É bem conhecido que indivíduos clinicamente obesos exibem uma chance de desenvolver doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, câncer e acidente vascular cerebral. Uma metanálise recente mostra que a obesidade está associada a mortalidade por todas as causas significativamente maior (Flegal et al., 2013). Embora a epidemia de obesidade exija claramente soluções abrangentes, estratégias são urgentemente necessárias. A sinalização Hedgehog (Hh) é uma via evolutivamente conservada que controla o desenvolvimento tecidual e homeostase. Nesta via, os ligantes Hh ligam-se ao receptor Patched 1 (Ptch1) para aliviar sua inibição de Smoothened (Smo), uma proteína transmembranar de sete passagens, resultando em ativação pela família Gli de fatores de transcrição (Ingham e McMahon, 2001; Goetz et al., 2009). No entanto, mutações pontuais em Smoothened, como W535L (doravante SmoM2) originalmente descobertas em carcinoma basocelular esporádico humano, podem ativar a transcrição mediada por Gli independentemente de um ligante Hh (Xie et al., 1998; Long et al., 2001; Jeong et al., 2004a). Dos três gli proteínas em mamíferos, Gli2 e Gli3 são os efetores primários para transduzir a sinalização de Hh enquanto Gli1, um alvo direto de Gli2 e Gli3, funciona para amplificar a resposta transcricional da sinalização Hh (Bai et al., 2002; Park et al., 2000). Além disso, Gli2 é predominantemente um ativador transcricional em resposta a Hh, enquanto Gli3 existe principalmente como um repressor que é desreprimido após a sinalização de Hh (Wang et al., 2000; Pan et al., 2006; Bai e Joyner, 2001; Hilton et al., 2005). - encontrado para estimular a transcrição constitutivamente (Sasaki et al., 1999; Joeng e Long, 2009; Mill e outros, 2003). A sinalização de Hh tem sido implicada no desenvolvimento de tecidos adiposos. Estudos genéticos em Drosophila identificaram o Hh como um potente inibidor da formação de corpos gordurosos

Para ativar a sinalização Hh no tecido adiposo especificamente em camundongos pós-natais, DESEJAMOS usar o Alelo Pparg-tTA para direcionar a linhagem de adipócitos após a retirada de doxiciclina (Dox) do água potável. Para esse fim, primeiro avaliamos a especificidade e a eficácia do tecido de Pparg-tTA gerando camundongos com o genótipo de Pparg-tTA;TetO-Cre;mT/mG e monitorando a expressão de GFP em resposta à retirada do Dox. Após dois meses de retirada do Dox a partir dos dois meses de idade, observaram GFP tanto na gordura gonadal (tecido adiposo branco, doravante WAT) quanto na região interescapular depósito de gordura (tecido adiposo marrom, doravante BAT), bem como a gordura da medula óssea, mas não no fígado, o intestino ou o coração (Figura 1A). No entanto, a imunocoloração indicou que apenas um subconjunto de perilipina + adipócitos expressaram GFP (48 ± 6,1% em WAT; 35 ± 4,1% em BAT; 18 ± 3,0% em gordura da medula óssea, n = 3), indicando atividade de Cre em mosaico devido à expressão variada de tTA ou depuração desigual de Dox, ou ambos. Assim, Pparg-tTA em combinação com TetO-Cre atinge predominantemente, mas de forma incompleta, o tecido adiposo em camundongos adultos após a retirada de Dox. Em seguida, usamos Pparg-tTA para ativar a sinalização Hh no adipócito li neage em camundongos pós-natais. Especificamente, criamos camundongos com um alelo de cada um de Pparg-tTA, TetO-Cre e R26-SmoM2 (genótipo Pparg-tTA;TetO-Cre;R26SmoM2/+) em ração regular mais Dox desde a concepção até dois meses de idade, altura em que continuaram a tomar Dox (+Dox) ou foram desmamados de Dox (-Dox) por até 8, 18 ou 26 semanas (Figura 1B). Após 8 semanas de retirada do Dox, o alvo Hh

Os genes Ptch1 e Gli1 foram marcadamente induzidos, enquanto os genes marcadores de adipócitos Pparg, Cebpa e Fabp4 foram suprimidos em WAT, confirmando assim a eficácia da abordagem (Figura 1C). No entanto, os camundongos mantiveram um peso corporal normal mesmo após 18 semanas de retirada do Dox. embora eventualmente apresentem diminuição após 26 semanas (Figura 1D). Com 26 semanas, o –Dox os camundongos também exibiram uma porcentagem menor de gordura corporal, mas o metabolismo da glicose parecia normal de acordo com os testes de tolerância à glicose (GTT) (Figura 1E,F). Assim, a ativação prolongada de Hh no tecido adiposo suprime o acúmulo de gordura sem alterar a homeostase da glicose em camundongos alimentados com o comida normal. Em seguida, examinamos se a ativação de Hh afeta a obesidade causada por uma dieta rica em gordura. Por esta, os camundongos transgênicos triplos (Pparg-tTA;TetO-Cre;R26SmoM2/+) criados com ração regular e Dox de concepção até os dois meses de idade foram submetidos a uma dieta rica em gordura (HFD) por até 16 semanas, com ou sem tratamento contínuo com Dox (+Dox ou –Dox, respectivamente) (Figura 2A). O - Camundongos Dox eram visivelmente mais magros do que o grupo +Dox após 8 semanas de tratamento com HFD (Figura 2B, Ç). Com 8 semanas, os camundongos –Dox já apresentavam menor percentual de gordura do que os camundongos +Dox (Figura 2D). Ambos os depósitos de gordura gonadal (WAT) e interescapular (BAT) foram marcadamente reduzido nos camundongos -Dox, consistente com uma diminuição notável no tamanho dos adipócitos (Figura 2E,F). Além disso, os adipócitos da medula óssea, facilmente detectáveis pela imunocoloração de perilipina nos ossos longos dos camundongos +Dox, estavam essencialmente ausentes no grupo –Dox (Figura 2G). As análises moleculares confirmaram que os genes marcadores de adipócitos foram significativamente suprimidos em WAT e BAT dos camundongos –Dox, enquanto Gli1 e Ptch1 foram bastante elevados (Figura 2H,I). Além disso, a indução de Gli1 foi restrita a WAT e BAT, mas não aos outros tecidos nos camundongos -Dox, confirmando a especificidade pretendida para tecidos adiposos (Figura 2J). Finalmente,

como a obesidade geralmente leva à intolerância à glicose e à resistência à insulina, examinamos se a supressão do acúmulo de gordura pela Hh resulta em benefícios metabólicos. Os camundongos –Dox exibiram depuração mais rápida da glicose no teste de tolerância à glicose (GTT) e maior sensibilidade à insulina em o teste de tolerância à insulina (ITT) do que suas contrapartes +Dox (Figura 2K,L). Para testar a possibilidade que os fenótipos aqui podem ser devidos ao efeito lipodistrófico do alelo Pparg-tTA ou ao efeito antimicrobiano de Dox como relatado anteriormente, repetimos o experimento com camundongos portadores sem transgene ou apenas Pparg-tTA (Kim et al., 2007; Cho et al., 2012). Após 8 semanas de HFD com ou sem Dox (a partir dos dois meses de idade), não observamos diferença peso corporal, composição corporal ou metabolismo da glicose entre os grupos +Dox e –Dox (Figura 2—figura suplemento 1). Assim, a ativação de Hh na linhagem Pparg é suficiente para suprimir obesidade e melhorar o metabolismo da glicose em resposta a uma dieta rica em gordura.

Hedgehog inibe a adipogênese via Gli2

Embora a sinalização de Hh tenha demonstrado anteriormente inibir a adipogênese, o mecanismo subjacente não é totalmente compreendida. Para obter informações adicionais, estudamos o efeito anti-adipogênico de Hh sinalização na linha celular progenitora mesenquimal da medula óssea murina M2-10B4 (doravante M2),que mostramos anteriormente responder de forma robusta à sinalização de Hh (Shi et al., 2015a). As células M2 sofreu adipogênese quando cultivada em meio adipogênico, conforme indicado pela indução de Cebpb e Cebpd já em 6 h e Pparg, Cebpa e Fabp4 após 48 h (Figura 2 - figura suplemento 2). Adição do agonista Hh purmorfamina (PM) ao meio adipogênico adipogênese completamente abolida, conforme indicado pela perda da coloração óleo-vermelho O (Figura 2—figura suplemento 3). Curiosamente, PM suprimiu marcadamente Pparg, Cebpa e Fabp4, mas não Cebpb ou Cebpd que é conhecido por funcionar em um estágio anterior da adipogênese (Figura 2 - suplemento de figura 3). Assim, a sinalização de Hh inibe a diferenciação de adipócitos de uma maneira específica do estágio. Em seguida, procuramos distinguir a contribuição relativa dos diferentes fatores de transcrição Gli para a função anti-adipogênica de Hh. Knockdown de Gli2 com shRNA reduziu o nível de mRNA de Gli2 em 75% e essencialmente anulou o efeito inibitório de PM na indução de Pparg, Cebpa e Fabp4 pelo meio adipogênico (Figura 3A). Em contraste, derrubar Gli1 ou Gli3 para um grau não embotou o efeito anti-adipogênico do PM (Figura 3 - figura suplemento 1). óleo vermelho O A coloração confirmou que o knockdown de Gli2, mas não de Gli1 ou Gli3, restaurou completamente o número de adipócitos na presença de PM (Figura 3B). Para confirmar o efeito anti-adipogênico de Gli2, cultivamos fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) de camundongos R26DNGli2/+ e ativamos a expressão de DNGli2 (uma forma constitutivamente ativa de Gli2) do locus Rosa26 com um adenovírus expressando Cre (Ad-Cre) (Joeng e Long, 2009). DNGli2 essencialmente aboliu a indução de Cebpa, Pparg e Fabp4 mRNA, bem como as células O-positivas de óleo vermelho pela mídia adipogênica (Figura 3C, D). Assim, Gli2 é o principal mediador da Hh para inibir a adipogênese. O Gli2 constitutivamente ativo previne a obesidade induzida por dieta rica em gordura Os dados até agora indicam que a sinalização de Hh suprime a adipogênese via ativação de Gli2. Esta descoberta prevê que a ativação de Gli2 recapitularia o efeito da sinalização de Hh no acúmulo de gordura in vivo. Para testar essa previsão, usamos o mesmo regime Dox descrito acima para expressar DNGli2 no linhagem de adipócitos (Figura 4A). Resumidamente, camundongos com o genótipo de Pparg-tTA;TetO-cre;R26DNGli2/+

foram mantidos com Dox e ração regular desde a concepção até os dois meses de idade antes de serem separados em dois grupos, ambos recebendo HFD, mas um continuando com Dox (+Dox) e o outro sem dox (-Dox) por até 18 semanas. Os camundongos –Dox ficaram significativamente mais magros do que os ratos +Dox após 8 semanas de HFD, e sua diferença no peso corporal aumentou com o tempo (Figura 4B,C). Análises da composição corporal com ressonância magnética revelaram uma redução notável na gordura e um aumento correspondente na massa magra massa nos camundongos –Dox após 8 semanas (Figura 4D). Naquela época, os depósitos de gordura gonadal (WAT) e interescapular (BAT) estavam diminuídos e continham adipócitos menores nos camundongos -Dox (Figura 4E, F). A imunocoloração de perilipina em seções de ossos longos revelou que a gordura da medula óssea foi essencialmente eliminada nos camundongos –Dox (Figura 4G). Análises moleculares confirmaram que a retirada de Dox levou a indução acentuada de Ptch1 e Gli1 em WAT e BAT, redução de Pparg, Cebpa, Fabp4 em WAT e supressão de Ucp1, Cidea em BAT (Figura 4H,I). Finalmente, em comparação com as contrapartes +Dox, os camundongos –Dox exibiram um nível de glicose basal mais baixo, melhor tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina após 8 semanas de tratamento com HFD (Figura 4J,K). Assim, como SmoM2, a ativação pós-natal de Gli2 na linhagem de adipócitos suprime a obesidade e a disfunção metabólica causada por um alto dieta gorda.

Wnt6 é induzido pela sinalização Hh-Gli2

Em seguida, procuramos potenciais mediadores a jusante para a função anti-adipogênica da sinalização de Hh. Anteriormente, realizamos RNA-seq para comparar o perfil de expressão de mRNA em células M2 com ou sem purmorfamina (PM) por 72 horas (Shi et al., 2015b). Esses experimentos revelaram aproximadamente 750 genes exibindo pelo menos uma mudança de 2 vezes (365 para cima e 382 para baixo) em resposta a Ativação Hh (arquivo complementar 1). Entre os genes upregulated, Wnt5a, Wnt6 e Wnt9a atraiu nossa atenção, pois a sinalização Wnt é conhecida por inibir a adipogênese. RT-qPCR confirmou a indução de todos os três genes Wnt por PM em células M2, sendo o de Wnt6 o mais robusto, atingindo mais de 10 vezes após 48 horas (Figura 5A). Knockdown de Gli2 com shRNA essencialmente eliminou a indução dos genes Wnt por PM (Figura 5B). Consistente com os achados em células M2, MEFs isolados do camundongo R26DNGli2/+ e infectado com expressão de Wnt5a, Wnt6 e Wnt9a suprarregulada por Ad-Cre em 216, 1200 e 64 vezes, respectivamente, sobre as células infectadas com Ad-GFP (Figura 5C). Além disso, quando o RNA de toda a gordura gonadal foi analisado, o Wnt6 foi induzido quando SmoM2 ou DNGli2 foi ativado após a retirada de Dox, embora Wnt5a ou Wnt9a fosse reduzida ou inalterada (Figura 5D,E). A indução de Wnt6 pode ser relevante, pois foi anteriormente demonstrou inibir a adipogênese (Cawthorn et al., 2012). Importante, Axin2, um alvo Wnt prototípico gene, foi regulado positivamente no coxim de gordura gonadal após a expressão de DNGli2, confirmando a ativação de Sinalização Wnt/b-catenina in vivo (Figura 5E). A falha em detectar a indução Wnt5a ou Wnt9b no depósito de gordura total pode resultar da heterogeneidade celular, e a penetrância incompleta de Pparg-tTA dentro do tecido como mostrado anteriormente. Alternativamente, Wnt5a ou Wnt9b podem não ser induzidos por Hh sinalização in vivo. No geral, a ativação de Hh induz a expressão de Wnt6 e provavelmente ativa b-catenina sinalização no tecido adiposo, mas a contribuição específica de Wnt6 para a atividade anti-adipogênica de Hh ainda precisa ser testado in vivo. A inibição da secreção de Wnt alivia a função anti-adipogênica de Hh in vitro Em seguida, testamos se Hh requer produção de Wnt de novo para inibir a adipogênese in vitro.

Como a palmitoilação pela O-aciltransferase Porcupine (Porcn) é essencial para a secreção de Wnt, nós usou IWP2, um inibidor de pequena molécula de Porcn, para inibir a sinalização parácrina Wnt (Chen et al., 2009). Em células M2, IWP2 reduziu o nível de mRNA de Nkd2, um alvo transcricional conhecido da sinalização Wnt-bcatenina, confirmando a eficácia do inibidor (Figura 6A). No meio adipogênico, IWP2 estimulou modestamente a expressão de Pparg e Fabp4, mas aliviou bastante a supressão de Pparg, Cebpa e Fabp4 por PM (Figura 6B). Quantificação de adipócitos com coloração de oil red O confirmaram que o IWP2 restaurou significativamente a adipogênese em face da PM (Figura 6C). Para testar o relação entre a sinalização Wnt e Hh em células primárias, isolamos pré-adipócitos gordura gonadal de camundongos Pparg-tTA;TetO-Cre;R26DNGli2/+ com dois meses de idade que foram mantidos em Dox desde a concepção (sem expressão de DNGli2) e, em seguida, cultivou as células por 3 dias em qualquer meio de crescimento ou meio adipogênico com (+Dox) ou sem Dox (-Dox). Como esperado, as células –Dox expressaram mais Gli1 mRNA, mas responderam significativamente menos aos estímulos adipogênicos que induzem Pparg e Fabp4 (Figura 6D). No entanto, quando IWP2 foi adicionado ao meio adipogênico, a indução de Pparg e Fabp4 foi melhorada nas células –Dox (Figura 6E). Assim, a inibição da secreção de Wnt alivia parcialmente a supressão da adipogênese pela sinalização de Hh.

A sinalização Hedgehog reduz a contribuição da glicose para os lipídios nos adipócito

A superexpressão de SmoM2 ou DNGli2 resultou em um tamanho menor de adipócitos. Este achado indica que a sinalização Hh suprime a hipertrofia dos adipócitos em resposta à dieta rica em gordura. Examinar Essa regulação em mais detalhes, nós induzimos pré-adipócitos primários de camundongos selvagens para formar adipócitos (três dias em meio adipogênico) e então avaliamos o efeito do PM especificamente na fase de acúmulo de lipídios (onze dias em meio apenas de insulina). Ensaios de RT-qPCR indicaram que PM reduziu significativamente a expressão de genes de lipogênese, como Lpl (lipoproteína lipase), Fasn (ácido graxo sintase), Plin (perilipina) e Dgat1 (diacilglicerol aciltransferases 1) sem afetar o marcador de diferenciação Fabp4 (Figura 7A). Além disso, medindo o tamanho do lipídio manchado de vermelho-óleo gotas, descobrimos que PM reduziu significativamente o tamanho médio da gota (Figura 7B). Para avaliar o relevância da secreção de Wnt nesta regulação, testamos o efeito de IWP2 especificamente na fase de acúmulo de lipídios (onze dias em meio contendo insulina) isoladamente ou em conjunto com PM. IWP2 sozinho não teve um efeito óbvio no tamanho das gotículas lipídicas, mas eliminou a supressão por PM (Figura 7B). Para determinar o papel de Gli2 na formação de lipídios, realizamos experimentos semelhantes com pré-adipócitos primários isolados de camundongos R26DNGli2/+. Especificamente, induzimos adipócitos diferenciação por três dias e, em seguida, ativou a expressão de DNGli2 com Ad-Cre no mídia com ou sem IWP2 por onze dias. Considerando que a expressão de DNGli2 induzida por Ad-Cre reduziu o tamanho médio das gotículas lipídicas, IWP2 aboliu o efeito (Figura 7C). Assim, além inibindo a diferenciação dos adipócitos, a sinalização Hh-Gli2 suprime o acúmulo de lipídios nos adipócitos através de um mecanismo mediado por Wnt. Como a glicose é a principal fonte de carbono para a formação de lipídios, procuramos determinar o efeito da sinalização de Hh na utilização de glicose pelos adipócitos. Após pré-adipócitos primários de tipo selvagem camundongos foram induzidos por três dias a formar adipócitos, o consumo de glicose foi determinado para o próximos três dias quando o lipídio se acumulou em resposta à insulina com ou sem PM ou IWP2. O PM diminuiu significativamente o consumo de glicose e essa redução foi resgatada pelo IWP2 (Figura 7D). No entanto, nem PM nem IWP2 tiveram qualquer efeito sobre os níveis de lactato no meio, indicando que a diminuição no consumo de glicose em resposta à sinalização de Hh provavelmente reduziu o fluxo de glicose para outros destinos como a formação de lipídeos (Figura 7E). Para investigar diretamente a contribuição da glicose para a formação de lipídios, rastreamos a incorporação de carbonos de glicose aos lipídios celulares adicionando o radioactivamente [U-14C6]-glicose marcada para o meio somente de insulina para os três dias finais do acúmulo de lipídios fase (total 11 dias) com ou sem adição de PM ou IWP2. PM diminuiu significativamente o 14C contribuição para lipídios enquanto IWP2 teve o efeito oposto. É importante ressaltar que o IWP2 restaurou a contribuição da glicose para o nível de controle na presença de PM, embora o nível resgatado fosse menor do que isso por IWP2 sozinho (Figura 7F). Tomados em conjunto, os resultados demonstram que as funções de sinalização Hh parcialmente através da indução de Wnt para inibir não apenas a diferenciação de adipócitos, mas também o acúmulo de lipídios em adipócitos (Figura 7G).

Discussão

Relatamos que a ativação da sinalização Hh é eficaz na supressão da obesidade e das anormalidades metabólicas associadas causadas por dieta rica em gordura em camundongos adultos. A nível celular, o Hh inibe não só diferenciação de adipócitos, mas também produção de lipídios por adipócitos. Molecularmente, Gli2 é o princípio fator de transcrição na família Gli para mediar os efeitos anti-adipogênicos e anti-lipogênicos de Hh sinalização. O estudo não apenas lança uma nova luz sobre o mecanismo de sinalização de Hh na adipogênese, mas também fornece uma prova de princípio de que a ativação de Hh pode ser explorada para tratamento farmacêutico de obesidade. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a investigar o efeito da sinalização de Hh especificamente em camundongos adultos e em resposta à dieta rica em gordura. Embora estudos anteriores tenham identificado uma papel inibitório para Hh na formação de tecido adiposo durante a embriogênese, é necessário avaliar sua efeito em adultos e em resposta a influências dietéticas se a via fosse explorada para fins terapêuticos (Pospisilik et al., 2010; Nosavanh et al., 2015). Estudos recentes demonstraram que tanto a formação de adipócitos de novo (hiperplasia) quanto a hipertrofia contribuem para o acúmulo de gordura em resposta à dieta rica em gordura, e que depósitos de gordura anatomicamente diferentes empregam os dois mecanismos diferentemente (Wang et al., 2013). Como os tecidos adiposos distintos diferem substancialmente em sua contribuição para o metabolismo de nutrientes de todo o corpo, é fundamental avaliar se a sinalização de Hh diferencialmente afeta os diferentes depósitos de gordura. Aqui, descobrimos que a ativação de Hh suprimiu acentuadamente a hipertrofia de adipócitos em WAT e BAT em camundongos alimentados com dieta rica em gordura. Juntamente com os estudos em in vitro, esses resultados estabelecem que a ativação de Hh previne a obesidade causada por dieta rica em gordura por meio da inibição tanto da hiperplasia quanto da hipertrofia dos adipócitos. O estudo atual forneceu uma nova visão mecanicista sobre o efeito inibitório da sinalização de Hh na adipogênese. O trabalho distingue Gli2 de outros membros da família Gli como o principale efetor de Hh para suprimir a diferenciação de adipócitos. Os efetores a jusante para Gli2 neste processo, no entanto, permanecem não resolvidos no momento. Nosso trabalho de cultura celular indica que a ativação de Wnt parcialmente medeia as funções anti-adipogênicas e anti-lipogênicas da sinalização de Hh, mas a relevância fisiológica de tal mecanismo de retransmissão Hh-Wnt ainda precisa ser testada in vivo. Nesse sentido, vale observando que a proteína 5 relacionada ao frizzled secretada, um antagonista secretado das proteínas Wnt, foi relatada para estimular a hipertrofia dos adipócitos na obesidade (Mori et al., 2012). Além disso, estudos anteriores têm implicou Hes1 na mediação da função anti-adipogênica de Hh, e também observamos a

indução de Hes1 por PM em células M2 (Pospisilik et al., 2010). Assim, é provável que a sinalização de Hh-Gli2 emprega múltiplos efetores para suprimir a formação e função dos adipócitos. Nossos resultados indicam que Hh pode empregar mecanismos não autônomos celulares para suprimir formação de tecidos. Embora o Pparg-tTA visou menos de 50% dos adipócitos em WAT ou A ativação de BAT, Hh nas células-alvo não apenas diminuiu acentuadamente a dimensão geral de todos depósitos adiposos, mas também reduziu o tamanho individual de todos os adipócitos em WAT ou BAT. Ainda mais surpreendentemente, a ativação de Hh em menos de 20% dos adipócitos da medula óssea essencialmente aboliu toda a medula gordura. Esses resultados são consistentes com o modelo de que a ativação de Hh em células da linhagem de adipócitos induziu expressão de sinais parácrinos, como as proteínas Wnt, para suprimir a diferenciação de adipócitos e hipertrofia. Alternativamente, a ativação de Hh em um subconjunto de células pode levar a mudanças na circulação fatores que, por sua vez, suprimem o acúmulo de gordura sistemicamente. Experimentos futuros são necessários para distinguir essas possibilidades. Um grande fardo para a saúde da obesidade é a desregulação do metabolismo da glicose em todo o corpo. Nosso O resultado mostra que, ao suprimir o acúmulo de gordura causado por HFD, a ativação de Hh melhorou o metabolismo sistêmico da glicose no camundongo. Curiosamente, embora a ativação de Hh também tenha suprimido acúmulo de tecido adiposo em camundongos em dieta regular, os ratos magros não exibiram nenhuma alteração no metabolismo da glicose. Esta observação é semelhante ao estudo anterior, onde Sufu foi deletado com aP2-Cre, e indica que a ativação de Hh nos tecidos adiposos em um estado saudável tem efeitos mínimos no metabolismo geral da glicose. Assim, a ativação direcionada da sinalização de Hh pode ser explorada farmaceuticamente para melhorar as anormalidades metabólicas associadas à obesidade. ~

estudos com camundongos

As cepas de camundongos de Pparg-tTA, TetO-Cre, R26-SmoM2 e R26-DNGli2 foram relatadas (Joeng e Long, 2009; Kim et al., 2007; Jeong et al., 2004b; Perl et al., 2002). O Comitê de Estudos Animais da Universidade de Washington em St. Louis aprovou todos os procedimentos com camundongos. Os experimentos foram realizados com camundongos machos e fêmeas em um fundo genético misto de C57BL/6 (~70%) e 129 (~30%). Camundongos foram alimentados com ração normal (4% de gordura por peso, 11% de calorias de gordura, Teklad) e água com doxiciclina (1 mg/ml) até os dois meses de idade e depois expostos a dieta hiperlipídica (21% de gordura por peso, 42% de calorias de gordura, Harlan, cat# td.88137) com ou sem água com doxiciclina. As composições de gordura foram medidas com EchoMRI. Para GTT e ITT, D-glicose (1 g/kg de peso do camundongo) ou insulina humana (0,75 unidade/kg de peso do camundongo) (Lilly, Indianápolis, Indiana), respectivamente, foi injetada intraperitonealmente após 6 horas de inanição. Os níveis de glicose no sangue foram medidos nos intervalos indicados (Li et al., 2000). Cada camundongo foi considerado uma réplica biológica. Todos os pontos de dados foram incluídos para análises. Para histologia, os depósitos adiposos foram fixados com formalina e embebidos em parafina antes de serem seccionados em 6 mm de espessura e corados com hematoxilina e eosina. Para imunocoloração das seções ósseas, os fêmures foram fixados com 4% de PFA durante a noite e descalcificados por 3 dias em 14% EDTA antes de ser processado para seccionamento em uma máquina de criostato. Anticorpo perilipina (#9349, Sinalização celular) foi utilizada na diluição de 1:100. Alexa fluor 594 cabra anti-coelho IgG (H + L) (#A11012, Invitrogen) anticorpo secundário foi usado na diluição de 1:200.-