida humano (NEVALAINEN et al., 2017).

Evidências avaliam o quanto a exposição a HFD pode facilitar o desenvolvimento de problemáticas metabólicas e quanto a nutrição materna influencia na susceptibilidade a doenças metabólicas na criança. Segundo Aagaard-Tillery et al. (2008) descendentes de macacos-japônes alimentados com dieta rica em gordura durante gestação (35% gordura) apresentaram níveis maiores de acetilação de histonas H3, enquanto no fígado foi mais elevada a expressão de HDAC comparando-se com descendentes de mães com uma dieta com baixo teor de gordura. Uma dieta materna rica em gordura e calórica pode alterar o epigenoma fetal em um sítio específico de acetil na cauda da H3, pois alterações do sítio nas histonas podem estar ligados com a expressão reprogramada dos genes do feto. Desta forma, predispõe a um fenótipo pós-natal para a obesidade, explicando as

origens para o desenvolvimento de doenças adultas em primatas (AAGAARD-TILLERY et al., 2008).

A modificação de histonas está envolvida no controle da adipogênese, processo que envolve a ativação e inibição de múltiplos genes funcionais. As HATs e HDACs têm funções importantes na regulação da transcrição e modificação pós-tradução de acetilação de proteínas (ZHOU; PENG; JIANG, 2014). Todavia, devido à variabilidade de substratos que caracterizam as HDACs, o balanço afetado entre as enzimas HAT e HDAC têm sido correlacionadas com desordens como câncer, doenças neurológicas e cardiovasculares, inflamação e doenças metabólicas, as quais está incluída à obesidade (ARROWSMITH et al., 2012)

Na obesidade, várias de suas comorbidades estão interligadas a Síndrome Metabólica, que inclui circunferência da cintura aumentada, desordens dislipidêmicas, hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2. Estudos prévios demonstram que a prevenção dos efeitos prejudiciais da alimentação crônica com alto teor de gordura está ligada a deleção de genes da HDAC9. Esses efeitos estão relacionados com a diferenciação adipogênica, elevação do gasto energético originando a adipogênese bege, expressão da adiponectina aumentada, redução da massa corporal e melhora da homeostase metabólica. Tais dados emergem que alguns tipos de HDAC como a HDAC9 apresenta importante função no tecido adiposo e potencial terapêutico em relação à obesidade (CHATTERJEE et al.; 2014)

A atividade de outras HDAC no metabolismo energético é apontada em pesquisas, como por exemplo, expressão da HDAC5 pode-se encontrar alterada no hipotálamo de ratos obesos alimentados com dieta alta em gordura, mas concluiu-se que este subtipo é essencial à sinalização da leptina e ingesta alimentar. Enquanto a HDAC5 em ratos knock-out que possuem hipotálamo defeituoso tem propensão à obesidade induzida por dieta (KABRA et al., 2016).

Por isso, torna-se interessante avaliar especificamente um subtipo de HDAC e não de forma ampla, visto que a ação de alguns é mais necessária que a inibição para efeitos positivos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar o papel da inibição da HDAC3 sobre o ganho de peso, parâmetros bioquímicos e inflamatórios em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

5.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da inibição da HDAC3 sobre as alterações no ganho de peso corporal em camundongos alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica;

Analisar os níveis do perfil glicêmico, lipídico e hormonal em camundongos que foram tratados com dieta padrão e dieta hiperlipídica;

Mensurar os níveis plasmáticos dos hormônios leptina e adiponectina e suas alterações mediante uso do inibidor RGFP966 em animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica.

Avaliar se a inibição da HDAC3 ocasionou alterações nos marcadores inflamatórios IL6, IL1- β e TNF- α no hipocampo de camundongos induzidos à obesidade.

PARTE II**MANUSCRITO**

Title: Inhibition of HDAC3 protects against biochemical and inflammatory disorders in a model of obesity induced by hyperlipidic diet in mice

Franciéle Romero Machado, Silvana Peterini Boeira, Cristiano Ricardo Jesse, Leandro Cattelan Souza, Cristini Escobar Viana, Fabrício Nunes Balok

Será submetido à Molecular and Celular Biochemistry.

Abstract

Histone deacetylases (HDACs) are responsible for the deacetylation of histones and repression of cellular gene transcription, called epigenetic changes and HDAC3 is related to metabolic functions. High fat diet (HFD) predisposes to obesity and still lacks understanding of the epigenetic mechanisms. Adult mice C57BJ / 6 were treated with normal pellet diet (NPD) or HFD. The inhibitor of HDAC3, the RGFP966 (50 mg/kg s.c.) was administered from 91st to 120th day and other groups received the vehicle. The body weight was measured weekly and on the 120th day the animals were euthanized and blood and hippocampus were collected for analysis. The biochemical and inflammatory parameters were analyzed in blood and hippocampus, respectively with the data treated statistically. The HFD increased body weight, plasma glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol and low density lipoprotein (LDL) levels compared to control, however RGFP966 reduced these levels. While the values of high density lipoprotein (HDL) were decreased in HFD the RGFP966 led to a significant increase. The interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 beta (IL1- β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) increased significantly in the HFD group compared to the NPD group, with the RGFP966 reducing these levels and attenuating the inflammatory process caused by HFD. Treatment with HFD reduced adiponectin and increased the leptin, so the inhibition was able to reverse such changes in the HFD + RGFP966 group. In conclusion, HDAC3 is involved in the obesity and their inhibition via RGFP966 reverts changes caused by HFD.

Keywords: Epigenetic. Metabolism. Nutrition. Inflammation. Obesity

1.Introduction

Epigenetics is the term that describes as interactions between the genotype and the environment, trait formers known as the phenotype. Epigenetic mechanisms affect gene expression and how genes are expressed without altering DNA sequencing [1,2]. Epigenetic modifications occur by changing the structural conformation of chromatin, regulating the access of transcriptional factors. The histones are the center of the process because they are associated with DNA and are susceptible to the action of transcriptional promoters or repressors. Therefore, transcription occurs via histones acetyltransferases (HATs) and the repression through histones deacetylases (HDACs), resulting in a chromatin of relaxed or dense structure [3].

HDACs are active enzymes in the removal of acetyl groups from acetylated residues of histones, repressing gene transcription and influencing physiological and pathological events. Currently there are 18 HDACs in mammals, which are divided into I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC8); Class IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 and HDAC9), IIb (HDAC6 and HDAC10), Class III (sirtuin1 to sirtuin7) and class IV (HDAC11) [4]. These enzymes can be inhibited by the use of substances that inhibit lysine deacetylation within the histone N-terminal tails, resulting in a hyperacetylated state, since the balance between HATs and HDACs is affected. Pharmacological targets with the use of inhibitors are a promising target in research involving the treatment of cancer, neurological diseases, hormonal signaling and metabolic diseases [5].

A number of physiological processes can be regulated by epigenetics such as glucose homeostasis, metabolism, cell proliferation, adipocyte differentiation, senescence and life expectancy [6].

Inhibition demonstrated relevance in experimental models, acting metabolically on insulin signaling, increased glucose uptake; performance in cellular processes such as apoptosis, necrosis, cell growth; improvement of cognitive deficits as in Alzheimer's disease, Huntington's disease and other series of processes. There are several types of inhibitors, those of wide spectrum capable of inhibiting a wider range of HDACs and the selective inhibitors that are of interest in this study as they act specifically on a type of HDAC. Among the selective inhibitors is compound

RGFP966, benzamide-type inhibitor selective for HDAC3 belonging to class I of HDACs [7-9]. The inhibitor performance is of the competitive type and highly selective for HDAC3 over HDAC1 and HDAC2 but not detected activity for other subtypes of HDACs. The value of IC₅₀ is of the 0,8 μM for HDAC3 and does not appear to exhibit effective inhibition for another HDAC at concentrations up to 15 μM [10].

The obesity is a disease related to increased morbidity and mortality due to medical conditions caused by excess fat accumulation. Its occurrence can be observed in individuals who present high calorie intake and low energy expenditure, favoring an energy imbalance. In addition, several aspects contribute to the development of obesity, such as behavior, environment, genetic factors and even epigenetic factors [11]. Among the associated comorbidities, the risk of increased atherosclerosis, Type 2 Diabetes Mellitus (DM), cancer development, neurodegenerative processes and increased pro-inflammatory markers are highlighted [12].

In view of the growing population increase in obesity, it is essential to elucidate the influence of epigenetic mechanisms and their relationship with food-borne diseases, whether for prevention or even treatment [11]. It is known that dietary or nutritional factors can intervene in epigenetics, in which the diet and body mass index of obese influences the gene expression of an individual [13].

The role of HDACs in obesity, for example, is in HDAC9 which has function in adipose tissue and therapeutic potential and in the expression of HDAC5 that may be modified in obese rats by the high fat diet [14,15]. However, the involvement of HDAC3 in obesity is poorly established and which cellular events trigger its inhibition.

The objective was to elucidate the effects caused by the inhibition of HDAC3 in animals induced to obesity by high fat diet. It is to be understood if the inhibition of HDAC3 by the RGFP966 inhibitor results in the regulation of disorders intrinsic to the obese organism, such as in the biochemical and inflammatory profile that may be altered in obesity.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

The RGFP966 inhibitor and the reagents used for determinations of the parameters analyzed are from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Labtest Ltda (BRAZIL).

2.2 Animals

Experimental study conducted with 32 male C57BL / 6 mice with weights between 30-35 g obtained from the Federal University of Pelotas.

The animals were housed in polypropylene boxes under controlled light conditions with 12 h light / dark cycle, temperature control (22 ± 1 ° C) and relative humidity of 60%. The mice were fed normal diet pellet (NPD) or high fat diet (HFD) and filtered water *ad libitum*. The experimental procedures were conducted out in accordance with the the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources and with approval of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University of Pampa, Brazil (CEUA protocol number 034/2017).

2.3 Experimental protocol

The mice were divided and fed with two diets: NPD (Puro Lab 22PB -Puro Trato®) or HFD (commercial hyperlipidic diet). The dietary regimes persisted throughout the experiment for 120 days. The HFD offer has nutritional composition with a hyperlipidic characteristic, around 60% of saturated and monoinsaturated lipids. The effects on body weight in C57BL/6J mice can already be observed from 8 weeks [16].

The mice were randomly divided into 4 groups (n = 8) designated as: 1) NPD + vehicle, 2) HFD + Vehicle, 3) NPD + RGFP966 and 4) HFD + RGFP966. From the 91st to the 120th day was administred the inhibitor RGFP966 (50 mg/kg) or the vehicle (10 mg/kg) (solution 80% propylene glycol/20% saline) subcutaneously. The

body weights were measured (1x/week) from the beginning until the end of the experiment, to evaluate weight changes in grams (g) from the 1st to the 120th day

At 120th were collected the blood on the mice, in which the samples were centrifuged (3,500 rpm for 10 min) and the supernatants were stored for further analysis. On the same day were euthanized with pentobarbital (180 mg/ kg body weight) and the hippocampus brain region was extracted. Immediately after separation the region was homogenized with ice cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min. After this process, the supernatant was separated and the sample conditioned at the ideal temperature to be used later for the analysis.

2.4 Biochemical parameters

Serum blood levels of biochemical markers such as glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (CT), fractions of lipoproteins such as high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein was expressed as mg/dl and the insulin expressed as pmol/l. The values were obtained using commercial kits Labtest Ltda (Brazil) according to the manufacturer's instructions.

2.5 Adipokines levels

Adiponectin and leptin concentrations (ng/ml) were measured in serum collected. Serum levels of these hormones were determined using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits according to the manufacturers' instructions

2.5 Inflammatory parameters

From the process of hippocampal homegeneization it was possible to analyze the level of proinflammatory cytokines. Hippocampal levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis fator alpha (TNF- α) were determined using Kits assays ELISA of according to the manufacturer's instructions. The results

were reported as pg/ml tissue (Immulite, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles).

2.7 Statistical Analysis

Results were presented as mean \pm SEM. The data used for the statistical analysis were performed using the GraphPad Prism 6.0 program, using the one-way ANOVA variance, followed by Bonferroni post-hoc, and a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Increase of the body weight

Statistical analysis revealed a significant increase in the body weight of the mice that received HFD for 120 days compared to the control group that received NPD ($p < 0.001$). The use of the inhibitor RGFP966 in animals receiving HFD partially avoided the increase of the body weight when compared to the HFD group ($p < 0.05$), indicating a possible effect of the inhibitor on the accumulation of fat (Fig.2A).

3.2 The analysis of the biochemical parameters

A significant increase in plasma glucose of the HFD group was also observed compared to the control group ($p < 0.001$), indicated in Fig. 2B. On the other hand, the group that received the RGFP966 inhibitor at a dose of 50 mg/kg + HFD had significantly lower glucose levels ($p < 0.001$), resulting in a reduction in plasma levels of this parameter, demonstrating that HDAC3 inhibition promoted the maintenance of glucose levels even in animals exposed to a fat rich diet.

In addition, HFD significantly increased insulin levels when compared to the control group ($p < 0.001$). The inhibitor RGFP966 attenuated the elevation of these values significantly in the group that was administered to HFD when compared to the other groups (Fig. 2C) ($p < 0.001$). As regards triglyceride levels (Fig. 2D) and total

cholesterol (Fig. 2E), there was an increase in both parameters in the HFD fed group ($p < 0.001$). Administration of the inhibitor (50 mg/kg) prevented the increase of these parameters even in the HFD group ($p < 0.05$).

HDL was also evaluated, which had a reduction in their levels ($p < 0.001$) in the animals that received HFD when compared to the control group (Fig.2F). The HFD group receiving the inhibitor RGFP966 had a normalization of HDL levels, which is a relevant result since the increased levels of this are expected in the lipoprotein profile ($p < 0.001$). Statistically, HDL increased in the NPD group receiving only the HDAC3 inhibitor at a dose of 50 mg / kg compared to the NPD-control group ($p < 0.001$). This suggests that administration of the inhibitor even in healthy animals presented favorable results for HDL values.

In the Fig. 2G the animals receiving the HFD diet had a significant increase in plasma levels of LDL ($p < 0.001$), however the administration of the inhibitor reduced the values partially, that is, it demonstrates the effect of the inhibition of HDAC3 and implies in the reduction of this lipoprotein which presented similar results to the NPD control group ($p < 0.05$).

3.3 Effect of HFD and RGFP966 in the inflammatory parameters

In relation to the inflammatory process-related markers, the animals exposed to HFD had a significant increase of IL1- β (Fig.3A) compared to the control group that received the NPD ($p < 0.001$). In mice exposed to the action of the HDAC3 selective inhibitor and ingested HFD presented significantly lower values ($p < 0.01$) than the HFD + vehicle group (Fig. 3A). The Fig.3B demonstrates a significant increase of IL-6 in the hippocampus in animals induced to obesity via HFD ($p < 0.001$). On the other hand, the HFD + RGFP966 treated group had reduced blood levels of IL-6 ($p < 0.01$).

The proinflammatory cytokine TNF- α resulted in the increase of their levels in the animals that received HFD ($p < 0.001$). It was observed in the present study that the use of the RGFP966 inhibitor at a dose of 50 mg/kg reduced TNF- α levels in the HFD group (Fig.3C), both statistically significant ($p < 0.05$). For all of these inflammatory parameters analyzed, RGFP966 showed a partial reversal of the alterations.

3.4 Effects of inhibition of HDAC3 in adipokines

Lower levels of adiponectin were found in the HFD control group compared to the NPD control ($p < 0.001$). Treatment with inhibitor reversed the decrease in adiponectin levels caused by HFD, bringing the levels of this anti-inflammatory adipokine near to the levels of the control group (NPD + vehicle) as observed in Fig. 3D ($p < 0.001$). The values of adiponectin are inversely related to body fat levels, in fact RGFP966 culminated in changes in levels of this hormone through the data pointed out by the study.

Leptin levels increased significantly ($p < 0.001$) in the group that received only the high fat diet compared to the NPD group. The inhibitor partially attenuated or reversed this expressive increase in plasma leptin in animals treated with a hyperlipidic diet ($p < 0.05$). Comparing this treatment to the NPD control group, it was observed that although the values remained statistically high, the reduction was significant when compared to the HFD group (Fig.3E).

4. Discussion

According to findings by WHITE et al [16] at the end of ten weeks, the group with hyperlipidic diet presented body mass and average of the total gain of greater weight compared to the group with standard diet. In the present study the period that was administered to HFD corroborates with the alterations found in the weight of the animals, because the HFD group presented increased body weight which was attenuated by the use of the inhibitor RGFP966. According to SHARMA & TALYAN [17] increased body weight was observed in HFD, but the HDAC inhibitor, SAHA attenuated the increase in body weight, as was observed with the inhibitor RGFP966.

The increase in adiposity is a consequence of high caloric intake and the type of fat in the diet. The addition of saturated and monounsaturated fats promotes obesity and insulin resistance when compared to polyunsaturated fat, since they increase the lipogenesis and deposit of fatty microvesicles in the liver. Among the fats, lard (saturated fat and monounsaturated fat) is indicated for the generation of a valid obese rodent model with metabolic alterations [16]. Regarding adipocytes, the role played by HDACs is still unclear about the process of adipocyte differentiation.

However, it is known, for example, that HDAC sirtuin-1 (SIRT1) and sirtuin-3 (SIRT3) exert significant effects on adipogenesis [18]

The findings of the present study evaluated the influence of HDAC3 inhibition on blood plasma insulin levels and demonstrated that was facilitated the maintenance of plasma insulin levels in the HFD group treated with the inhibitor, which is a relevant result, since this hormone implies in the homeostasis of blood glucose levels. According to REMSBERG et al. [8] rats without HDAC3 presented higher tolerance and marked glucose clearance. It is reported that HDAC3 in pancreatic beta cells participates in the regulation of insulin secretion, glucose metabolism and cytokine-induced mediation in pancreatic beta cells in rats with diabetes [8].

The selective inhibition of HDAC3 by the BRD3308 inhibitor has been shown to protect beta cells in diabetes against inflammatory and metabolic insults [19]. Other results indicate that in spite of a marked hepatic accumulation of triglycerides, animals without hepatic HDAC3 had lower concentrations of fasting glucose, suggesting that HDAC3 promotes the hepatic production of fasting glucose. The hypoinsulinemia, increased glucose and insulin tolerance may also be observed, which is indicative of hormone hypersensitivity [9].

The use of another HDAC inhibitor, SAHA (ácido hidroxâmico suberoilânida) (50 mg/kg), reduced insulin and glucose levels. In contrast to the results found, it appears that the inhibition of HDAC is related to metabolism and how this system is regulated independent of the HDAC subtype [17]. Inhibition of HDAC through the inhibitor Trichostatin A (TSA) in the high fat diet reduced plasma glucose levels. Better tolerance to glucose, restoration of cholinergic function, combat of neuroinflammation, and improvement in cognitive deficits caused by HFD were observed. These findings help to determine how inadequate nutritional supply and weight gain are related to epigenetics and even their relationship with neurological pathologies [20].

Acetylation can modify peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ), a transcription factor involved in processes such as glucose homeostasis, lipid metabolism and inflammation. The dietary induced obesity (Dio) in male mice C57BL/6J demonstrated that the inhibition of HDAC3 by TSA (10 μ g / kg body weight per day for 2 weeks) increased acetylation and expression of PPAR γ target genes such as adiponectin. Inhibition of HDAC3 and the potential activation of PPAR γ favor

the uptake of glucose and insulin signaling in adipocytes, improving its sensitivity [21]. This mechanism may explain how the inhibition led to homeostasis of glucose and insulin in the results described with the inhibitor RGFP966, however it should be emphasized that there may be implications in other important pathways in metabolism.

In the present study the HFD diet increased the concentration of TG and TC, but resulted in lower levels of HDL-c. As a result, it was observed that inhibition of HDAC3 reduced TG and TC levels and improved HDL even in HFD-fed mice. According to a study by SHARMA & TALIAN [17] with the inhibitor SAHA the lipid parameters TG, TC and HDL were reversed. Such results are similar to RGFP966, although SAHA does not specifically act on HDAC3 and possibly presents other forms of pharmacological action. In contrast, JIANG et al [21] described in his research that the inhibition of HDAC3 led to the accumulation of lipids during the differentiation of adipocytes

Specific deletion of HDAC3 in the liver may alter gene expression, resulting in increased levels of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ). The PPAR γ antagonist partially reversed the lipid accumulation in the liver. In this case it would be important to establish the dose at which HDAC3 inhibition increases PPAR γ expression, because while increasing insulin sensitivity also increases lipid accumulation. The deletion increased the PPAR γ , but only with its antagonist was found favorable results [22]. Another study reports that interrupted hepatic metabolism causes elevation in histone acetylation by the inhibition of HDAC. The loss of HDAC3 disrupted hepatic cholesterol and lipid homeostasis by deactivating the gene repressor that regulates lipid metabolism. This action allows lipid accumulation to occur in detriment of glycogen storage [23].

Oxidation of fatty acids can be stimulated through FGF21 (fibroblast growth factor). In a study by LI et al. (2012) expression was evaluated in diet-obese C57BL / 6J mice by investigating transcription in the liver and HepG2 hepatocytes. The sodium butyrate inhibitor induced FGF21 in serum, the oxidation of fatty acids and stimulated hepatic production. It is emphasized that the greater expression of FGF21 was accompanied by the inhibition of HDAC3 [24]. Thus, from the selective inhibition it is presumed that other mechanisms like the expression of FGF21 are regulated and consequently effective in the lipid profile. Furthermore, other forms of regulation that have not yet been elucidated from the epigenetic point of view may exert an influence

on metabolism. It is known that histone modifications are involved in the control of adipogenesis, a process that activates and inhibits multiple functional genes, so that hyperacetylation influenced the lipid profile results [25]. However, the metabolism may be mediated by actions of HDACs, because it was reported that class I HDACs were related to the deacetylation of AMP-activated protein kinase acting as energy sensor in eukaryotes [26].

In the current study, the pro-inflammatory markers IL-6, IL-1 β e TNF- α were determined in the hippocampus to evaluate the inflammatory state the animals with the HFD. In our study the found results indicate the effect inflammatory of HFD, as observed with the elevation of the pro-inflammatory markers. The treatment with inhibitor RGFP966 was able to attenuate these increased levels of IL-6, IL-1 β e TNF- α . It appears that HDAC3 is involved in the inflammatory response caused by HFD. Thus, the present study suggests that treatment with RGFP966 promotes anti-inflammatory effect by attenuating the inflammatory effect in obese mice. In future, more detailed studies on the pathways leading to the decrease of these cytokines should be developed.

Evidence suggests that adipocytes are responsible for the secretion of adipokines, which play a role in metabolism in peripheral tissues. Adipocytes express and secrete proinflammatory markers such as IL-6 and TNF- α , which have increased plasma concentrations in obesity. Increased TNF- α is associated with dyslipidemia, obesity and insulin resistance [27].

Obesity is characterized by inflammation, since cytokines and acute phase proteins related to inflammation are elevated in obese individuals. This inflammatory process can be triggered due to obesity-related disorders such as insulin resistance, hyperlipidemia and metabolic syndrome, so inflammation may be a consequence of obesity [28]. The class 1, 2 and 3 HDACs play key roles in the regulation of inflammatory gene expression with a proinflammatory role for HDAC3. These function is related to inflammation by the deacetylation of the transcription factor NF- κ B (nuclear factor Kappa B) p65 which is involved in cellular response, immune response, memory and synaptic plasticity [29]. Based on this, we can emphasize that obesity can be indeed related to neuroinflammation, since hippocampal interleukins have increased significantly. Therefore, is characteristic the involvement of HDAC3 in inflammation and important study their neurological relation in the future.

In obesity defects may occur in the resistance to the action of key hormones of metabolism, essential to the neuroendocrine control of energy homeostasis. Hormones are the communication link for the central nervous system (CNS) on nutritional status and current levels of energy reserves [11]. The adipose tissue is an important endocrine organ in the production of hormones known as adipokines, which alter energy metabolism and eating behavior. Among the adipokines are leptin and adiponectin. Leptin is an important metabolic hormone, since mice unable to produce or respond have: hyperphagia, reduced energy expenditure and metabolic abnormalities such as hyperinsulinemia, hyperlipidemia, glucose intolerance and insulin resistance [26].

In current study it was shown that HDAC3 inhibition was positive for the leptin hormone profile, since elevated levels in the HFD group were reduced with administration of the RGFP966 inhibitor. While inhibition of HDAC3 was positive, HDAC5 is shown to be a primary form of leptin signaling and dietary intake, a finding observed in a study of obese rats fed a high fat diet. Therefore, it is worth highlighting that each subtype of HDAC seems to exert different roles when inhibited [15].

Leptin acts on the hypothalamic receptors and reduces appetite, signaling that fat stores are sufficient and boosting energy consumption. Leptin levels depend on the number and size of adipocytes, for example, weight loss decreases lipid tissue and blood levels of leptin. With the increase of the weight the leptin values increase, characteristic of mice induced to obesity. In addition, leptin in the liver and muscle stimulates AMP-activated protein kinase leading to inhibition of fatty acid synthesis and activating its oxidation [30].

The lower plasmatic levels of adiponectin were found in the present study in the HFD group and suggest the effect of diet on this hormone, while administration of RGFP966 (50 mg/kg) characterized significantly higher levels in the HFD group. The adiponectin may inhibit elevation of IL-6 levels and therefore its decrease results in increased IL-6 cytokine as observed in animals in the HFD group without the inhibitor. It is important to note that the increase of levels of TNF- α and IL-6 in the hippocampus in the HFD group may have contributed to the reduction of adiponectin levels, as observed in our study. This is because in adipose tissue, for example, TNF- α inhibits adiponectin hormone production and stimulates IL-6 production. Thus it may be suggested that in the hippocampus the action of TNF alpha is similar to that of adipose tissue [29].

One condition in individuals with obesity or type 2 diabetes mellitus is to have reduced levels of adiponectin in the blood. Adiponectin sensitizes organs to the effects of insulin and has an effect on fatty acid metabolism increasing its uptake and blocking its synthesis. In addition, it is responsible for increasing glucose uptake and hepatic and muscular catabolism [30]. In humans and obese mice, it is believed that hypoxia contributes to the reduction in the production of adipokines leptin and adiponectin, because in adipose tissue of obese individuals there is loss of blood [31]. Indeed, in our study the reduction in production was only noticed in adiponectin.

Obesity causes other strategies to be sought for the purpose of overcoming barriers that are intrinsic to the obese body. It is noteworthy that other changes such as diet, lifestyle and other factors are necessary for prevention and treatment of any disease, but in obesity epigenetic factors seem to be interconnected. Research on regulation of gene transcription and metabolism is still in its early stages, and it is essential to discover the key pathways involved in the development of obesity. In the future, it is valid to analyze other types of alterations resulting to obesity and to discover potential markers, addressing the pathophysiological mechanisms of the disease. In summary, we conclude that administration of the selective inhibitor of HDAC3 demonstrated important effects in the mice fed a high fat diet and allowed the improvement of the parameters evaluated. Therefore, it is believed to be a form of inhibition important to interfere in the pathogenesis processes of obesity.

5. References

- [1] Dupont C, Armant DR, Brenner CA (2009) Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin reprod med* 27:351-357
- [2] Waddington CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1:18-20
- [3] Allis, CD et al (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131:633-636, 2007
- [4] West, AC, Johnstone, RW (2014) New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest* 124:30-39
- [5] Seto E, Yoshida M (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:1-26
- [6] Bai L et al (2008) Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 307:129–140
- [7] Jia H et al (2016) The Effect of Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice. *PLoS One* 11:1-14
- [8] Remsberg JR et al (2017) Deletion of histone deacetylase 3 in adult beta cells improves glucose tolerance via increased insulin secretion. *Mol Metab* 6:30-37
- [9] Sun Z et al (2012) Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat Med* 18:934-942
- [10] Malvaez M et al (2013) HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2647-2652
- [11] Cui H, López M, Rahmouni K (2017) The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 13:338-351
- [12] Fontana L, Hu FB (2014) Optimal body weight for health and longevity: bridging basic, clinical, and population research. *Aging Cell* 13:391-400

- [13] Park JH et al (2017) Epigenetic modification by dietary factors: Implications in metabolic syndrome. *Mol. Aspects Med* 54:58-70
- [14] Chatterjee TK et al (2014) Role of histone deacetylases 9 in regulating adipogenic differentiation and high fat diet induced metabolic disease. *Adipocyte* 3:333-338
- [15] Kabra DG et al (2016) Hypothalamic leptin action is mediated by histone deacetylase 5. *Nat Commun* 7:1-12
- [16] White PAS et al (2013) Model of obesity induced by a hyperlipidic diet and associated with resistance to insulin action and glucose intolerance. *Braz Arch of Endocrinol & Metab* 57:339- 345
- [17] Sharma S, Taliyan R (2016) Epigenetic modifications by inhibiting histone deacetylases reverse memory impairment in insulin resistance induced cognitive deficit in mice. *Neuropharmacology* 105:285-297
- [18] Chatterjee TK et al (2011) Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation. *J Biol Chem* 286:27836–27847
- [19] Lundh M et al (2015) Histone deacetylase 3 inhibition improves glycaemia and insulin secretion in obese diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 17:703-707
- [20] Sharma S, Taliyan R, Ramagiri S (2015) Histone Deacetylase Inhibitor, Trichostatin A, Improves Learning and Memory in High-Fat Diet-Induced Cognitive Deficits in Mice. *J Mol Neurosci* 56:1-11
- [21] Jiang X et al (2014) Inhibition of HDAC3 promotes ligand-independent PPAR γ activation by protein acetylation. *J Mol Endocrinol* 53:191-200
- [22] Knutson SK (2008) Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J* 27:1017–1028
- [23] Gregoire S et al (2007) Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol* 27:1280–1295
- [24] Li H et al (2012) Sodium Butyrate Stimulates Expression of Fibroblast Growth Factor 21 in Liver by Inhibition of Histone Deacetylase 3. *Diabetes* 61:797- 806

- [25] Zhou Y, Peng J, Jiang S (2014) Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 93:170–177
- [26] Lin S, Thomas TC, Storlien L et al (2000) Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 24:639-646
- [27] Oller NCM, Ribeiro EB, Oyama LM (2009) Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *An Braz Acad Sci* 81:453-466
- [28] Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ et al (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:972-978
- [29] Niek GJL et al (2016) HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF- κ B p65 transcriptional activity. *Biochem Pharmacol* 108:58-74
- [30] Nelson DL, Cox MM (2014) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Artmed, Porto Alegre
- [31] Ye J, Gao Z, Yin, J et al (2007) Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1118- E1128

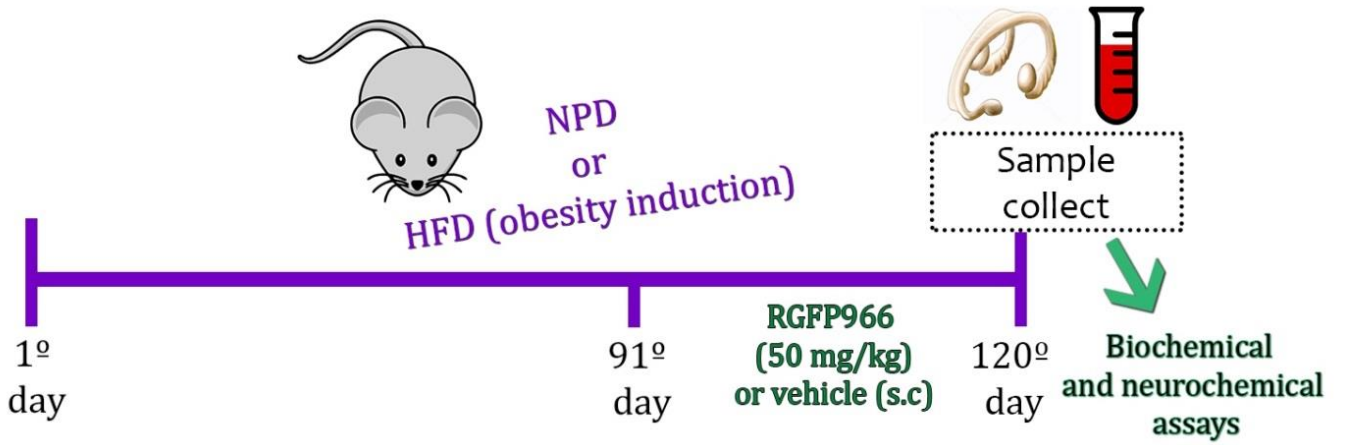


Figure 1. Experimental delineation of study with the inhibitor of HDAC3.

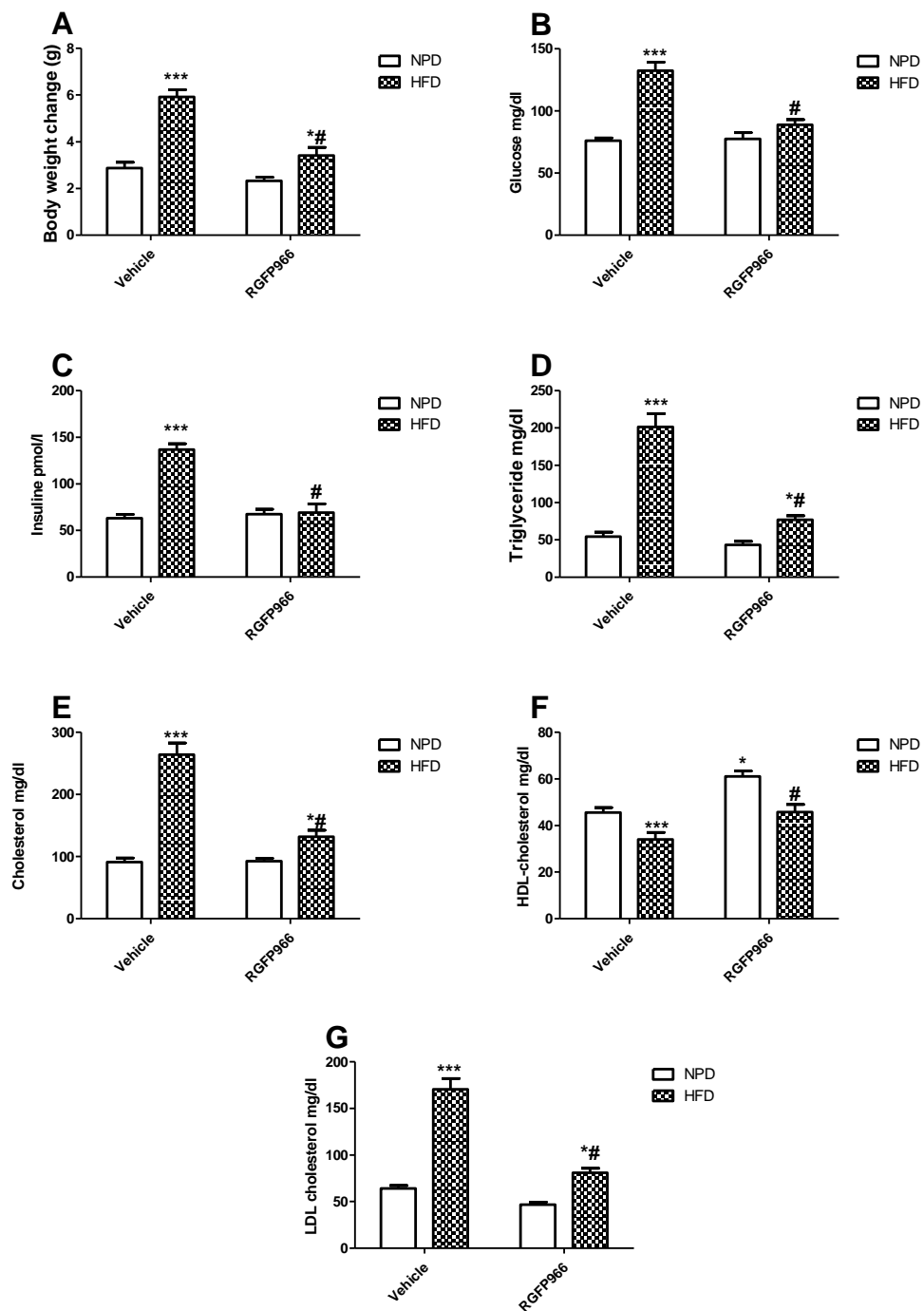


Figure 2. Results of treatment with the HDAC3 inhibitor, RGFP966 (50 mg/kg) in normal pellet diet (NPD) or high fat diet (HFD) on the body weight change (Fig.1A), levels of the biochemical parameters: Glucose (Fig.1B), Insulin (Fig.1C), Triglycerides (Fig.1D), Cholesterol (Fig.1E) HDL-cholesterol (Fig.1F) and LDL-cholesterol (Fig.1G). The data are shown by mean \pm standard error for a number = 8 animals per group. ***: indicates a significant difference of the HFD group compared to the control group ($p < 0.001$); *: indicates a significant difference of the group (NPD + inhibitor RGFP966) in relation to the control group ($p < 0.001$); #: indicates a significant difference of the group (HFD + Inhibitor RGFP966) with the HFD group ($p < 0.001$) (One-way ANOVA, Bonferroni post hoc test). (One-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

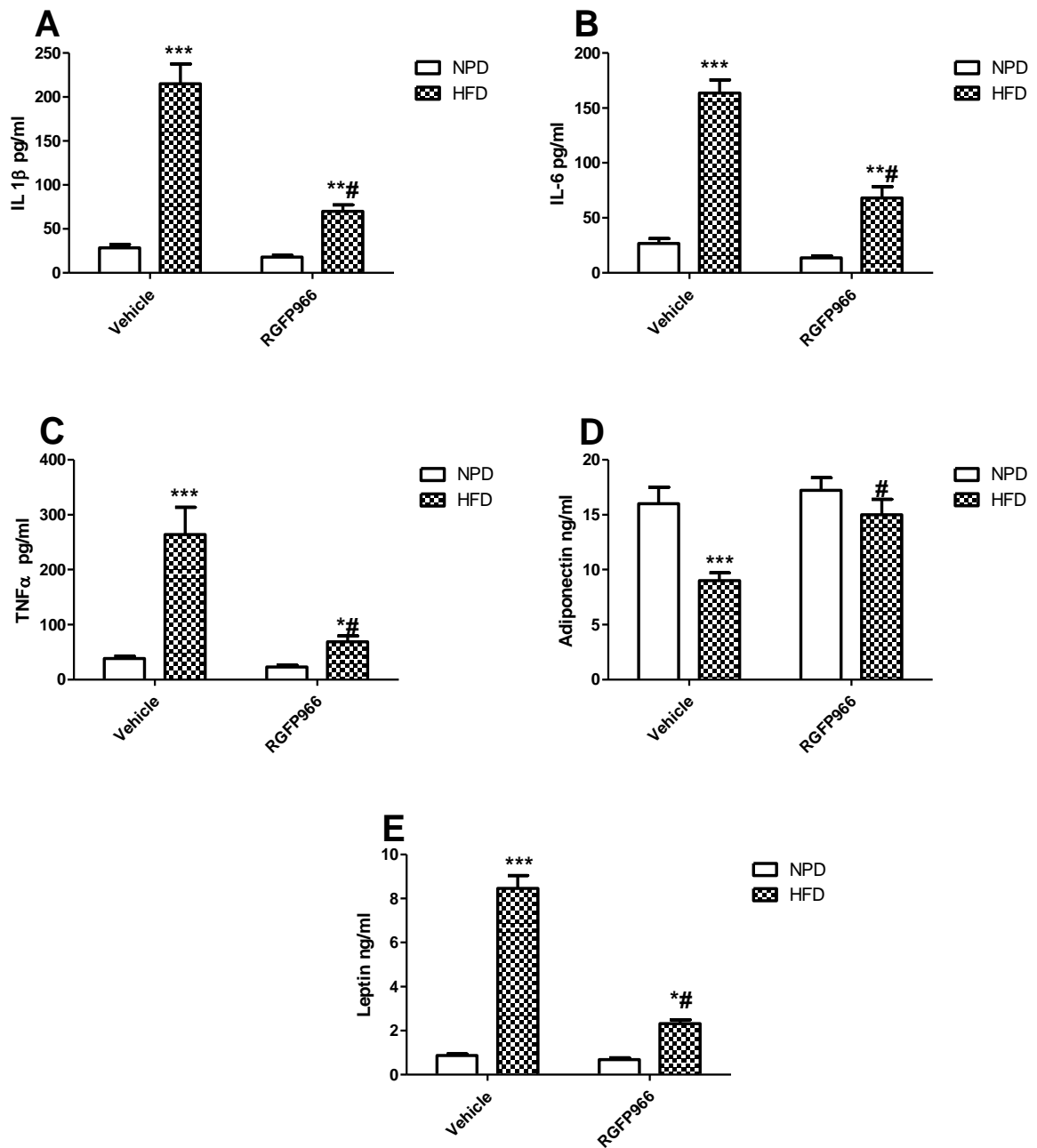


Figure 3. Results of treatment with the HDAC3 inhibitor, RGFP966 (50 mg/kg) in normal pellet diet (NPD) or high fat diet (HFD) on the levels of the inflammatory parameters: IL1 β (Fig.2A), IL-6 (Fig.2B), TNF- α (Fig.2C); adipokines: adiponectin (Fig.2D) e leptin (Fig.2E). The data are shown by mean \pm standard error for a number = 8 animals per group. ***: indicates a significant difference of the HFD group compared to the control group ($p < 0.001$); *: indicates a significant difference of the group (NPD + inhibitor RGFP966) in relation to the control group ($p < 0.001$); #: indicates a significant difference of the group (HFD + Inhibitor RGFP966) with the HFD group ($p < 0.001$) (One-way ANOVA, Bonferroni post hoc test). (One-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

PARTE III

CONCLUSÃO

A partir dos achados encontrados, o presente estudo demonstrou que a inibição da HDAC3 pelo inibidor seletivo RGFP966 (50 mg/kg) protegeu as alterações decorrentes da ingestão de uma dieta rica em gordura os camundongos induzidos à obesidade. Isso ocorreu devido à atenuação das alterações do peso corporal, parâmetros bioquímicos (glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL), inflamatórios (IL-6, TNF- α e a IL-1 β) e adipocinas (leptina e adiponectina), evidenciando o papel-chave da HDAC3 nas desregulações metabólicas e inflamatórias induzidas por uma dieta rica em gordura.

Embora a epigenética esteja relacionada, outras mudanças como alimentação e estilo de vida são necessárias para a prevenção e tratamento de qualquer patologia. Os eventos metabólicos e regulação da transcrição gênica necessitam de pesquisas mais abrangentes de regulação epigenética sobre outras perspectivas e vias metabólicas.

Assim, a inibição da HDAC3 demonstrou reverter os danos de uma dieta hiperlipídica e acredita-se que essa forma de inibição parece ter interferência nos processos de patogênese da obesidade.

PERSPECTIVAS

Com as discussões geradas através desse estudo espera-se prosseguir com pesquisas nessa temática, a fim de abranger outros mecanismos relacionados com a obesidade e a epigenética. Dentre esses mecanismos pesquisar detalhadamente os aspectos neurológicos envolvendo a inibição da HDAC3 pelo RGFP966 através de testes comportamentais e análise de fatores neurotróficos. Além disso, analisar uma gama maior de parâmetros bioquímicos, fator de crescimento de fibroblasto (FG21), expressão de proteínas envolvidas no metabolismo e demais vias importantes que ainda necessitam ser elucidadas.

Estabelecer um questionamento quanto aos aspectos farmacológicos e toxicológicos do inibidor seletivo da HDAC3 em organismos com obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD-TILLERY, K. M. et al. Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 41, n. 2, p. 91–102, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Mapa da Obesidade**. Disponível em: ><http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade><. Acesso em: 16 de abr. 2018.

ALCALAY, M. et al. Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 1977–1981, 1991.

ALLIS, C.D. et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell**, v.131, p. 633-636, 2007.

ARROWSMITH, C.H. et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 384–400, 2012.

BROIDE, R. S. et al. Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 31, p. 47–58, 2007.

CHAPMAN, I. M. Obesity paradox during aging. **Interdisciplinary topics in gerontology**, v. 37, p. 20-36, 2010.

CHATTERJEE, T. K. et al. Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 27836–27847, 2011.

CHATTERJEE, T. K. et al. Role of histone deacetylases 9 in regulating adipogenic differentiation and high fat diet induced metabolic disease. **Adipocyte**, v. 3, n. 4, p. 333-338, 2014.

CHI, P. et al. Covalent histone modifications- miswritten misinterpreted and misread in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 457-469, 2010.

COSGROVE, M.S.; WOLBERGER, C. How does the histone code work? **Biochemistry and Cell Biology**, v.83, p. 468-76, 2005.

CUI, H.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v.13, p338-351, 2017.

DEMMERLE, J.; KOCH, A. J.; HOLASKA, J. M. The Nuclear envelop protein Emerin binds directly to Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Activates HDAC3 activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 22080-22088, 2012.

DESERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 465–514, 2006.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in reproductive medicine**, v. 27, p. 351-357, 2009.

FONTANA, L.; HU, F. B. Optimal body weight for health and longevity: bridging basic, clinical, and population research. **Aging Cell**, v. 13, n. 3, p. 391-400, 2014.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural brain research**, v. 192, n. 1, p. 70-87, 2008.

GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, p. 17-31, 2004.

GUPTA-AGARWAL, S. et al. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. **Learning & Memory**, v. 21, n. 7, p. 351-362, 2014.

HARTMAN, H. B.; YU, J.; ALENGHAT, T.; ISHIZUKA, T.; LAZAR, M. A. The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. **EMBO Reports**, v. 6, p. 445–451, 2005

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Obesidade. **Bioquímica Ilustrada**. 5. ed. Porto-Alegre: Artmed, 2012. p. 349-356.

JIA, H. et al. The Effectsof Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice. **PLoS ONE**, v.11, n. 3, p. 1-14, 2016.

KABRA, D.G. et al. Hypothalamic leptin action is mediated by histone deacetylase 5. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-12, 2016.

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl=6J mice. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 639-646, 2000.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 7, p. 436-447, 2012.

LUNDH, M. et al. Histone deacetylase 3 inhibition improves glycaemia and insulin secretion in obese diabetic rats . **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, p. 703-707, 2015.

MACDONALD, J. L., ROSKAMS, A. J. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 2256–2267, 2008.

MALVAEZ, M. et al. DAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 7, p. 2647-2652, 2013.

McQUOWN, S. C. et al. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. **Journal of Neuroscience**, n. 31, p.764–774, 2011.

MICELLI, C.; RASTELLI, G. Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 6, p. 718-735, 2015.

MOTTIS, A.; MOUCHIROUD, L.; AUWERX, J. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. **Gene & Development**, v. 27, p. 819-835, 2013.

MUNSTER, P. N. et al. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatmente of patientes with hormone therapy-resistant breast câncer. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 12, p. 1828-1835, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1298p.

NEVALAINEN, T. et al. Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n.20, p. 1- 9, 2017.

NIEK, G. J. L et al. HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF- κ B p65 transcriptional activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 108, p. 58-74, 2016.

PANG, B. et al. Increased histone deacetylase activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 245, p. 105–107, 2016.

PANG, M.; ZHUANG, S. Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.335, p.266-272, 2010.

PARK, J. H. et al. Epigenetic modification by dietary factors: Implications in metabolic syndrome. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 58-70, 2017.

PHAN, M. L.; BIESZCZAD, K. M. Sensory Cortical Plasticity Participates in the Epigenetic Regulation of Robust Memory Formation. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

PERISSI, V. et al. Deconstructing repression: Evolving models of co-repressor action. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 109–123, 2012.

PESERICO, A., SIMONE, C., 2011. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 2-10, 2011.

PODOBINSKA, M. et al. Epigenetic Modulation of Stem Cells in Neurodevelopment: The Role of Methylation and Acetylation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 1- 16, 2017.

RAMAKRISHNAN, V. Histone structure and the organization of the nucleosome. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 26, p. 83-112, 1997.

REMSBERG, J. R. et al. Deletion of histone deacetylase 3 in adult beta cells improves glucose tolerance via increased insulin secretion. **Molecular Metabolism**, v. 6, p. 30-37, 2017.

RUIJTER, A. J. M. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 737-749, 2003

SADIKOVIC, B. et al. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. **Current genomics**, v. 9, p. 394-408, 2008.

SAKAKIBARA, I. et al. Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. **Cell Metabolism**, v. 9, p. 191–202, 2009.

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 4, p. 1-26, 2014.

SHA, K.; BOYER, L. A; The chromatin signature of pluripotent cells. **Stem Book**, 2009. Disponível em: <<http://www.stembook.org/node/585>>. Acesso em: 04 de abr.2017.

SUENAGA, M. et al. Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 97, p. 621- 625, 2002.

SUN, Z. et al. Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 934-942, 2012.

TANG, J.; YAN, H.; ZHUANG, S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. **Clinical Science**, v. 124, n. 11, p. 651-662, 2013.

VAHID, F. et al. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. **Gene**, v. 562, p. 8-15, 2015.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, p. 344-353, 2005.

VOGELAUER, M. et al. Stimulation of histone deacetylase activity by metabolites of intermediary metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n.38, p. 32006–32016, 2012.

WELLS, C. E. et al. Inhibition of Histone Deacetylase 3 Causes Replication Stress in Cutaneous T Cell Lymphoma. **PLOS One**, v. 8, n. 7, p. 1-16.

WEST, A. C.; JOHNSTONE, R. W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n.1, p. 30-39, 2014.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n.3, p. 505-512, 1998.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339- 345, 2013.

YANG, W. M. et al. Functional domains of histone deacetylase-3. **Journal of Biology Chemical**, v. 277, p. 9447-9454, 2002.

YUDKIN, J. S.; STEHOUWER, C. D.; EMEIS, J. J.; COPPACK, S.W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 972-978, 1999.

ZHU, W. G.; LAKSHMANAN, R. R.; BEAL, M. D.; OTTERSON, G. A. DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. **Cancer Research**, v. 61, p. 1327–133, 2001.

ZHOU, Y.; PENG, J.; JIANG, S. Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 4, p. 170–177, 2014.

ANEXO A- Certificado de aprovação (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2017 - ADENDO

Título: Investigação da via das quinureninas em um modelo de Encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Data da aprovação: 09/08/2017

Período de vigência do projeto: 09/08/2019

Pesquisadores(a): Cristiano Ricardo Jesse

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 99923-8767

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

CEUA

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos C67BL
Nº de animais	40 + 72 (acrécimo)
Peso/Idade	20 - 22 g / 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas

Manfredini
Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA