



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ilitch Aquino Marcondes de Castro

**Análogo de oxintomodulina (cotadutida) na doença hepática
gordurosa não alcoólica de camundongos obesos com ênfase na
via AMPK/mTOR**

Rio de Janeiro

2023

Ilitch Aquino Marcondes de Castro

Análogo de oxintomodulina (cotadutida) na doença hepática gordurosa não alcoólica de camundongos obesos com ênfase na via AMPK/mTOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS/ CB/A

M321 Marcondes-de-Castro, Ilitch Aquino (Castro, Ilitch Aquino Marcondes de)
Análogo de oxintomodulina (cotadutida) na doença hepática gordurosa não alcoólica de camundongos obesos com ênfase na via AMPK/mTOR / Ilitch Aquino Marcondes de Castro. – 2023. 57 f.
Orientadora: Prof.^a Dra. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.
1. Síndrome metabólica. 2. Fígado gorduroso. 3. Obesidade. 4. Diabetes Mellitus tipo 2. 5. Resistência à insulina. 6. Camundongos. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611-018.26

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB-7/5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ilitch Aquino Marcondes de Castro

Análogo de oxintomodulina (cotadutida) na doença hepática gordurosa não alcoólica de camundongos obesos com ênfase na via AMPK/mTOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Profª Drª Alessandra Pinheiro da Rocha Mulder
Instituto de Nutrição – UERJ

Profª Drª Celina Carvalho Borges
Universidade Estácio de Sá

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

À minha família,
meu maior exemplo e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e familiares por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência. Especialmente minha namorada Caroline Batista por todo apoio incondicional.

As técnicas Aline Penna e Andrea Bertoldo pelo auxílio nas técnicas elaboradas.

As pós-doutorandas Fabiane Ferreira Martins e Thatiany de Souza Marinho, por todos os ensinamentos e paciência.

Aos amigos feitos no laboratório por toda a caminhada e debate de ideias que auxiliaram na construção desse projeto, principalmente a Brenda Akemi Nagagata e Matheus Ajackson.

Aos professores, os seus ensinamentos que tornaram possível toda essa construção, e em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda, pela oportunidade e toda a confiança depositada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

MARCONDES-DE-CASTRO, Ilitch Aquino. **Análogo de oxintomodulina (cotadutida) na doença hepática gordurosa não alcoólica de camundongos obesos com ênfase na via AMPK/mTOR.** 2023. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2023.

Obesidade, inflamação e doença hepática gordurosa não alcoólica estão associadas à resistência à insulina e diabetes Mellitus tipo 2. A cotadutida é um agonista duplo GLP-1/glucagon em estudo pré-clínico fase 2 que apresenta efeito anti-obesogênico. Camundongos machos com 12 semanas de idades (C57BL/6), obesos induzidos por dieta (DIO) foram tratados por quatro semanas com cotadutida (30nm/kg) uma vez ao dia e administrada por via subcutânea. Os grupos formados foram (n=10/grupo): C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica + cotadutida. O estudo focou nos parâmetros metabólicos e estruturais do fígado (doença hepática gordurosa não alcoólica, DHGNA), vias AMPK/mTOR e o estresse do retículo endoplasmático (RE). A cotadutida controlou o ganho de peso, tratou a intolerância à glicose, a resistência à insulina, aumentou a sensibilidade à insulina e mostrou efeitos benéficos nos marcadores plasmáticos em camundongos DIO (enzimas hepáticas (ALT e AST), triacilglicerol (TAG) e colesterol hepático (CT), leptina, adiponectina. Além disso, a cotadutida diminuiu o acúmulo de gordura no fígado, melhorou a expressão gênica das vias AMPK, mTOR e do RE. Portanto, o efeito da cotadutida relacionado à via hepática AMPK/mTOR e ao estresse do RE foi benéfica. Em conclusão, a cotadutida induziu a perda de peso e melhorou a intolerância à glicose, resistência à insulina e aumentou a sensibilidade à insulina, assim como diminuiu os marcadores relacionados a via mTOR, diminuindo assim a lipogênese, aumentou a expressão da via da AMPK, sugerindo assim uma melhor eficiência metabólica. Desta forma, a cotadutida apresentou efeitos benéficos no metabolismo lipídico no fígado, atenuando a esteatose hepática. À vista disso, a cotadutida reduz o estresse do RE. Essas ações da cotadutida recuperaram a via AMPK e mTOR, e atuou na diminuição da DHGNA, na inflamação e no estresse do RE no fígado de camundongos DIO.

Palavras-chave: Obesidade; duplo agonismo GLP-1/Glucagon; DHGNA; via mTOR; retículo endoplasmático.

ABSTRACT

MARCONDES-DE-CASTRO, Ilitch Aquino. **Oxyntomodulin analog (cotadutide) in non-alcoholic fatty liver disease in obese mice with emphasis on the AMPK/mTOR pathway**. 2023. 57 p. . Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental), Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2023.

Obesity, inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease are associated with insulin resistance and type 2 diabetes. Cotadutide is a dual agonist GLP-1/glucagon in a preclinical study phase 2 that presents an anti-obesity effect. Diet-induced obese (DIO) C57BL/6 mice were treated for four weeks with cotadutide (30nm/kg) once a day administrated subcutaneously. The groups formed were (n=10/group): C, control; CC, control+cotadutide; HF, high-fat; HFC, high-fat+cotadutide. The study focused on the metabolic and structural parameters of the liver (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), AMPK/mTOR pathways, and the endoplasmic reticulum (ER) stress. Cotadutide controls weight gain and treats glucose intolerance and insulin resistance, showing beneficial effects on plasma markers in DIO mice, liver enzymes, triacylglycerol (TAG) and hepatic cholesterol (TC), leptin, and adiponectin. Also, cotadutide lessened liver fat accumulation. Furthermore, the effects of cotadutide were related to liver AMPK/mTOR pathway and ER stress. In conclusion, cotadutide induces weight loss and improves glucose intolerance and insulin resistance. In addition, cotadutide shows beneficial effects on liver lipid metabolism, mitigating steatosis. Besides, cotadutide reduces ER stress. These actions of cotadutide rescued the AMPK and mTOR pathway and improved diminishing NAFLD, inflammation, and ER stress in the liver of DIO mice.

Keywords: Obesity; dual agonism GLP-1/Glucagon; NAFLD, mTOR pathway, endoplasmic reticulum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Peso corporal	28
Figura 2	Fotomicrografia hepática, peso do fígado, PF/PC e esteatose	31
Figura 3	Expressão gênica hepática: Via da AMPK	32
Figura 4	Expressão gênica hepática: Via da mTOR <u>.....</u>	33
Figura 5	Expressão gênica hepática: Estresse do retículo endoplasmático ...	34
Figura 6	Via AMPK na saúde hepática	38
Figura 7	Via mTOR na doença hepática gordurosa não alcóolica	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas	24
Tabela 2	Primers utilizados	27
Tabela 3	Dados gerais de biometria e bioquímica	30
Tabela 4	Análise de variância de dois fatores	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acaca	Acetil-coa carboxilase alfa (do inglês, Acetyl-coa carboxylase alpha);
Acacb	Acetil-coa carboxilase beta (do inglês, Acetyl-coa carboxylase beta);
AGLs	Ácidos graxos livres;
Akt	Proteína quinase B (do inglês, Protein kinase B);
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (do inglês, AMP-activated protein kinase)
AST	Aspartato aminotransferase;
Atf4	Fator-4 ativador da transcrição (do inglês, Activating transcription factor 4);
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês, Adenosine triphosphate);
C	Dieta controle;
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico, (do inglês, cyclic AMP (adenosine monophosphate));
CC	Dieta controle + cotadutida;
Chop	Proteína homóloga C/EBP (do inglês, CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein);
Chrebp	Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (do inglês, Carbohydrate-responsive element-binding protein);
CT	Colesterol total;
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica;
DIO	Camundongos obesos induzidos por dieta (do inglês, Diet induced obesity);
DM2	Diabetes mellitus 2;
DPP4	Dipeptidil peptidase IV;
Eef2	Fator de alongamento eucariótico 2 (do inglês, Eukaryotic translation elongation factor 2);
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica;
Eif4ebp1	Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (do inglês, Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1);

FIRI	Índice de resistência à insulina em jejum (do inglês, Fasting insulin resistance index);
Gadd45	Proteína de parada de crescimento e danos ao DNA (do inglês, Growth arrest and DNA-damage-inducible protein);
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose, (do inglês, Gastric inhibitory polypeptide);
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon, (do inglês, Glucagon like-peptide 1);
GLP-1RA	Receptor agonista do peptídeo-1 semelhante ao glucagon, (do inglês, Glucagon like-peptide 1 receptor agonism);
GR	Receptor de glucagon, (do inglês, Glucagon receptor);
HF	Dieta high-fat;
HFC	Dieta high-fat + cotadutida;
IA	Ingestão alimentar;
IE	Ingestão energética;
Ir	Receptor de insulina (do inglês, Insulin receptor);
LDN	Lipogênese de novo;
Mtorc1	Alvo mamífero da via da rapamicina (do inglês, Mammalian target of rapamycin);
Nr1h3	Receptor nuclear subfamília 1 grupo H membro 3 (do inglês, Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3)
Nr1h4	Receptor nuclear subfamília 1 grupo H membro 4 (do inglês, Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4)
OS	Estresse oxidativo (do inglês, Oxidative stress);
OXM	Oxintomodulina
PC	Peso corporal;
PF	Peso do fígado;
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase, (do inglês, phosphoinositide 3-kinase);
Pik3c2a	Polipeptídeo alfa contendo o domínio C2 de fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinase (do inglês, Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing alpha polypeptide);
PLIN2	Perilipina 2 (do inglês, Perilipin 2)

Prkag2	Proteína quinase ativada por AMP não-catalítica subunidade gama-2 (do inglês, protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2);
QUICKi	Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina (do inglês, Quantitative insulin sensitivity check index);
RE	Retículo endoplasmático;
RI	Resistência à insulina;
Rps6kb1	Proteína quinase S6 ribossomal B1 (do inglês, Ribosomal protein S6 kinase B1);
Sirt1	Sirtuína 1 (do inglês, Sirtuin 1);
Srebf1	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (do inglês, Sterol regulatory element binding transcription factor 1);
TAG	Triacilglicerol;
Tbp	Proteína de ligação TATA (do inglês, TATA-box binding protein);
Tsc2	Complexo de esclerose tuberosa 2 (do inglês, Tuberous sclerosis complex 2);
Ulk3	Quinase 3 semelhante à unc-51 (do inglês, Unc-51-like kinase 3);

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. OBJETIVOS	21
1.1 Objetivo geral	21
1.2 Objetivos específicos	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Animais, dieta e tratamento	22
2.2 Peso corporal, ingestão alimentar e consumo de energia	23
2.3 Sacrifício	24
2.3.1 Plasma	25
2.3.2 Fígado	25
2.3.3 Expressão gênica	26
2.4 Análise estatística	26
3. RESULTADOS	28
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS	44
Anexo A Comitê de ética	53
Anexo B Artigo publicado no <i>Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology</i>	54
Anexo C Artigo publicado na <i>Life Sciences</i>	55
Anexo D Artigo publicado no <i>Journal of Molecular Endocrinology</i>	56
Anexo E Artigo publicado no <i>Research in Hepatology and Gastroenterology</i>	57

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica e recorrente, com uma inflamação de baixo grau e de difícil tratamento, que necessita acompanhamento contínuo. A obesidade tornou-se problema de saúde pública, uma vez que as consequências para a saúde são muitas, como o risco aumentado de morte prematura a doenças crônicas não transmissíveis, que afetam diretamente a qualidade de vida (Kolotkin *et al.*, 2001) e diminuem a expectativa de vida (Peeters *et al.*, 2003; Jura e Kozak, 2016).

A obesidade está associada ao risco de desenvolver várias comorbidades, como dislipidemia, resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e sua progressão para esteatohepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e, possivelmente, carcinoma hepatocelular (De Minicis *et al.*, 2013; Tomic *et al.*, 2018).

O modelo de camundongos “obeso induzido por dieta” (DIO) desenvolve alterações metabólicas e orgânicas compatíveis com a obesidade humana, incluindo acúmulo de gordura e DHGNA. Logo, modelos experimentais DIO são usados para estudar a obesidade. Acredita-se que animais DIO imitem melhor o estado de obesidade comum em humanos do que a maioria dos modelos geneticamente modificados, sendo uma escolha para testar possíveis intervenções terapêuticas (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2021). O modelo animal também pode apresentar algumas das alterações metabólicas mais frequentes da obesidade, como hiperglicemia, resistência à insulina ou insensibilidade à insulina (Fraulob *et al.*, 2010; Lutz e Woods, 2012; Reis-Barbosa *et al.*, 2022b).

O modelo DIO é indicado para obter informações precisas de um grupo de animais no mesmo estágio da doença e livre de outros fatores. Estes podem então ser comparados com controles apropriados – por exemplo, separando, pela alimentação pareada, o efeito da ingestão de alimentos e outros efeitos metabólicos (Lutz e Woods, 2012). Experimentos com animais também permitem a manipulação precisa da dieta o que é um desafio metodológico importante com estudos em humanos (Albracht-Schulte *et al.*, 2019; Aminian *et al.*, 2020).

A DHGNA é uma doença metabólica associada com resistência à insulina e obesidade, complexa e multifatorial, com prevalência crescente na população (Aguila *et al.*, 2010). O espectro se caracteriza pelo acúmulo de gordura no fígado e tem uma estimativa de 30% de prevalência em países desenvolvidos (Rinella, 2015). Danos

consistentes no fígado levam à inflamação e fibrose (Friedman *et al.*, 2018), além de uma possível evolução a cirrose e carcinoma hepatocelular (Rui e Lin, 2022).

Doenças metabólicas induzidas pelo consumo excessivo de macronutrientes, principalmente gorduras saturadas são ameaças crescentes, levando à obesidade e resistência à insulina/diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Pang *et al.*, 2016). Com isso, o excesso de nutrientes dos alimentos contribui ativamente para o aparecimento da DHGNA e sua progressão (Xu *et al.*, 2017; Tomic *et al.*, 2018). A patogênese da DHGNA aumenta o estresse do retículo endoplasmático (RE), estresse oxidativo (OS), e dano mitocondrial nos hepatócitos, assim como pode alterar a microbiota intestinal (Cave *et al.*, 2016; Campana *et al.*, 2021).

A proliferação celular e a geração de energia são funções básicas no organismo de qualquer ser vivo. O crescimento depende da proliferação celular e a vida depende da geração de energia (Garcia e Shaw, 2017). Assim, a sobrevivência, o desenvolvimento e o envelhecimento da espécie seriam impossíveis sem a ação das vias metabólicas relacionadas a *proteína quinase ativada por AMP* e ao *alvo mamífero da via da rapamicina* (mTOR) (Thomson *et al.*, 2008), como discutiremos a seguir.

A via da *proteína quinase ativada por AMP* (AMPK) protege as células contra a depleção de adenosina trifosfato (ATP) (Moore *et al.*, 1991). A via do *alvo mamífero da via da rapamicina* (mTOR) altera o metabolismo hepático, como TOR1 ou TOR2 no complexo rapamicina, que codifica quinases lipídicas (Brown *et al.*, 1994). Além do mais a via mTOR tem sido considerada um possível alvo no tratamento do câncer (Hidalgo e Rowinsky, 2000).

A via AMPK é ativada pela demanda de energia, em casos de estresse celular ou energético, como um mecanismo primário para geração de energia e homeostase celular (Shin *et al.*, 2021). Em indivíduos saudáveis, a AMPK ajuda a gerar energia para o organismo desempenhar suas funções de forma equilibrada juntamente com outros mecanismos na eficiência mitocondrial, como as *sirtuínas* (SIRTs) no controle da resposta inflamatória, atuando como um antioxidante se a inflamação não for exagerada (Tang, 2016).

A via mTOR responde a substratos energéticos (carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos) ativando complexos mTOR (mTORC1 e mTORC2). Portanto, mTOR regula o metabolismo, proliferação, diferenciação, crescimento celular e síntese de proteínas no ribossomo (Park *et al.*, 2017). Deste modo, os eixos da via mTOR regulam a disponibilidade de nutrientes e o metabolismo através de

fatores de crescimento, e dependendo de diferentes mecanismos e genes (Deleyto-Seldas e Efeyan, 2021). Também, a via mTOR hepática controla a lipogênese, a proliferação, o crescimento celular e a síntese proteica (Park *et al.*, 2017). Em indivíduos saudáveis, a lipogênese e a lipólise ocorrem naturalmente, armazenando energia e ativando a lipogênese ou produzindo energia a partir da lipólise, que irá fornecer ácidos graxos livres (AGLs) para produzir energia por beta oxidação (Cheon e Cho, 2021).

O eixo mTORC1 desempenha um papel na lipogênese e através da autofagia, com diminuição na DHGNA. A ação da via mTOR depende de estímulos, como dietas hipercalóricas e alta produção de insulina (regulação que antecede a ativação do mTOR por meio da estimulação do eixo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) proteína quinase B) (Chen, 2020; Cheon e Cho, 2021).

A mTOR é um mecanismo ativo primário (Chen, 2020). A obesidade induzida por superalimentação causa um influxo exagerado de nutrientes para o fígado, ativando a mTORC1. Além disso, o mTORC1 inibe o processo de catabolismo e desencadeia o anabolismo, lipogênese e lipogênese *de novo* (LDN) de modo a armazenar o excesso de nutrientes (Reis-Barbosa *et al.*, 2022a). Contrariamente, no caso da beta-oxidação, predomina a via AMPK no processo de geração de energia (Inoki *et al.*, 2012). Além disso, devido ao seu papel na homeostase celular, a via da AMPK é essencial no combate ao dano hepático, mas essa via é reduzida quando existe inflamação, diabetes e obesidade (Smith *et al.*, 2016).

A oxintomodulina (OXM) é um peptídeo endógeno agonista duplo do receptor GLP-1 e do receptor do glucagon (GLP-1RA/GR), secretado pelas células L do intestino delgado em resposta à ingestão de nutrientes como um produto adicional do processamento diferencial do proglucagon intestinal (Field *et al.*, 2010). Como outras incretinas intestinais, a OXM regula o metabolismo da glicose e a secreção de insulina, reduz a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (Ma *et al.*, 2020). A secreção de OXM é estimulada por nutrientes, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas (Kuhre *et al.*, 2021).

No entanto, a utilidade clínica da OXM é limitada devido à sua menor potência *in vitro*, meia-vida curta (~10 min) e rápida depuração renal, dificultando seu uso no tratamento de longo prazo para a obesidade (Alexiadou e Tan, 2020; Yang *et al.*, 2020). Portanto, seria necessária a administração diária repetida de doses supra fisiológicas (três ou quatro vezes ao dia) de OXM para alcançar um efeito

farmacológico satisfatório em humanos. Por isso foram desenvolvidos análogos de OXM resistentes a dipeptidil peptidase IV (DPP4) com efeitos prolongados. A base foram substituições químicas de peptídeos evitando a digestão por protease e a eliminação por filtração glomerular rápida, melhorando a meia-vida circulatória da droga *in vivo* (Ding *et al.*, 2020; Lafferty *et al.*, 2021).

O glucagon é um candidato a participar do agonismo duplo, pois apresenta efeitos insulíntrópicos, reduz a ingestão alimentar por aumentar a saciedade, melhora o gasto energético e a oxidação de ácidos graxos, favorecendo a melhora da esteatose hepática (Alexiadou e Tan, 2020). Além disso, em roedores, o glucagon mostra efeitos benéficos na redução da lipogênese hepática, inflamação e fibrose, melhorando a função mitocondrial hepática (Nahra *et al.*, 2021). No fígado, o glucagon se liga ao seu receptor na membrana plasmática, ativando a adenilil ciclase via acoplamento estimulador da proteína G heterotrimérica. Além disso, receptor de glucagon (GR) induz cascatas de fosforilação desencadeadas por proteína quinase A dependente de cAMP, resultando em gliconeogênese e glicogenólise (Kaur *et al.*, 2020).

O gene do GR é expresso no fígado, rim, coração, baço, ovário e ilhotas pancreáticas. A expressão aumentada de receptores no fígado e nos rins torna esses órgãos os principais responsáveis pela depuração do glucagon, principalmente por endocitose e, em menor grau, por proteólise endovascular por DPP4 e degradação enzimática na membrana celular, levando a uma curta meia-vida do glucagon no plasma circulante (Baggio e Drucker, 2021).

Embora o agonismo do GR pareça incoerência como tratamento para DM2 devido ao seu efeito de aumentar a glicose hepática (Spezani e Mandarim-de-Lacerda, 2022), o glucagon pode suprimir o apetite devido ao retardo do esvaziamento gástrico e ao aumento do gasto energético, conseqüente ao catabolismo de aminoácidos e ureagênese e oxidação de ácidos graxos. Além disso, o GLP-1 melhora a hiperglicemia causada pelo glucagon (Parker *et al.*, 2020).

GLP-1 e glucagon são hormônios glicorreguladores com ações opostas na regulação da glicose plasmática. No entanto, ações complementares na regulação da ingestão alimentar e gasto energético sugerem que o duplo agonismo de GLP-1RA/GR poderia ter benefícios adicionais ao GLP-1RA, o que motivou o desenvolvimento de agonistas duplos estáveis, associando as altas potências de GLP-1RA e de GR (Chang *et al.*, 2020).

Existem desvantagens do GLP-1RA relacionadas a eventos adversos dose-dependentes, que podem limitar seu uso em altas doses (náuseas intensas e outros eventos adversos gastrointestinais). Assim, a implementação clínica de uma dose escalonada é necessária para limitar a gravidade desses efeitos (Garvey *et al.*, 2020). Por outro lado, a regulação positiva de GR pode aumentar a glicemia por gliconeogênese e glicogenólise, neutralizando o melhor controle da glicose dado pelo GLP-1RA (Eriksson *et al.*, 2020). Portanto, resíduos não conservados foram substituídos nos segmentos médio e C-terminal dos peptídeos gerando duplo agonismo GLP-1RA/GR de alta potência, melhorando a dinâmica conformacional do peptídeo para aumentar a eficiência na ativação de GLP-1RA em comparação com GR (Chang *et al.*, 2020).

O interesse é crescente em desenvolver terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais, com o desenvolvimento de agonistas duplos e triplos (Darbalaei *et al.*, 2020). Alguns desses já entraram em ensaios clínicos em humanos (Yang *et al.*, 2020), incluindo HM12525A (Hanmi Pharmaceuticals/Janssen, Wiryeseong-daero, Songpa-gu, Seul, Coréia do Sul), MEDI 0382 (AstraZeneca, Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Reino Unido) e SAR425899 (Sanofi, Thames Valley Park Drive, Reading, Berkshire, Reino Unido) (Spezani e Mandarim-de-Lacerda, 2022).

HM12525A (também chamado JNJ-64565111), um peptídeo sintético OXM modificado administrado por via subcutânea uma vez por semana (estudo multicêntrico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo de fase 2 de classe II). Pacientes com obesidade grau III e DM2 demonstraram redução significativa do peso corporal dependente da dose (Di Prospero *et al.*, 2021). No entanto, os eventos adversos, especialmente náuseas e vômitos, foram maiores no JNJ-64565111 do que no placebo e na liraglutida, possivelmente explicados pela falta de titulação do JNJ-64565111, levando à falta de descontinuação do medicamento do estudo de titulação (Alba *et al.*, 2021).

O SAR425899, um duplo agonismo GLP-1RA/GR administrado por via subcutânea uma vez ao dia, foi bem tolerado e apresentou perfis farmacocinéticos / farmacodinâmicos favoráveis. Além disso, o SAR425899 reduziu o peso corporal, glicemia de jejum e HbA1c após quatro semanas de tratamento em indivíduos com sobrepeso e obesos com DM2 (Tillner *et al.*, 2019). Um estudo recente randomizado de fase 2b em pacientes com sobrepeso/obesos com DM2 quantificou os efeitos do

SAR425899 no controle glicêmico em comparação com a liraglutida e indicou melhora no controle glicêmico pós-prandial, mediada por aumento da capacidade de resposta das células beta (Schiavon *et al.*, 2021). No entanto, o SAR425899 mostrou fortes interações do GLP-1R com órgãos-alvo, mas nenhuma interação específica no GR (Eriksson *et al.*, 2020).

A cotadutida (anteriormente referido como MEDI 0382) é um análogo da oxintomodulina (hormônio peptídico secretado pelas células L no intestino delgado) (Parker *et al.*, 2020). A cotadutida é um agonista duplo que ativa o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e os receptores de glucagon, levando à saciedade, diminuição do consumo de alimentos e perda de peso (Alexiadou e Tan, 2020; Spezani e Mandarin-de-Lacerda, 2022).

Cotadutida é um GLP-1RA/GR duplo agonista balanceado, administrado por via subcutânea uma vez ao dia, em desenvolvimento para várias indicações, incluindo obesidade, EHNA e doença renal crônica associada ao DM2 (Jepsen e Christensen, 2021; Nahra *et al.*, 2021). Além disso, a cotadutida tem um perfil de atividade *in vitro* da ordem de 5:1, GLP-1RA/GR (Asano *et al.*, 2021). A cotadutida melhora o controle glicêmico e promove perda de peso em pacientes com DM2 (Henderson *et al.*, 2016; Ambery *et al.*, 2018). Em estudo controlado randomizado de fase 2a, a cotadutida melhorou a glicemia de jejum e pós-prandial e reduziu o sobrepeso/obesidade de pacientes com DM2 (Ambery *et al.*, 2018).

A ativação do componente GR da cotadutida aumenta a função mitocondrial, estimulando o gasto energético e a oxidação de gordura, um mecanismo essencial na resolução da DHGNA e EHNA em camundongos (Boland *et al.*, 2020). A cotadutida também reduziu os níveis de HbA1c em pacientes com DM2 com sobrepeso / obesidade com EHNA (estudo randomizado de fase 2b) (Nahra *et al.*, 2021).

O tratamento da obesidade e por consequência da DHGNA com análogos de GLP-1 é indicado na prática médica e experimental (Newsome *et al.*, 2021; Pontes-da-Silva *et al.*, 2022), incluindo a cotadutida (Boland *et al.*, 2020). No presente estudo vamos enfatizar a participação dos mecanismos relacionados a via AMPK/mTOR e ao estresse do RE no fígado de camundongos DIO.

Temos a hipótese que os benefícios do uso da cotadutida está associada a melhora nos parâmetros da obesidade e esteatose hepática a partir dos mecanismos impostos pela melhora da via da AMPK/mTOR, pois na obesidade com DHGNA há aumento da expressão de mTORC1 e diminuição da AMPK. Paralelamente,

analisamos o estresse do RE porque está associado à função mitocondrial no fígado e, com isso, está associada ao desequilíbrio entre os ácidos graxos hepáticos da dieta, a lipólise do tecido adiposo e a LDN em contraste com a beta-oxidação dos ácidos graxos hepáticos (Shojaei-Zarghani *et al.*, 2022). Com isso, a diminuição do estresse do RE dos hepatócitos pode ser um indicador do êxito do tratamento com cotadutida quando há obesidade e DHGNA. Sendo assim a cotadutida tem potencial para reduzir ou mesmo recuperar os efeitos da obesidade no fígado e para constatar que tais efeitos eram da cotadutida, utilizou-se camundongos obesos alimentados de modo pareado com animais obesos tratados com cotadutida.

1. OBJETIVOS

1.1. Geral:

Avaliar nos animais alimentados com dieta hiperlipídica os efeitos da cotadutida sobre os parâmetros metabólicos e estruturais do fígado através das vias AMPK, mTOR e reticulo endoplasmático

1.2. Específicos:

- a) Avaliar a evolução da massa corporal e ingestão alimentar;
- b) Analisar o metabolismo de carboidratos (glicose e insulina);
- c) Avaliar as adipocinas (adiponectina e leptina);
- d) Analisar o colesterol hepático e plasmático, triacilglicerol hepático e plasmático, e as enzimas hepáticas (ALT e AST);
- e) Analisar no fígado o remodelamento e dano hepático, via da AMPK, via da mTOR e estresse do reticulo endoplasmático através de técnicas moleculares RT-qPCR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais, dieta e tratamento

O estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas no guia convencional para experimentação animal (Publicação NHI nº 85-23, revisada em 1996). Como resultado, o Comitê de Ética aprovou o protocolo experimental para Cuidados e Uso de Animais Experimentais (CEUA) (Universidade do Estado do Rio de Janeiro, protocolo CEUA N° 002/2021).

Quarenta camundongos machos C57BL/6 com 12 semanas de idade foram mantidos em ambiente controlado ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade $60\pm 10\%$, ciclo claro/escuro 12/12h), com livre acesso a água e comida. Os animais, aos 3 meses, foram separados aleatoriamente em dois grupos de dieta ($n=20/\text{grupo}$) e alimentados por dez semanas: dieta controle (C, 10% de energia de lipídios, 14% de proteína e 76% de carboidrato) e grupo dieta hiperlipídica (“high-fat” ou HF, 50% da energia de lipídios, 14% de proteína e 36% de carboidratos). As dietas foram fabricadas pela Pragsoluções (Jau, SP, Brasil) com base nas recomendações AIN-93 para roedores em fase de manutenção ou adultos (Reeves *et al.*, 1993). Após as 10 semanas, os animais foram separados em quatro novos grupos ($n=10/\text{grupo}$) e tratados com cotadutida por mais quatro semanas. Como resultado, os novos grupos foram C (dieta controle), CC (dieta controle + cotadutida), HF (dieta hiperlipídica) e HFC (dieta HF + cotadutida).

A cotadutida (dose de 30 nm/kg), foi administrado por via subcutânea, uma vez ao dia (às 14h), diluído em propilenoglicol, tampão fosfato e tween 80 em pH 7,2. Os demais grupos receberam o veículo (propilenoglicol, tampão fosfato e tween 80 em pH 7,2).

Neste estudo, seguimos protocolos em que camundongos foram tratados com cotadutida nas doses de 10 nM/kg e 30 nM/kg, ambas bem toleradas pelos animais (Henderson *et al.*, 2016; Boland *et al.*, 2020). Portanto, camundongos DIO tratados com 10 nM/kg e 30 nM/kg de cotadutida por 30 dias produziram resultados semelhantes em um teste de tolerância à glicose (Henderson *et al.*, 2016), mas o peso corporal diminuiu em 21% e 30%, respectivamente. Assim, optamos pela dose de 30

nM/kg e pelo período de tratamento de 30 dias para otimizar as respostas dos marcadores metabólicos à cotadutida.

2.2. Peso corporal, ingestão alimentar e consumo de energia

O peso corporal (PC) foi avaliado semanalmente (terça-feira, às 9h). Além disso, a ingestão alimentar diária (IA) e a ingestão energética (IE) foram determinados da seguinte forma: IA foi a diferença entre o alimento oferecido e o que permaneceu nas gaiolas a cada 24h; IE foi o produto da ingestão alimentar pela energia da dieta.

Tabela 1 – Composição das dietas.

Ingredientes (g/kg)	AIN93M	
	C	HF
Antioxidante	0.008	0.060
Caseína (85% proteína)	140	175
Colina	2.5	2.5
Amido de milho	619.70	347.69
Cisteína	1.8	1.8
Fibra	50	50
Banha de porco	-	238
Mix de Minerais	35	35
Mix de Vitaminas	10	10
Óleo de soja	40	40
Sacarose	100	100
Energia (kJ/kg)	15,960	20,950
Carboidratos (%)	76	36
Lipídeos (%)	10	50
Proteína (%)	14	14

Legenda: Controle (C) e hiperlipídica (high-fat, HF), segundo a AIN-93.
 Fonte: Adaptado de *Aguila et al* 2003.

2.3. Sacrifício

Após as 4 semanas de tratamento, os animais com seis horas de jejum foram profundamente anestesiados (cetamina intraperitoneal 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg). Em seguida, o sangue foi coletado (corte dos vasos cervicais), centrifugado à temperatura ambiente (712 xg, por 15 min), e o plasma foi armazenado para análise. Finalmente, o fígado foi cuidadosamente dissecado, pesado e vários fragmentos de todos os lobos foram fixados em fixador recém-preparado (formaldeído a 4% p/v, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) ou congelado a -80°C para análises moleculares.

2.3.1. Plasma:

Medimos as concentrações plasmáticas de glicose, triacilglicerol (TAG), colesterol total (CT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (espectrofotômetro semiautomático e kits comerciais, Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). Além disso, as concentrações de adiponectina, leptina e insulina foram medidas em duplicata usando kits de imunoenensaio enzimático (Millipore, Merck, Temecula, CA, EUA) com Microplate Reader: Accuris SmartReader UV-Vis (modelo MR9610, New Jersey, EUA): adiponectina (Cat. # EZMADP-60K), leptina (Cat # EZML-82K) e insulina (Cat # EZRMI-13K, Millipore). FIRi foi calculado para determinar a resistência à insulina (glicose * insulina/25) (Pang et al., 2016). Em seguida, o QUICKi foi avaliado para avaliar a sensibilidade à insulina ($1/\log(I0) + \log(G0)$), onde I0 é a insulina em jejum ($\mu\text{U/ml}$) e G0 é a glicemia em jejum (mg/dL) (Katz et al., 2000).

2.3.2. Fígado:

Os fragmentos de fígado fixados foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Mo, EUA), os blocos foram seccionados com 5 μm de espessura e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Além disso, TAG e CT foram medidos em fragmentos congelados (processador ultrassônico e 1 ml de isopropanol em 50 mg de tecido). O homogenato foi centrifugado a 712 xg por 15 min, e 5 μl do sobrenadante foi analisado (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Pelo menos 50 campos microscópicos aleatórios de cortes não consecutivos foram analisados sob um microscópio de luz BX51 e câmera digital DP71 (Olympus Co., Tóquio, Japão). A densidade de volume da esteatose hepática (Vv [esteatose, fígado], a razão entre os pontos que atingem as gotas de gordura, PP [esteatose, fígado] e o total de pontos do sistema (PT)) foi determinada por contagem de pontos conforme descrito (Catta-Preta et al., 2011; Mandarim-de-Lacerda e Del-Sol, 2017). Para a imunofluorescência, a recuperação do antígeno utilizou tampão citrato pH 6,0 por 20 min, bloqueando com cloreto de amônio 2% e glicina. A ligação de anticorpos policlonais inespecíficos foi bloqueada por incubação em PBS e as seções foram incubadas com anticorpo primário PLIN 2 (anti-PLIN 2, Perilipin, CSB-PA920084 - Cusabio, College Park, MD,

EUA). Um anticorpo secundário foi conjugado com o fluoróforo Alexa e as lâminas foram montadas com desvanecimento lento (Invitrogen, CA, EUA). O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário. As imagens digitais foram obtidas com a Microscopia Confocal de Varredura a Laser da Nikon (Modelo C2; Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

2.3.3. Expressão gênica:

As amostras de fígado (30 mg) foram transferidas para microtubos autoclavados contendo solução de lise (Trizol, Invitrogen, CA, EUA). Primeiro, o mRNA foi transferido, isolado e quantificado com Nanovue (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Em seguida, oligo primers para mRNA e transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) foram aplicados ao cDNA de síntese da primeira fita. Primeiramente, foi realizada a expressão do gene TATA-box binding protein (Tbp) e utilizado como gene de referência para padronização do mRNA. Em seguida, foram realizados controles negativos em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. Em seguida, a qPCR foi avaliada com o ciclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Além disso, a amplificação do sinal foi medida usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para estimar a diferença entre os ciclos do gene alvo e o controle endógeno (Rao *et al.*, 2013). As sequências de primers foram projetadas pelo software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

2.4. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk para uma amostra pequena) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e, quando aprovados, apresentados como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância de dois fatores (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey (GraphPad Prism v. 9.4.1 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Aceitamos o nível de significância de $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Tabela 2 - Primers utilizados no RT-qPCR e suas sequências.

Gene	FW (5' a 3')	RV (3' a 5')
<i>Acaca</i>	CTGAACCGGAAATCTGAGCG	CCATCACCACAGCCTTCATG
<i>Acacb</i>	GTATACGGTGGAGGACGGAG	CGCTTGATGTACTTCACCCG
<i>Akt</i>	GCTGCTCAAGAAGGACCCT	CATACACATCCTGCCACACG
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Chopp</i>	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Chrebp1</i>	CACTGAGTGTCCACCTGTCT	ACGTCGGTTCTCCATCTTGT
<i>Eef2</i>	GTGTTGACGCCATCATGAA	TCCTTGTCTTTGTCTCGCT
<i>Eif4ebp1</i>	TCTGATGGAGTGTCCGAACT	CTAGTGACCCAGGAATGGC
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTGTCACCAGCACACAGT
<i>IR</i>	CAGGAATGGCTTGTTTGGTCTTA	TGCAGTGCTATGGCACATTTGA
<i>Mtorc1</i>	CTCTTTGGCCTGGTGAACAC	AGTTGGTGGACAGAGGGATG
<i>Mtorc2</i>	ACAGCCAAGTCCTTCAGCAT	CACAAACCTGTGCAACTGCT
<i>Nr1h3</i>	TAGAGAGGCTGCAACACACA	TGAATGGACGCTGCTCAAAG
<i>Nr1h4</i>	AGCTTCCAGGTTTCAGACA	CGAACGAAGAAACATGGCCT
<i>Pik3c2a</i>	ATGGGACCAGTAGTTTGCCA	GCCTGGATTTGTGCAGTGAT
<i>Prkag2</i>	TTCACCCAGACACTCCCATC	CTCATCCACCACAGGCAATG
<i>Rps6kb1</i>	TGGATTGGTGGAGTTTGGGA	TCGAGCTTCTTGTGTGAGGT
<i>Sirt1</i>	TCCACGGTGTGAGGTATAC	GCCACTGTCACTGTTACTGC
<i>Srebf1</i>	GCAGTGGTGGTAGTACTCT	TCAGACACAGAAAGGCCAGT
<i>Tbp</i>	CAAACCTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCAGAGC
<i>Tsc2</i>	ATGGTGTACTGCCTGGAACA	TGGCAGAAATGTGTGTGAGC
<i>Ulk3</i>	GCCTCCAGATCGTTCTCAGA	GCTCTAGAAGTCGCTGCAAC

Legenda: *Acaca*, Acetil-coa carboxilase alfa; *Acacb*, Acetil-coa carboxilase beta; *Akt*, Proteína quinase B; *Atf4*, Fator de ativação da transcrição 4; *Chop*, Proteína homóloga C/EBP; *Chrebp1*, Proteína de ligação a elemento responsivo a carboidratos; *Eef2*, Fator de alongamento da tradução eucariótica 2; *Eif4ebp1*, Proteína de ligação ao fator 4E de iniciação da tradução eucariótica 1; *Gadd45*, Proteína de parada do crescimento e induzível a danos no DNA; *IR*, Receptor de insulina; *Mtorc*, Alvo mecanicista do complexo de rapamicina; *Nr1h3*, Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 3; *Nr1h4*, Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 4; *Pik3c2a*, Fosfatidilinositol-4- subunidade catalítica de fosfato 3-quinase tipo 2 alfa; *Prkag2*, Subunidade gama-2 da proteína quinase ativada por AMP; *Rps6kb1*, Proteína quinase S6 ribossomal; *Sirt1*, Sirtuina 1; *Srebf1*, Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; *TBP*, Proteína de ligação a TATA; *Tsc2*, Complexo de esclerose tuberosa 2; *Ulk3*, Quinase 3 ativadora de autofagia semelhante a Unc-51.

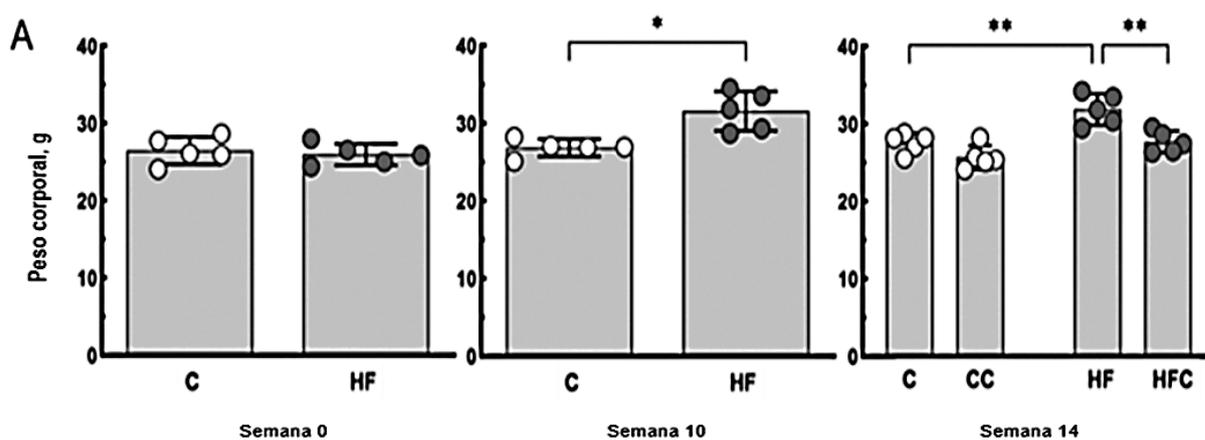
Fonte: O autor, 2022.

3. RESULTADOS

3.1. A cotadutida reduziu o peso corporal (PC), sem alterações na ingestão alimentar (IA) e ingestão energética (IE), e auxiliou no controle da intolerância à glicose e resistência à insulina e aumento da sensibilidade à insulina em camundongos DIO

O PC não mostrou diferença entre os grupos C e HF no início do estudo. No entanto, o peso corporal aumentou +18% na semana 10 e aumentou +16% na semana 14 no grupo HF em comparação ao grupo C. Por outro lado, após quatro semanas de tratamento, o peso corporal foi reduzido em -13% no grupo HFC em comparação com o grupo HF na semana 14.

Figura 1. Peso corporal



Nota: (média ± DP). Grupos: C, controle; CC, controle+cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica+cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Fonte: O autor

Na semana 10, observou-se diminuição da IA no grupo HF em relação ao grupo C, o que se explica pelo maior teor energético da dieta HF. Na semana 14, IA

permaneceu menor no grupo HF do que no grupo C, mas com IE maior. Cotadutida não alterou este achado (Tabela 3).

A glicemia, feita pelo teste oral de tolerância a glicose aumentou em +30% na semana 10 e aumentou +16% na semana 14 no grupo HF versus C e diminuiu -15% no HFC versus HF. No entanto, após o tratamento com cotadutida, HFC foi maior em +11% quando comparado ao grupo CC. Além disso, a intolerância à glicose foi observada na semana 10, e foi maior no grupo HF do que no grupo C. Por outro lado, a cotadutida diminuiu a intolerância à glicose na semana 14. Como resultado, o FIRi foi maior no grupo HF do que no grupo C, mas a cotadutida reduziu o FIRi no grupo HFC do que no grupo HF. Além disso, o QUICKi diminuiu no grupo HF em comparação com o grupo C, e a cotadutida melhorou o QUICKi no grupo HFC do que no grupo HF (Tabela 3).

3.2. A cotadutida mostrou efeitos benéficos nos marcadores plasmáticos em camundongos DIO (TAG e CT, enzimas hepáticas, leptina, adiponectina)

As enzimas hepáticas e TAG estavam aumentadas no grupo HF em comparação ao grupo C, mas reduzidas no grupo HFC em comparação com o grupo HF. Além disso, o grupo HF apresentou hiperleptinemia e hipoadiponectinemia em relação ao grupo C. No entanto, o tratamento com cotadutida melhorou os parâmetros da leptina e adiponectina no grupo HFC em comparação com o grupo HF (Tabela 3).

Tabela 3 - Biometria e bioquímica.

Dados	C	CC	HF	HFC
Plasma, n=5/group				
Adiponectina, 10 ⁶ pg/mL	13.88±1.86	12.50±0.72	8.35±0.97†	10.16±0.47‡
Leptina, 10 ² pg/mL	38.52±10.60	22.55±8.62	115.79±7.63†	54.98±16.19‡
Glicose de jejum, mmol/L	6.93±0.43	6.85±0.71	8.51±0.73†	7.29±0.33‡
Insulina, pMol/L	12.50±1.59	13.02±1.16	26.63±2.53†	17.05±2.67‡
FIRi, n=5	3.41±0.64	3.57±0.21	9.01±1.34†	4.92±0.75‡
QUICKi, n=5	0.52±0.02	0.51±0.01	0.43±0.01†	0.48±0.02‡
CT, mg/dL	46.94±6.71	50.42±5.95	56.20±3.94	48.00±5.69
TAG, mg/dL	282.17±20.61	286.23±14.99	313.00±11.9†	285.47±14.52
ALT, U/L	15.75±1.89	15.00±1.22	23.40±1.14†	18.00±1.00‡
AST, U/L	43.81±8.29	56.60±10.01	65.23±7.66†	49.00±4.74‡
Fígado, n=5/group				
CT, mg/dL/g	52.82±1.26	51.30±0.83	57.50±1.50†	50.56±1.99‡
TAG, mg/dL/g	68.89±7.5	66.60±8.34	82.72±9.51†	61.50±3.10‡

Legendas: ALT, Alanina aminotransferase; AST, Aspartato aminotransferase; C, controle; CC, controle e cotadutida; FIRi, Índice de resistência à insulina em jejum; HF, high-fat; HFC, high-fat e cotadutida; IA, Ingestão alimentar; IE, Ingestão energética; QUICKi, Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina; TAG, Triacilglicerol; CT, Colesterol total.

Nota: Os dados são média ± DP. Valor de p<0,05, quando †≠C, ‡≠HF.

Fonte: O autor, 2023.

3.3. Peso do fígado (PF), esteatose e marcadores hepáticos são atenuados pela cotadutida

A Figura 2 ilustra os achados da organização estrutural do fígado, principalmente quanto ao teor de gordura (esteatose). O grupo HF foi o que apresentou macro e micro gotículas de gordura disseminadas no tecido hepático, e a cotadutida atenuou a esteatose no grupo HFC em comparação com o grupo HF. Isso concorda com a estimativa da esteatose relatada aqui.

A imunofluorescência de PLIN2 foi apresentada para reforçar esses achados, sabendo-se que PLIN2 é a única proteína de gotícula lipídica constitutiva e ubiquamente expressa usada como marcador proteico para gotículas lipídicas. Além disso, PLIN2 foi altamente expresso no grupo HF, e a cotadutida reduziu significativamente a expressão de PLIN2 no grupo HFC (Figura 2).

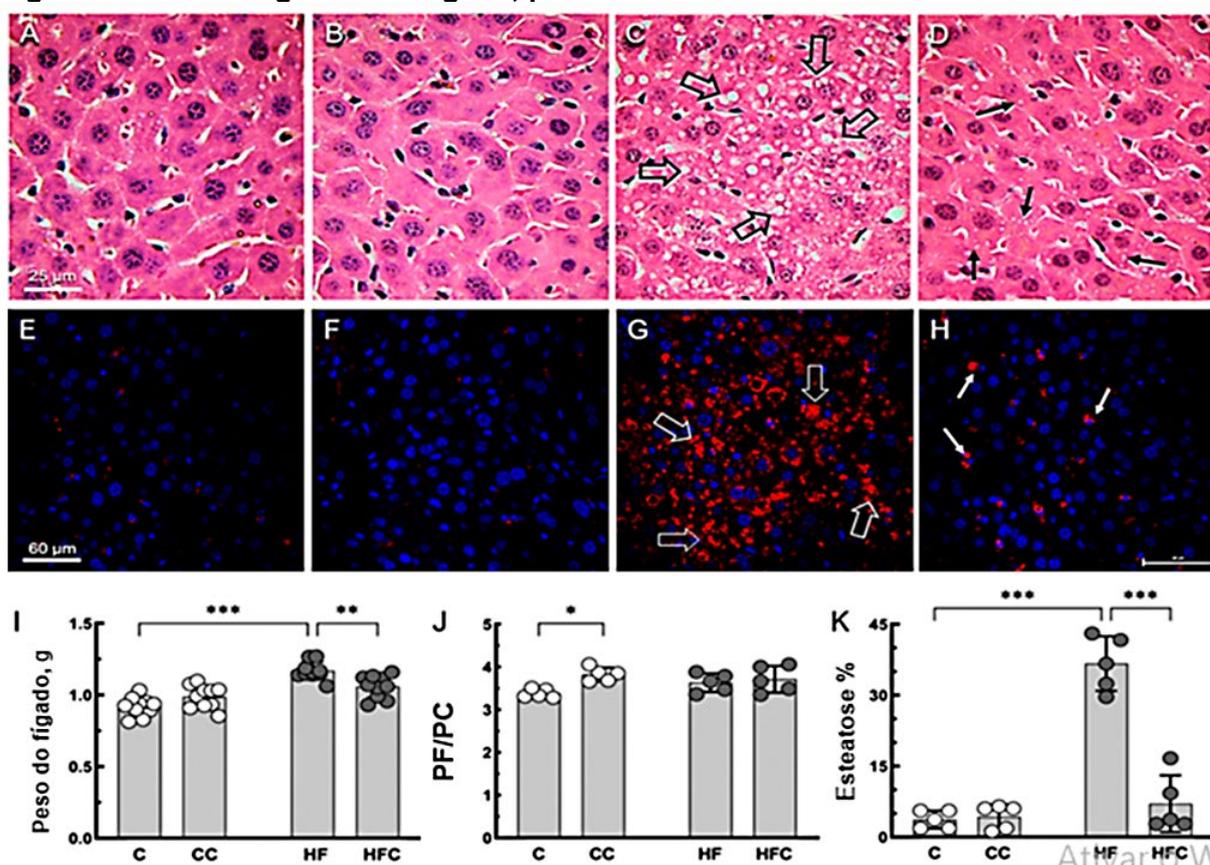
Na semana 14, o peso do fígado foi maior no grupo HF do que no grupo C. Com isso, a cotadutida foi capaz de reduzir o PF no grupo HFC vs. HF. No entanto, a

relação PF/PC não se alterou nos grupos alimentados com a dieta HF, mesmo tratados com cotadutida. Ainda assim, houve redução da relação PF/PC no grupo controle (Figura 2).

Finalmente, a avaliação da esteatose hepática na semana 14 mostrou que o grupo HF teve um aumento significativo na esteatose, e a cotadutida reduziu eficientemente a esteatose no grupo HFC em comparação com o grupo HF (Figura 2).

TAG e CT estavam aumentados no fígado dos animais do grupo HF, mas foram reduzidos pelo tratamento com cotadutida no grupo HFC (Tabela 3).

Figura 2. Fotomicrografias do fígado, peso e esteatose



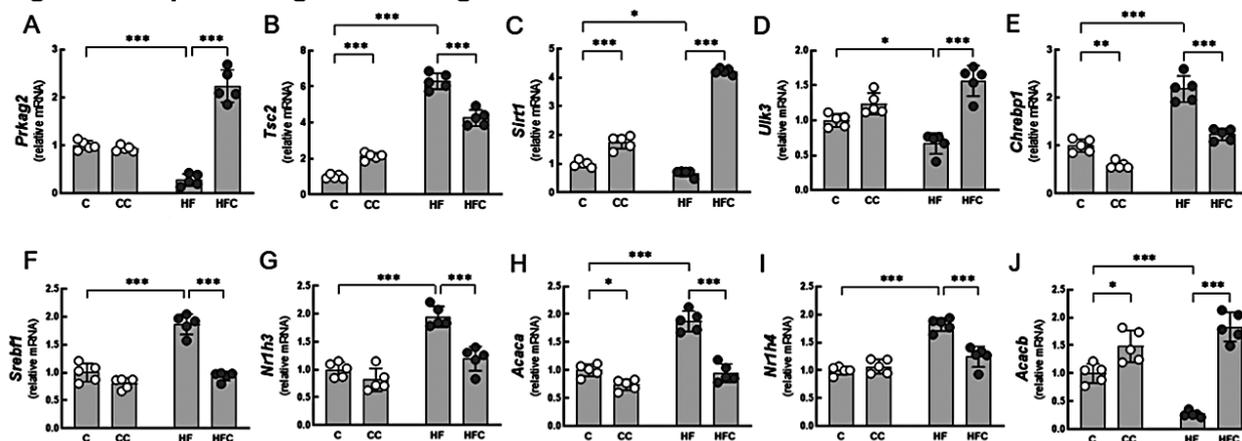
Legenda: Na primeira linha (mesma ampliação), os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Na segunda linha (mesma ampliação), observamos a imunofluorescência de PLIN2 em microscopia confocal (azul: núcleos celulares, DAPI; vermelho: PLIN2, Alexa 546). **A e E** – Grupo controle; **B e F** – Grupo controle+cotadutida; **C e G** – Grupo hiperlipídica; **D e H** – Grupo hiperlipídica+cotadutida. Gotículas lipídicas (esteatose) estão indicadas (setas pretas abertas em C e setas pretas em D). Além disso, a expressão de PLIN2 está marcada (setas brancas abertas em G e setas brancas em H); I - Peso do fígado; J - Relação peso do fígado (PF)/peso corporal (PC); K – Quantificação da esteatose hepática Nota: (média ± DP). Grupos: C, controle; CC, controle+cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica+cotadutida; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: O autor, 2022.

3.4. Os efeitos hepáticos da cotadutida na via da AMPK em camundongos DIO

A via AMPK foi estudada no fígado. Os marcadores foram afetados negativamente no grupo HF em comparação com o grupo C, mas recuperados no grupo HFC em comparação com o grupo HF, como a subunidade gama-2 da proteína quinase ativada por AMP (Prkag2), complexo de esclerose tuberosa 2 (Tsc2), sirtuína 1 (Sirt1), quinase 3 semelhante a Unc-51 (Ulk3), proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos (Chrebp1), Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (Srebf1), subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 3 (Nr1h3), acetil-coa carboxilase alfa (Acaca), subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 4 (Nr1h4) e acetil-coa carboxilase beta (Acacb).

Figura 3. Expressão gênica no fígado da via AMPK



Legenda: A - Subunidade gama-2 da proteína quinase ativada por AMP; B - Complexo de esclerose tuberosa 2; C - Sirtuína 1; D - Quinase 3 ativadora de autofagia semelhante a Unc-51; E - Proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos; F - Reguladora de esterol proteína de ligação de elemento 1; G - Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 3; H - Acetil-coa carboxilase alfa; I - Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 4; J - Acetil-coa carboxilase beta

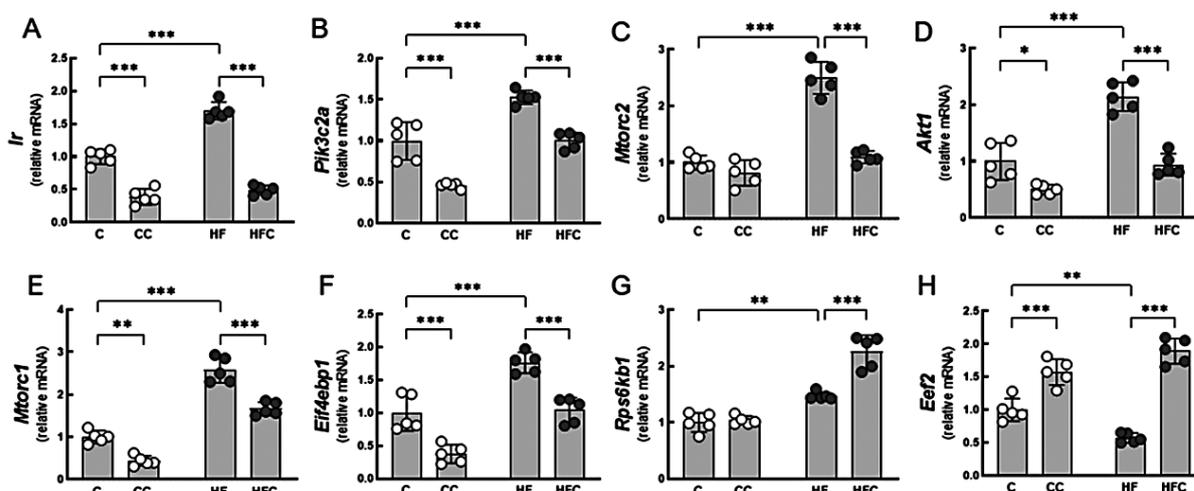
Nota: (média \pm DP). Grupos: C, controle; CC, controle+cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica+cotadutida; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: O autor, 2022.

3.5. A cotadutida melhorou a expressão hepática da via mTOR e amenizou a DHGNA em camundongos DIO

A Figura 4 ilustra que os marcadores da via mTOR foram afetados negativamente no fígado dos animais do grupo HF em comparação com os animais do grupo C, mas recuperados no grupo HFC em comparação com o grupo HF, como receptor de insulina (Ir), fosfatidilinositol-4- subunidade catalítica de fosfato 3-quinase tipo 2 alfa (Pik3c2a), via do alvo mamífero da via da rapamicina complexo 2 (Mtorc2), proteína quinase B (Akt1), alvo mamífero da via da rapamicina complexo 1 (Mtorc1), proteína de ligação ao fator 4E de iniciação da tradução eucariótica 1 (Eif4ebp1), proteína quinase S6 ribossomal (Rps6kb1) e fator de alongamento da tradução eucariótica 2 (Eef2).

Figura 4. Expressão gênica no fígado da via mTOR



Legenda: **A** - Receptor de insulina; **B** - Fosfatidilinositol-4- subunidade catalítica de fosfato 3-quinase tipo 2 alfa; **C** - Alvo mecânico do complexo de rapamicina quinase 2; **D** - Proteína quinase B; **E** - Alvo mecânico do complexo de rapamicina quinase 1; **F** - Proteína de ligação ao fator 4E de iniciação da tradução eucariótica 1; **G** - Proteína quinase S6 ribossomal; **H** - Fator de alongamento da tradução eucariótica 2

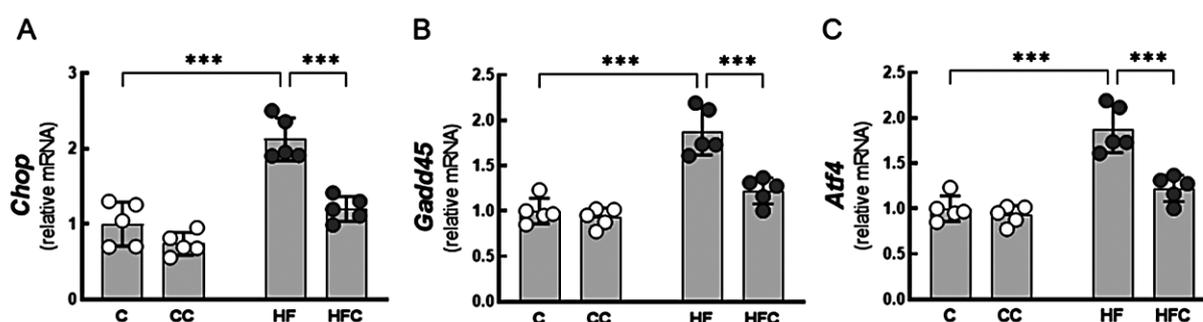
Nota:(média \pm DP). Grupos: C, controle; CC, controle+cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica+cotadutida; * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

Fonte: O autor, 2022.

3.6. A cotadutida reduziu o estresse do retículo endoplasmático (RE)

Os marcadores de estresse RE foram aumentados no grupo HF em comparação ao grupo C e reduzidos no grupo HFC em comparação com o grupo HF, como a proteína homóloga C/EBP (Chop), proteína de parada de crescimento e danos ao DNA (Gadd45) e fator-4 ativador da transcrição (Atf4).

Figura 5. Expressão gênica no fígado de genes do estresse do retículo endoplasmático



Legenda: A - Proteína homóloga C/EBP; B - Proteína de parada de crescimento e danos ao DNA; C - Fator de ativação da transcrição 4

Nota: (média \pm DP). Grupos: C, controle; CC, controle+cotadutida; HF, hiperlipídica; HFC, hiperlipídica+cotadutida; *** $P < 0,001$.

Fonte: O autor, 2022.

3.7. Análise de variância de dois fatores (ANOVA)

O efeito da dieta, do tratamento com cotadutida e interações entre dieta e cotadutida foram estudados considerando 17 expressões gênicas relacionadas à bioquímica e fígado, e 21 expressões gênicas na via AMPK/mTOR/RE.

A dieta afetou 14 genes na bioquímica e no fígado (82%), e a cotadutida afetou 11 genes (65%). Além disso, houve interação entre dieta e cotadutida em 13 genes (76%). A dieta afetou 18 genes na via AMPK/mTOR/RE (86%), e a cotadutida afetou 100% dos genes. Além disso, houve interação entre dieta e cotadutida em 18 genes (86%).

Tabela 4 - Análise de variância de dois fatores

Dados	% de variação e teste de significância					
	Efeito da dieta		Efeito da cotadutida		Dieta vs. cotadutida	
	%	Valor de P	%	Valor de P	%	Valor de P
Bioquímica e fígado						
Adiponectina	70,42	<0,001	0,41	ns	12,45	0,003
ALT	55,97	<0,001	22,29	<0,001	9,75	0,002
AST	10,33	ns	0,63	ns	45,62	<0,001
Colesterol	10,80	0,008	49,79	<0,001	20,44	<0,001
FIRi	53,22	<0,001	17,00	<0,001	19,89	<0,001
Glicose de jejum	35,99	0,001	11,56	0,04	14,95	0,02
Ingestão alimentar	42,33	<0,001	0,95	ns	1,87	ns
Ingestão energética	65,00	<0,001	0,61	ns	1,03	ns
Insulina	57,90	<0,001	14,37	<0,001	17,95	<0,001
Leptina	55,81	<0,001	27,34	<0,001	9,33	<0,001
Massa do fígado	55,96	<0,001	4,67	0,03	25,39	<0,001
Peso corporal	35,23	<0,001	32,13	<0,001	4,82	ns
QUICKi	63,43	<0,001	7,99	0,008	14,85	<0,001
TAG fígado	4,46	ns	32,32	0,003	20,96	0,01
TAG plasmático	15,98	0,05	9,74	ns	17,64	0,04
Esteatose, %	38,77	<0,001	25,64	<0,001	27,84	<0,001
PCR						
Acaca	35,78	<0,001	42,90	<0,001	13,44	<0,001
Acacb	2,42	ns	69,00	<0,001	19,05	<0,001
Akt	37,92	<0,001	43,90	<0,001	7,59	0,004
Atf4	52,46	<0,001	20,07	<0,001	12,91	0,002
Chop	49,93	<0,001	27,81	<0,001	8,64	0,006
Chrebp1	56,97	<0,001	31,69	<0,001	5,11	0,002
Eef2	0,26	ns	79,60	<0,001	12,29	<0,001
Eif4ebp1	46,57	<0,001	41,78	<0,001	0,22	ns
Gadd45	52,46	<0,001	20,07	<0,001	12,91	0,002
Ir	14,34	<0,001	74,12	<0,001	8,02	<0,001
Mtorc1	73,93	<0,001	20,46	<0,001	1,15	ns
Mtorc2	41,15	<0,001	32,92	<0,001	19,32	<0,001
Nr1h3	51,61	<0,001	25,66	<0,001	9,46	0,004
Nr1h4	52,66	<0,001	13,42	<0,001	22,14	<0,001
Pik3c2a	45,68	<0,001	45,31	<0,001	0,01	ns
Prkag2	3,95	0,003	42,19	<0,001	48,50	<0,001
Rps6kb1	63,72	<0,001	14,99	<0,001	12,52	<0,001
Sirt1	14,80	<0,001	59,27	<0,001	25,02	<0,001
Srebf1	32,84	<0,001	41,45	<0,001	17,74	<0,001
Tsc2	81,76	<0,001	1,21	0,008	14,90	<0,001
Ulk3	3,12	ns	62,76	<0,001	21,22	<0,001

Legenda: *Acaca*, Acetil-coa carboxilase alfa; *Acacb*, Acetil-coa carboxilase beta; ALT, Alanina aminotransferase; *Akt*, Proteína quinase B; AST, Aspartato aminotransferase; *Atf4*, Fator de ativação da transcrição 4; *Chop*, Proteína homóloga C/EBP; *Chrebp1*, Proteína de ligação a elemento responsivo a carboidratos; *Eef2*, Fator de alongamento da tradução eucariótica 2; *Eif4ebp1*, Proteína de ligação ao fator 4E de iniciação da tradução eucariótica 1; FIRi, Índice de resistência à insulina em jejum; *Gadd45*, Proteína de parada do crescimento e induzível a danos no DNA; IA, Ingestão alimentar; IE, Ingestão energética; *IR*, Receptor de insulina; *Mtorc*, Alvo mecanicista do complexo de rapamicina; *Nr1h3*, Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 3; *Nr1h4*, Subfamília de receptores nucleares 1 grupo H membro 4; ns, não significativo; PC, Peso corporal; PF, Peso do fígado; *Pik3c2a*, Fosfatidilinositol-4- subunidade catalítica de fosfato 3-quinase tipo 2 alfa; *Prkag2*, Subunidade gama-2 da proteína quinase ativada por AMP; QUICKi, Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina; *Rps6kb1*, Proteína quinase S6 ribossomal; *Sirt1*, Sirtuina 1; *Srebf1*, Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; TAG, Triacilglicerol; TC, Colesterol total; *Tsc2*, Complexo de esclerose tuberosa 2; *Ulk3*, Quinase 3 ativadora de autofagia semelhante a Unc-51.

Fonte: O Autor, 2022.

4. DISCUSSÃO

Sabemos que a indução de obesidade com dieta hiperlipídica causa diversos danos ao organismo, como inflamação (Fraulob *et al.*, 2010), desregulação hormonal, principalmente da leptina e adiponectina, hormônios responsáveis pelo controle da saciedade e gasto energético (Marinho *et al.*, 2022). Nesse modelo, o tratamento com cotadutida levou a diminuição do peso corporal em camundongos DIO, além de melhorar o metabolismo da glicose e a resistência à insulina, e maior regulação hormonal, como descrito anteriormente (Henderson *et al.*, 2016).

Terapias com agonistas duplos com doses mais baixas e efeitos sinérgicos e simultâneos em mais de um receptor podem minimizar os efeitos adversos. Atualmente, os compostos em desenvolvimento utilizando o eixo das incretinas são os que melhor mostram vantagem. Além disso, a secreção de insulina induzida por incretinas é indireta e dependente de glicose, evitando assim a hipoglicemia (Perreault *et al.*, 2021).

GLP-1RA combinado com outros hormônios intestinais que podem ter benefícios complementares foram propostos em várias combinações (agonistas de receptores duplos ou triplos, GLP-1/GIP, GLP-1/GR e GLP-1/GR/GIP). Isso melhora ainda mais o tratamento da obesidade e DM2. Além disso, esses hormônios estão associados ao chamado efeito incretinas, que ocorre quando a glicose via oral aumenta a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, mais do que a administração intravenosa de glicose (Kakouri *et al.*, 2021).

A cotadutida foi avaliada quanto à segurança, eficácia, farmacocinética e imunogenicidade em indivíduos com sobrepeso ou obesidade. Em diferentes doses, a cotadutida demonstrou um perfil semelhante a estudos clínicos globais anteriores para tratar distúrbios metabólicos, melhorar a tolerância à glicose sem risco de hipoglicemia, diminuir a resistência à insulina e aumentar a secreção de insulina (Asano *et al.*, 2021).

No presente estudo a cotadutida aparentemente não influenciou a ingestão alimentar e energética dos animais, porém, foi observada a perda de peso nos animais tratados. Para entender isso, acreditamos em aumento do gasto energético, possivelmente pela ação do glucagon, que foi mencionado previamente (Henderson *et al.*, 2016; Boland *et al.*, 2020), pois a cotadutida combina o agonismo nos receptores GLP-1 na redução da glicemia e do apetite (Eriksson *et al.*, 2020) e os efeitos

insulinoatrópicos da ativação do receptor de glucagon (Alexiadou e Tan, 2020). A cotadutida também foi associada a efeitos benéficos na inflamação e reguladores lipogênicos em conjunto com esteatose hepática reduzida (Boland *et al.*, 2020). Os resultados apresentados aqui são relevantes e originais, demonstrando efeitos benéficos em alvos envolvidos nas vias AMPK e mTOR, lipogênese, beta-oxidação e adipocinas, nos animais tratados com cotadutida.

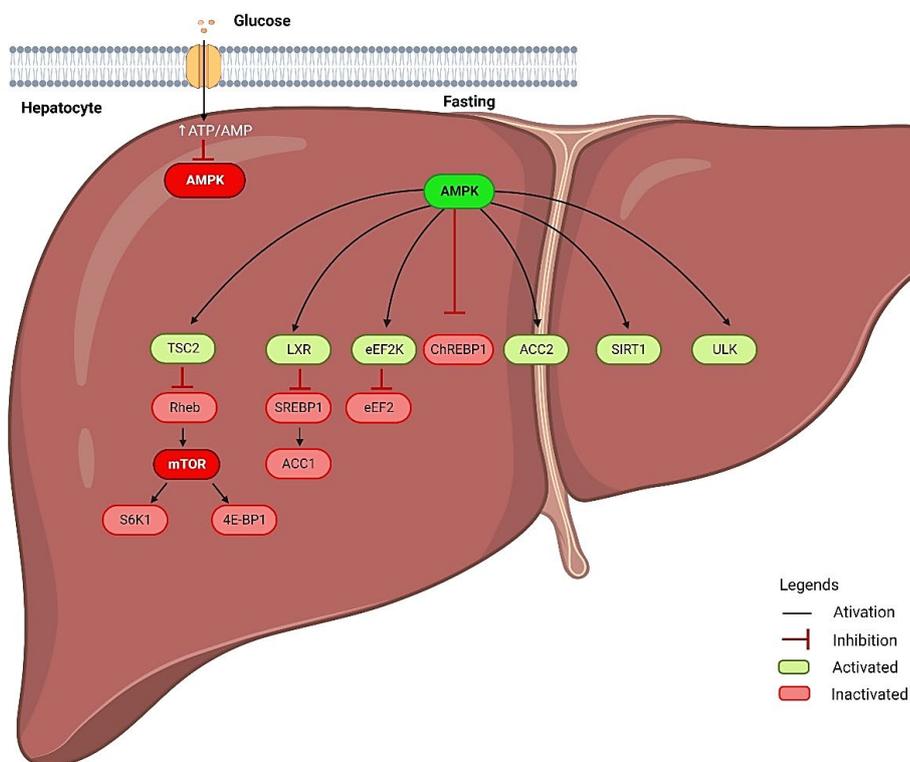
Animais DIO desenvolveram DHGNA como esperado. O fígado, sendo um dos principais órgãos metabólicos, é também um dos mais afetados por uma dieta hiperlipídica (Pontes-da-Silva *et al.*, 2022). A presença de gotículas de gordura implica em esteatose, como pode ser visto através da marcação PLIN2 (perilipina 2), envolvido na resposta inflamatória e conseqüentemente no aumento do colesterol hepático (Garcia-Macia *et al.*, 2021). No modelo DIO as alterações no TAG hepático podem explicar em parte o aumento do peso do fígado e a elevação dos níveis das enzimas hepáticas ALT e AST, que contribuem para a DHGNA (Newsome *et al.*, 2019; Mantovani e Dalbeni, 2021). O tratamento com cotadutida foi benéfico na recuperação de todos os parâmetros hepáticos.

O receptor de glucagon é amplamente expresso no fígado, indicando que o glucagon desempenha um papel relevante na fisiologia hepática. Isso pode contribuir para redução do peso corporal, provavelmente acompanhada de uma melhora nos níveis de TAG e ALT no plasma, que contribuem para a diminuição das concentrações hepáticas de glicose pela insulina (Friedman *et al.*, 2018). Os efeitos do receptor de glucagon no controle glicêmico após o tratamento com cotadutida estão alinhados com os agonistas de GLP-1 (Nahra *et al.*, 2021). O fato de não haver alterações em animais controle mostra eficácia e segurança no equilíbrio entre os receptores de glucagon e GLP-1, sendo ideal para o controle glicêmico e possivelmente recuperando a via AMPK/mTOR e caracterizando uma evolução do tratamento de DM2 e outras comorbidades relacionadas à obesidade, como a DHGNA (Parker *et al.*, 2022).

A via AMPK favorece a regeneração celular, perda de peso e melhora do metabolismo (Li *et al.*, 2014), com o aumento da expressão da *Prkag2* (responsável pela eficiência mitocondrial) e *Sirt1* (controla a resposta inflamatória) (Inoki *et al.*, 2012). A AMPK, que durante o processo de beta-oxidação desempenha um papel fundamental na perda de peso ao utilizar de forma eficiente a glicose disponível e transformá-la em energia (essencial para homeostase celular e o tratamento da obesidade) (Li *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016).

Figura 6. Via AMPK no fígado

Via da AMPK no fígado



Legenda: No estado alimentado, a glicose chega aos receptores dos hepatócitos, que produzem ATP, desta forma, a AMPK não é ativada. No jejum ocorre um estresse celular natural, que ativará a AMPK, que estimula a fosforilação de TSC2, e com isso ocorre a inibição do eixo mTORC1 e todos os mecanismos de transcrição que são ativados na lipogênese, como ChREBP1, e através do receptor hepático atua na regulação do metabolismo de ácidos graxos e colesterol, inibindo assim SREBP1 e ACC1 (Acaca). A AMPK ativada fosforila eEF2K, inibindo o processo de síntese proteica e ativando genes alvos de beta-oxidação como ACC2 (Acacb), ativando também genes alvos da biogênese mitocondrial como SIRT1, além de ativar o mecanismo de autofagia, por sinalização ULK3, que em casos iniciais de doença hepática, auxiliará em sua recuperação.

Fonte: O autor, 2022.

Existe uma ligação entre lipogênese, DHGNA e alterações metabólicas (Kim e Seki, 2021; Reis-Barbosa *et al.*, 2022b). Em camundongos DIO, observamos aumento na expressão hepática da via mTOR e da lipogênese, corroborando a literatura (Chen, 2020). Isso se deve ao excesso de nutrientes provenientes da dieta que são armazenados como energia através da ação do *Mtorc2*, potencializado pelo *Pik3c2a* (Chen *et al.*, 2015; Reis-Barbosa *et al.*, 2022a). Auxiliando esse armazenamento temos a LDN (Ferre e Fougelle, 2010), impulsionado pelo *Chrebp1*, controlando a captação de glicose e prejudicando a sensibilidade hepática à insulina, mas sem alterar a sinalização de *Akt* estimulada por insulina (Gu *et al.*, 2017).

A sinalização de *Akt* ativa a lipogênese, através da inibição de *Tsc2* e ativação de *Mtorc1* e do *Srebf1*, o que contribui para um melhor armazenamento de energia na forma de gordura (Yecies *et al.*, 2011), promovendo o metabolismo anabólico relacionado ao metabolismo lipídico, resultando em maior expressão da lipogênese mediada pela via mTOR, que também suprimirá a autofagia (Condon *et al.*, 2021).

A capacidade do agonismo duplo GLP-1/Glucagon em reduzir lipídios se deve principalmente a sinalização do glucagon no fígado (More *et al.*, 2017). A regulação do eixo mTOR hepático e a cascata de sinalização da insulina são essenciais para manter a homeostase e prevenir distúrbios metabólicos (Reis-Barbosa *et al.*, 2022a). Além disso, nossos resultados demonstram que a cotadutida regula o eixo mTORC1, diminuindo a atividade da *Eif4ebp1*, que é ativado para lidar com alta demanda de energia com aumento da lipogênese. Além disso, a ação do mTORC1 e a sinalização da insulina levam ao crescimento e proliferação celular. Então, a ativação de *Eif4ebp1* contribuirá para o aumento da esteatose e lipofagia com a piora na evolução da DHGNA (Cha *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2016).

A via mTOR também é um sensor conhecido de aminoácidos e fatores de crescimento, conduzindo a biossíntese de proteínas (Park *et al.*, 2017). Em processos anorexígenos, como no tratamento com agonistas de GLP-1, há um maior catabolismo proteico para síntese de ATP e perda significativa da composição proteica no organismo, conseqüentemente um menor estímulo da síntese proteica (Thomson *et al.*, 2008; Atherton e Smith, 2012). No tratamento com agonismo duplo GLP-1/Glucagon há maior estabilidade à degradação da peptidase, facilitando assim a presença da ligação à albumina plasmática, que é um importante transportador de aminoácidos e fundamental na síntese proteica (Henderson *et al.*, 2016).

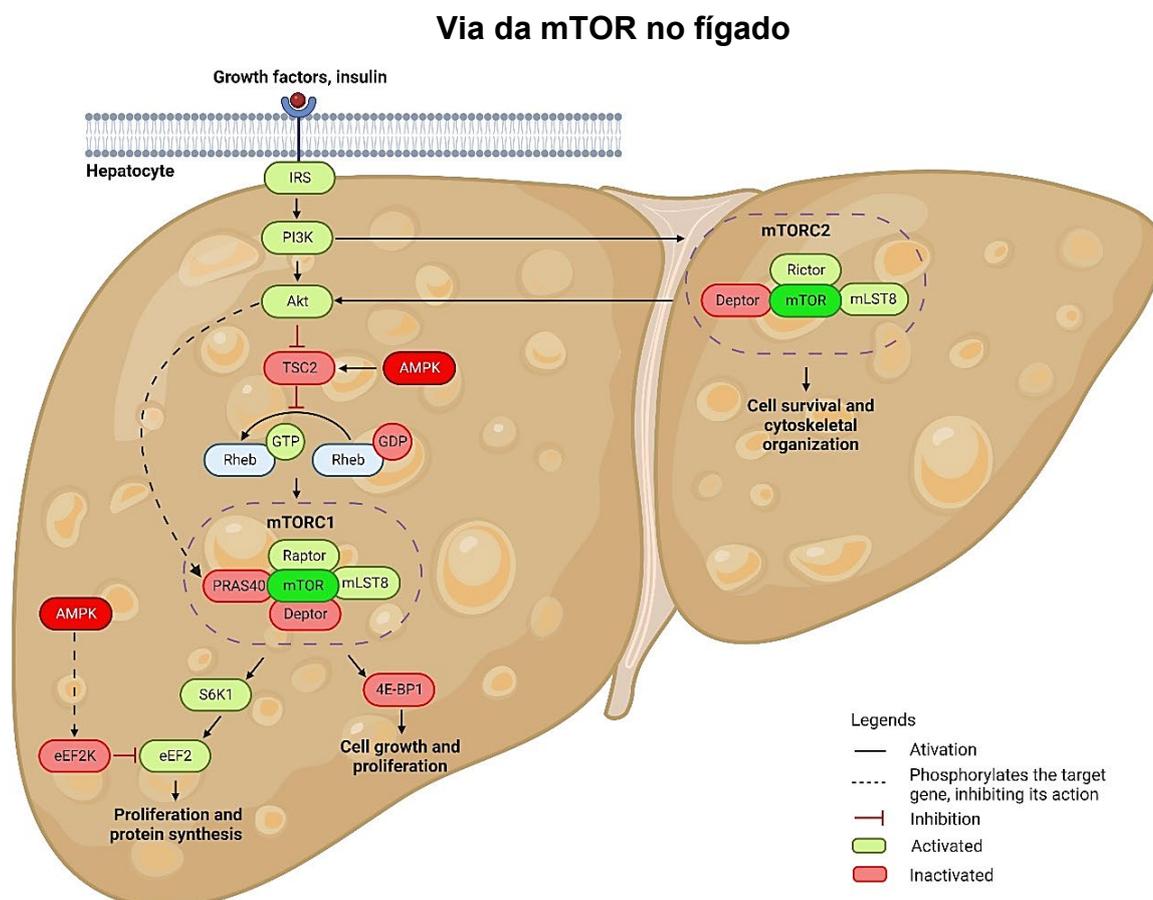
Há maior perda de proteínas como efeito adverso em obesos (Qin *et al.*, 2016). O tratamento da obesidade com cotadutida, além de diminuir o peso corporal e conseqüentemente os níveis de inflamação no organismo, também pode contribuir para uma melhor sinalização da síntese proteica, como vimos no estudo e aumento da expressão gênica do *eEF2*, que é um gene que tem maior expressão na síntese de proteínas no ribossomo (Taha *et al.*, 2013). Esse resultado foi diferente do que vimos em animais obesos tratados apenas com GLP-1 (semaglutida), que tem maior efeito anorexígeno e maior degradação proteica (Reis-Barbosa *et al.*, 2022a).

A desregulação da via mTORC1 no fígado requer a regulação adequada do eixo mTOR e a cascata de sinalização de insulina, mantendo a homeostase e

prevenindo distúrbios metabólicos. A regulação da autofagia e ação da *Ulk3*, que ocorre em momentos de estresse celular e é um mecanismo de sobrevivência celular, são indicadores importantes do eixo mTOR (Narita e Inoki, 2012; Deleyto-Seldas e Efeyan, 2021).

A cotadutida atenuou a via AMPK/mTOR nos animais DIO. Além disso, a autofagia é mutuamente regulada por AMPK e mTORC1 em resposta a mudanças dinâmicas nos nutrientes celulares, regulando proteínas e biossíntese lisossomal e nos níveis de energia. Portanto, a ativação de diferentes vias autofágicas, como a via AMPK/mTOR, é essencial para regular a lipofagia hepática e minimizar os danos hepáticos (Wang *et al.*, 2019). Além disso, o mTORC1 regula a secreção de insulina pela modulação da autofagia em diferentes situações nutricionais. Por exemplo, no jejum, a autofagia é regulada de maneira dependente de mTORC1, e sua estimulação é necessária para manter os níveis de insulina baixos, evitando assim a hipoglicemia. Reciprocamente, a estimulação de mTORC1 pode promover hiperinsulinemia por inibição da autofagia (Israeli *et al.*, 2022). Portanto, esse é um resultado significativo, da cotadutida regular a sinalização AMPK/mTORC1/ULK3 em camundongos DIO.

Figura 7. Via mTOR na doença hepática gordurosa não alcoólica



ativação da via da mTOR, ocorre pela chegada de insulina ao seu receptor no ribossomo dos hepatócitos, ativando assim a PI3K, que irá ativar o eixo da mTORC2, para auxiliar na absorção de nutrientes através da lipogênese de novo. mTORC2, conjuntamente com a PI3K, ativa AKT, que irá fosforilar PRAS40 e este terá uma desassociação de mTORC1. Simultaneamente a AKT inibirá a ação de TSC2 em RHEB ligado à GDP (forma inativa de RHEB), onde RHEB sem a atividade de inibição de TSC2 e em sua forma ativa ligado a GTP, ativará mTORC1, que terá seu papel na proliferação celular e síntese proteica através de S6K1 e eEF2, respectivamente. Em caso de crescimento celular e tumorigênese a 4EBP1 estará ativa.

Fonte: O autor, 2022.

A desregulação da autofagia é responsável por causar diversas doenças hepáticas, e um mecanismo vital para esse processo é a regulação da via mTOR e da autofagia (Wang *et al.*, 2019). No entanto, a autofagia excessiva pode piorar a lesão hepática pela morte celular autofágica dos hepatócitos. A regulação por mTOR desempenha um papel negativo na autofagia (Kim e Guan, 2015).

A resistência à insulina está ligada ao aumento do estresse do RE mitocondrial (Cheng *et al.*, 2020). Com isso, o consumo contínuo de dieta com alto teor de gordura no grupo HF e a consequente lipotoxicidade podem levar ao acúmulo de proteínas

mal dobradas ou desdobradas, afetando a homeostase do RE e aumentando o estresse do RE nesse grupo (Ao *et al.*, 2020; Ajoalabady *et al.*, 2022). De fato, a inflamação e a DHGNA são componentes diretos do estresse do RE e obesidade, e esse estresse induzido pela dieta leva à apoptose (Li *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2021). Consequentemente, a mitigação do estresse de RE pode contribuir para o tratamento de alterações metabólicas na obesidade (Menikdiwela *et al.*, 2021). Sendo assim, é relevante indicar que o tratamento com cotadutida foi eficaz na melhora dos marcadores do RE.

5. CONCLUSÕES

O modelo de camundongo DIO desenvolve alterações metabólicas e de órgãos compatíveis com a obesidade humana, incluindo acúmulo de gordura e DHGNA. A cotadutida leva a perda de peso, melhora a resistência à insulina/aumenta a sensibilidade à insulina. Além disso, a cotadutida tem efeitos benéficos nos marcadores hepáticos, leptina, adiponectina, e reduz o acúmulo de gordura hepática (diminui sensivelmente a esteatose), e reduz o estresse do RE. Essas ações da cotadutida em camundongos DIO recuperam o eixo AMPK/mTOR, resultando em menor lipogênese, maior homeostase celular e eficiência mitocondrial, atenuando a DHGNA no fígado.

REFERÊNCIAS

- Aguila MB, Santos CF, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. *Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease*. In: Molière J, Gauthier L, editors. *Insulin resistance: symptoms, causes and treatment*. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. p 1-44.
- Ajoolabady A, Kaplowitz N, Lebeaupin C, Kroemer G, Kaufman RJ, Malhi H et al. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Hepatology* 2022; (doi: 10.1002/hep.32562)
- Alba M, Yee J, Frustaci ME, Samtani MN, Fleck P. Efficacy and safety of glucagon-like peptide-1/glucagon receptor co-agonist JNJ-64565111 in individuals with obesity without type 2 diabetes mellitus: A randomized dose-ranging study. *Clin Obes* 2021; 11: e12432 (doi: 10.1111/cob.12432)
- Albracht-Schulte K, Rosairo S, Ramalingam L, Wijetunge S, Ratnayake R, Kotakadeniya H et al. Obesity, adipocyte hypertrophy, fasting glucose, and resistin are potential contributors to nonalcoholic fatty liver disease in South Asian women. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 863-872 (doi: 10.2147/DMSO.S203937)
- Alexiadou K, Tan TM. Gastrointestinal Peptides as Therapeutic Targets to Mitigate Obesity and Metabolic Syndrome. *Curr Diab Rep* 2020; 20: 26 (doi: 10.1007/s11892-020-01309-9)
- Ambery P, Parker VE, Stumvoll M, Posch MG, Heise T, Plum-Moerschel L et al. MEDI0382, a GLP-1 and glucagon receptor dual agonist, in obese or overweight patients with type 2 diabetes: a randomised, controlled, double-blind, ascending dose and phase 2a study. *Lancet* 2018; 391: 2607-2618 (doi: 10.1016/S0140-6736(18)30726-8)
- Aminian A, Zajichek A, Tu C, Wolski KE, Brethauer SA, Schauer PR et al. How Much Weight Loss is Required for Cardiovascular Benefits? Insights From a Metabolic Surgery Matched-cohort Study. *Ann Surg* 2020; 272: 639-645 (doi: 10.1097/SLA.0000000000004369)
- Ao N, Ma Z, Yang J, Jin S, Zhang K, Luo E et al. Liraglutide ameliorates lipotoxicity-induced inflammation through the mTORC1 signalling pathway. *Peptides* 2020; 133: 170375 (doi: 10.1016/j.peptides.2020.170375)
- Asano M, Sekikawa A, Kim H, Gasser RA, Jr., Robertson D, Petrone M et al. Pharmacokinetics, safety, tolerability and efficacy of cotadutide, a glucagon-like peptide-1 and glucagon receptor dual agonist, in phase 1 and 2 trials in overweight or obese participants of Asian descent with or without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23: 1859-1867 (doi: 10.1111/dom.14412)

Atherton PJ, Smith K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. *J Physiol* 2012; 590: 1049-1057 (doi: 10.1113/jphysiol.2011.225003)

Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease. *Mol Metab* 2021; 46: 101090 (doi: 10.1016/j.molmet.2020.101090)

Boland ML, Laker RC, Mather K, Nawrocki A, Oldham S, Boland BB et al. Resolution of NASH and hepatic fibrosis by the GLP-1R/GcgR dual-agonist Cotadutide via modulating mitochondrial function and lipogenesis. *Nat Metab* 2020; 2: 413-431 (doi: 10.1038/s42255-020-0209-6)

Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369: 756-758 (doi: 10.1038/369756a0)

Campana L, Esser H, Huch M, Forbes S. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22: 608-624 (doi: 10.1038/s41580-021-00373-7)

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459: 477-485 (doi: 10.1007/s00428-011-1147-1)

Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1859: 1083-1099 (doi: 10.1016/j.bbagr.2016.03.002)

Cha YL, Li PD, Yuan LJ, Zhang MY, Zhang YJ, Rao HL et al. EIF4EBP1 overexpression is associated with poor survival and disease progression in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2015; 10: e0117493 (doi: 10.1371/journal.pone.0117493)

Chang R, Zhang X, Qiao A, Dai A, Belousoff MJ, Tan Q et al. Cryo-electron microscopy structure of the glucagon receptor with a dual-agonist peptide. *J Biol Chem* 2020; 295: 9313-9325 (doi: 10.1074/jbc.RA120.013793)

Chen H. Nutrient mTORC1 signaling contributes to hepatic lipid metabolism in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research* 2020; 4: 15-22 (doi: 10.1016/j.livres.2020.02.004)

Chen L, Xu B, Liu L, Liu C, Luo Y, Chen X et al. Both mTORC1 and mTORC2 are involved in the regulation of cell adhesion. *Oncotarget* 2015; 6: 7136-7150 (doi: 10.18632/oncotarget.3044)

Cheng H, Gang X, He G, Liu Y, Wang Y, Zhao X et al. The Molecular Mechanisms Underlying Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane-Induced Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 592129 (doi: 10.3389/fendo.2020.592129)

Cheon SY, Cho K. Lipid metabolism, inflammation, and foam cell formation in health and metabolic disorders: targeting mTORC1. *J Mol Med (Berl)* 2021; 99: 1497-1509 (doi: 10.1007/s00109-021-02117-8)

Condon KJ, Orozco JM, Adelman CH, Spinelli JB, van der Helm PW, Roberts JM et al. Genome-wide CRISPR screens reveal multitiered mechanisms through which mTORC1 senses mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118: (doi: 10.1073/pnas.2022120118)

Darbalaei S, Yuliantie E, Dai A, Chang R, Zhao P, Yang D et al. Evaluation of biased agonism mediated by dual agonists of the GLP-1 and glucagon receptors. *Biochem Pharmacol* 2020; 180: 114150 (doi: 10.1016/j.bcp.2020.114150)

De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 5239-5249 (doi: 10.2174/1381612811319290006)

Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR-Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 655731 (doi: 10.3389/fcell.2021.655731)

Di Prospero NA, Yee J, Frustaci ME, Samtani MN, Alba M, Fleck P. Efficacy and safety of glucagon-like peptide-1/glucagon receptor co-agonist JNJ-64565111 in individuals with type 2 diabetes mellitus and obesity: A randomized dose-ranging study. *Clin Obes* 2021; 11: e12433 (doi: 10.1111/cob.12433)

Ding WX, Wang HY, Peng LJ, Zhang F, Yuan S, Zhao LH. Novel peptidic dual GLP-1/glucagon receptor agonist alleviates diabetes and diabetic complications in combination with low-intensity ultrasound. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 12423-12436 (doi: 10.26355/eurrev_202012_24038)

Eriksson O, Haack T, Hijazi Y, Teichert L, Tavernier V, Laitinen I et al. Receptor occupancy of dual glucagon-like peptide 1/glucagon receptor agonist SAR425899 in individuals with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2020; 10: 16758 (doi: 10.1038/s41598-020-73815-5)

Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12 Suppl 2: 83-92 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x)

Field BC, Chaudhri OB, Bloom SR. Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 444-453 (doi: 10.1038/nrendo.2010.93)

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Santos CF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223 (doi: 10.3164/jcbrn.09-83)

Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; 24: 908-922 (doi: 10.1038/s41591-018-0104-9)

Garcia-Macia M, Santos-Ledo A, Leslie J, Paish HL, Collins AL, Scott RS et al. A Mammalian Target of Rapamycin-Perilipin 3 (mTORC1-Plin3) Pathway is essential to Activate Lipophagy and Protects Against Hepatosteatosis. *Hepatology* 2021; 74: 3441-3459 (doi: 10.1002/hep.32048)

Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* 2017; 66: 789-800 (doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.032)

Garvey WT, Birkenfeld AL, Dicker D, Mingrone G, Pedersen SD, Satyrganova A et al. Efficacy and Safety of Liraglutide 3.0 mg in Individuals With Overweight or Obesity and Type 2 Diabetes Treated With Basal Insulin: The SCALE Insulin Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care* 2020; 43: 1085-1093 (doi: 10.2337/dc19-1745)

Gu Y, Albuquerque CP, Braas D, Zhang W, Villa GR, Bi J et al. mTORC2 Regulates Amino Acid Metabolism in Cancer by Phosphorylation of the Cystine-Glutamate Antiporter xCT. *Mol Cell* 2017; 67: 128-138 e127 (doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.030)

Henderson SJ, Konkar A, Hornigold DC, Trevaskis JL, Jackson R, Fritsch Fredin M et al. Robust anti-obesity and metabolic effects of a dual GLP-1/glucagon receptor peptide agonist in rodents and non-human primates. *Diabetes Obes Metab* 2016; 18: 1176-1190 (doi: 10.1111/dom.12735)

Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6680-6686 (doi: 10.1038/sj.onc.1204091)

Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012; 52: 381-400 (doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537)

Israeli T, Riahi Y, Garzon P, Louzada RA, Werneck-de-Castro JP, Blandino-Rosano M et al. Nutrient Sensor mTORC1 Regulates Insulin Secretion by Modulating beta-Cell Autophagy. *Diabetes* 2022; 71: 453-469 (doi: 10.2337/db21-0281)

Jepsen MM, Christensen MB. Emerging glucagon-like peptide 1 receptor agonists for the treatment of obesity. *Expert Opin Emerg Drugs* 2021; 26: 231-243 (doi: 10.1080/14728214.2021.1947240)

Jura M, Kozak LP. Obesity and related consequences to ageing. *Age (Dordr)* 2016; 38: 23 (doi: 10.1007/s11357-016-9884-3)

- Kakouri A, Kanti G, Kapantais E, Kokkinos A, Lanaras L, Farajian P et al. New Incretin Combination Treatments under Investigation in Obesity and Metabolism: A Systematic Review. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021; 14: (doi: 10.3390/ph14090869)
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-2410 (doi: 10.1210/jcem.85.7.6661)
- Kaur S, Chen Y, Shenoy SK. Agonist-activated glucagon receptors are deubiquitinated at early endosomes by two distinct deubiquitinases to facilitate Rab4a-dependent recycling. *J Biol Chem* 2020; 295: 16630-16642 (doi: 10.1074/jbc.RA120.014532)
- Kim J, Seki E. Crossing the Rubicon: Adipose Tissue Autophagy Breaks Out NAFLD. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021; 12: 1877-1878 (doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.08.006)
- Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015; 125: 25-32 (doi: 10.1172/jci73939)
- Kolotkin RL, Meter K, Williams GR. Quality of life and obesity. *Obes Rev* 2001; 2: 219-229 (doi: 10.1046/j.1467-789x.2001.00040.x)
- Kuhre RE, Deacon CF, Holst JJ, Petersen N. What Is an L-Cell and How Do We Study the Secretory Mechanisms of the L-Cell? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 694284 (doi: 10.3389/fendo.2021.694284)
- Lafferty RA, O'Harte FPM, Irwin N, Gault VA, Flatt PR. Proglucagon-Derived Peptides as Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 689678 (doi: 10.3389/fendo.2021.689678)
- Li H, Min Q, Ouyang C, Lee J, He C, Zou MH et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 1844-1854 (doi: 10.1016/j.bbadis.2014.07.002)
- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012; Chapter 5: Unit 5 61 (doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58)
- Ma T, Huo S, Xu B, Li F, Wang P, Liu Y et al. A novel long-acting oxyntomodulin analogue eliminates diabetes and obesity in mice. *Eur J Med Chem* 2020; 203: 112496 (doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112496)
- Mandarim-de-Lacerda CA, Del-Sol M. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). *Int J Morphol* 2017; 35: 1482-1494 (doi: 10.4067/s0717-95022017000401482)

Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M, Vazquez B, Aguila MB. Mice as an animal model for the study of adipose tissue and obesity. *Int J Morphol* 2021; 39: 1521-1528 (doi: 10.4067/S0717-95022021000601521)

Mantovani A, Dalbeni A. Treatments for NAFLD: State of Art. *Int J Mol Sci* 2021; 22: (doi: 10.3390/ijms22052350)

Marinho TS, Martins FF, Cardoso LM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet cells disarray, apoptosis, and proliferation in obese mice. The role of Semaglutide treatment. *Biochimie* 2022; 193: 126-136 (doi: 10.1016/j.biochi.2021.10.017)

Menikdiwela KR, Guimaraes JPT, Ramalingam L, Kalupahana NS, Dufour JM, Washburn RL et al. Mechanisms linking endoplasmic reticulum (ER) stress and microRNAs to adipose tissue dysfunction in obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2021; 56: 455-481 (doi: 10.1080/10409238.2021.1925219)

Moore F, Weekes J, Hardie DG. Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem* 1991; 199: 691-697 (doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16172.x)

More VR, Lao J, McLaren DG, Cumiskey AM, Murphy BA, Chen Y et al. Glucagon like receptor 1/ glucagon dual agonist acutely enhanced hepatic lipid clearance and suppressed de novo lipogenesis in mice. *PLoS One* 2017; 12: e0186586 (doi: 10.1371/journal.pone.0186586)

Nahra R, Wang T, Gadde KM, Oscarsson J, Stumvoll M, Jermutus L et al. Effects of Cotadutide on Metabolic and Hepatic Parameters in Adults With Overweight or Obesity and Type 2 Diabetes: A 54-Week Randomized Phase 2b Study. *Diabetes Care* 2021; 44: 1433-1442 (doi: 10.2337/dc20-2151)

Narita M, Inoki K. Rags connect mTOR and autophagy. *Small GTPases* 2012; 3: 111-114 (doi: 10.4161/sgtp.19422)

Newsome P, Francque S, Harrison S, Ratziu V, Van Gaal L, Calanna S et al. Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity. *Aliment Pharmacol Ther* 2019; 50: 193-203 (doi: 10.1111/apt.15316)

Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratziu V et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2021; 384: 1113-1124 (doi: 10.1056/NEJMoa2028395)

Pang J, Xi C, Huang X, Cui J, Gong H, Zhang T. Effects of Excess Energy Intake on Glucose and Lipid Metabolism in C57BL/6 Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0146675 (doi: 10.1371/journal.pone.0146675)

Park Y, Reyna-Neyra A, Philippe L, Thoreen CC. mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep* 2017; 19: 1083-1090 (doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.042)

Parker VER, Hoang T, Schlichthaar H, Gibb FW, Wenzel B, Posch MG et al. Efficacy and safety of cotadutide, a dual glucagon-like peptide-1 and glucagon receptor agonist, in a randomized phase 2a study of patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes Obes Metab* 2022; 24: 1360-1369 (doi: 10.1111/dom.14712)

Parker VER, Robertson D, Wang T, Hornigold DC, Petrone M, Cooper AT et al. Efficacy, Safety, and Mechanistic Insights of Cotadutide, a Dual Receptor Glucagon-Like Peptide-1 and Glucagon Agonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: (doi: 10.1210/clinem/dgz047)

Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* 2003; 138: 24-32 (doi: 10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00008)

Perreault L, Skyler JS, Rosenstock J. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 364-377 (doi: 10.1038/s41574-021-00489-y)

Pontes-da-Silva RM, Marinho TS, Cardoso LEM, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Obese mice weight loss role on nonalcoholic fatty liver disease and endoplasmic reticulum stress treated by a GLP-1 receptor agonist. *Int J Obes (Lond)* 2022; 46: 21-29 (doi: 10.1038/s41366-021-00955-7)

Qin X, Jiang B, Zhang Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle* 2016; 15: 781-786 (doi: 10.1080/15384101.2016.1151581)

Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *J Comput Biol* 2013; 20: 703-711 (doi: 10.1089/cmb.2012.0279)

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)

Reis-Barbosa PH, Marcondes-de-Castro IA, Marinho TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. The mTORC1/AMPK pathway plays a role in the beneficial effects of semaglutide (GLP-1 receptor agonist) on the liver of obese mice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2022a; 46: 101922 (doi: 10.1016/j.clinre.2022.101922)

Reis-Barbosa PH, Marinho TS, Matsuura C, Aguila MB, de Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA. The obesity and nonalcoholic fatty liver disease mouse model revisited: Liver oxidative stress, hepatocyte apoptosis, and proliferation. *Acta Histochem* 2022b; 124: 151937 (doi: 10.1016/j.acthis.2022.151937)

Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015; 313: 2263-2273 (doi: 10.1001/jama.2015.5370)

Rui L, Lin JD. Reprogramming of Hepatic Metabolism and Microenvironment in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annu Rev Nutr* 2022: (doi: 10.1146/annurev-nutr-062220-105200)

Schiavon M, Visentin R, Gobel B, Riz M, Cobelli C, Klabunde T et al. Improved postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes by the dual glucagon-like peptide-1/glucagon receptor agonist SAR425899 in comparison with liraglutide. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23: 1795-1805 (doi: 10.1111/dom.14394)

Shin MR, Kim MJ, Park HJ, Han J, Roh SS. Beneficial Effect of Taraxacum coreanum Nakai via the Activation of LKB1-AMPK Signaling Pathway on Obesity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 6655599 (doi: 10.1155/2021/6655599)

Shojaei-Zarghani S, Safarpour AR, Fattahi MR, Keshtkar A. Sodium in relation with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Food Sci Nutr* 2022; 10: 1579-1591 (doi: 10.1002/fsn3.2781)

Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 311: E730-E740 (doi: 10.1152/ajpendo.00225.2016)

Spezani R, Mandarim-de-Lacerda CA. The current significance and prospects for the use of dual receptor agonism GLP-1/Glucagon. *Life Sci* 2022; 288: 120188 (doi: 10.1016/j.lfs.2021.120188)

Taha E, Gildish I, Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K. The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 2013; 105: 100-106 (doi: 10.1016/j.nlm.2013.04.015)

Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* 2016; 39: 87-95 (doi: 10.14348/molcells.2016.2318)

Thomson DM, Fick CA, Gordon SE. AMPK activation attenuates S6K1, 4E-BP1, and eEF2 signaling responses to high-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions. *J Appl Physiol (1985)* 2008; 104: 625-632 (doi: 10.1152/jappphysiol.00915.2007)

Tillner J, Posch MG, Wagner F, Teichert L, Hijazi Y, Einig C et al. A novel dual glucagon-like peptide and glucagon receptor agonist SAR425899: Results of randomized, placebo-controlled first-in-human and first-in-patient trials. *Diabetes Obes Metab* 2019; 21: 120-128 (doi: 10.1111/dom.13494)

Tomic D, Kemp WW, Roberts SK. Nonalcoholic fatty liver disease: current concepts, epidemiology and management strategies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018; 30: 1103-1115 (doi: 10.1097/MEG.0000000000001235)

Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. *Cells* 2019; 8: (doi: 10.3390/cells8121597)

Xu X, Su L, Gao Y, Ding Y. The Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Related Metabolic Comorbidities Was Associated with Age at Onset of Moderate to Severe Plaque Psoriasis: A Cross-Sectional Study. *PLoS One* 2017; 12: e0169952 (doi: 10.1371/journal.pone.0169952)

Yang PY, Zou H, Amso Z, Lee C, Huang D, Woods AK et al. New Generation Oxyntomodulin Peptides with Improved Pharmacokinetic Profiles Exhibit Weight Reducing and Anti-Steatotic Properties in Mice. *Bioconjug Chem* 2020; 31: 1167-1176 (doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00093)

Yang Y, Guo G, Zhou W, Ge Y, Fan Z, Liu Q et al. Sestrin2 protects against bavachin induced ER stress through AMPK/mTORC1 signaling pathway in HepG2 cells. *J Pharmacol Sci* 2021; 145: 175-186 (doi: 10.1016/j.jphs.2020.11.012)

Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* 2011; 14: 21-32 (doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.002)

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
 Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
 Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Análogo de oxintomodulina (cotadutida) em camundongos obesos**", registrado com o nº 002/2021, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarim de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 02/02/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/02/2025
Espécie / linhagem / raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	150
Peso / Idade	20 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 02 de fevereiro de 2021.

Dr. Alex C. Manhães
 Professor Associado
 Matr. 33303-9
 Coordenador
 CEUA/IBRAG/UERJ

Dra. Patricia C. Lisboa
 Professora Associada
 Matr. 34765-8
 Vice-Coordenadora
 CEUA/IBRAG/UERJ

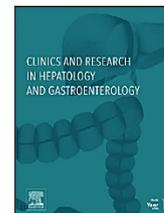
ANEXO B – Artigos publicados relacionados.

Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology 46 (2022) 101922



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE

The mTORC1/AMPK pathway plays a role in the beneficial effects of semaglutide (GLP-1 receptor agonist) on the liver of obese mice



Pedro Henrique Reis-Barbosa¹, Ilitch Aquino Marcondes-de-Castro¹,
 Thatiany de Souza Marinho, Marcia Barbosa Aguila,
 Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda*

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Available online 13 April 2022

KEYWORDS

Obesity;
 Type 2 diabetes;
 Liver;
 GLP-1 receptor
 agonist;
 Molecular analysis

Abstract

Purpose: The liver regulates lipid metabolism. Decreasing mTOR (mechanistic target of rapamycin complex 1) and enhancing AMPK (AMP-activated protein kinase) help degrade hepatic diet-induced accumulated lipids. Therefore, the glucagon-like peptide type 1 receptor agonist (GLP-1) is indicated to treat obesity-related liver metabolic alterations. Then, we investigated the effects of semaglutide (recent GLP-1) by analyzing the liver mTORC1/AMPK pathway genes in obese mice.

Basic procedures: C57BL/6 male mice were separated into two groups and submitted for 16 weeks of obesity induction. Then they were treated for an additional four weeks with semaglutide (subcutaneous, 40 µg/kg once every three days). The groups formed were: C, control group; CS, control group plus semaglutide; HF, high-fat group; HFS, high-fat group plus semaglutide. Next, the livers were dissected, and rapidly fragments of all lobes were kept and frozen at –80° C for analysis (RT-qPCR).

Main findings: Liver markers for the mTOR pathway associated with anabolism and lipogenesis *de novo* were increased in the HF group compared to the C group but comparatively attenuated

Abbreviations: Acaca, Acetyl-Coa Carboxylase Alpha; Acacb, Acetyl-Coa Carboxylase Beta; AIN, American Institute of Nutrition; Akt, Protein Kinase B; AMPK, AMP-activated protein kinase pathway; C, control group; Chrebp1, Carbohydrate-responsive element-binding protein; DOCK5, dedicator of cytokinesis 5; eef2, Eukaryotic Translation Elongation Factor 2; Eif4ebp1, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4e Binding Protein 1; ER, endoplasmic reticulum; GLP-1, glucagon-like peptide type 1; HF, high-fat group; Insig2, Insulin induced gene 2; Mtor, Mechanistic Target of Rapamycin (gene); mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; Nr1h3, Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3; Pik3c2a, Phosphoinositide 3-Kinase; Plin, Perilipin; Prkag2, 5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2; Rps6kb1, Ribosomal Protein S6 Kinase Polypeptide 1; RT-qPCR, Real-time quantitative polymerase chain reaction; S, semaglutide; Sirt1, Sirtuin 1; Sreb1, Sterol Regulatory Element Binding Protein 1; T2D, Type 2 diabetes; Ulk3, unc-51-like kinase 3.

* Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av 28 de Setembro 87 fds, CEP:20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: mandarim@uerj.br (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

¹ These two authors had the same role in executing the project.

<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2022.101922>

2210-7401/© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

ANEXO C – Artigos publicados relacionados.

Life Sciences 312 (2023) 121253



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie



Adult mice offspring of obese mothers supplemented with melatonin show lessened liver steatosis, inflammation, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress

Matheus Ajackson, Brenda A. Nagagata, Ilitch A. Marcondes-de-Castro, Carlos A. Mandarin-de-Lacerda^{*}, Marcia Barbosa Aguilã

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Maternal obesity
Fetal programming
Inflammation
Liver steatosis
Epigenetics

ABSTRACT

Aims: To investigate, in the liver of adult offspring, the possible effects of melatonin supplementation in the obese mother during pregnancy and lactation.

Main methods: C57BL/6 females were fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet and supplemented with melatonin (Mel) during the pregnancy and lactation, forming the groups: C, CMel, HF, and HFMel. After weaning until three months old, the offspring only received the C diet.

Key findings: The HF mothers and their offspring showed higher body weight (BW) than the C mothers and offspring. However, at 3-mo-old, BW was reduced in HFMel vs. HF offspring. Also, plasmatic and liver lipid markers increased in HF vs. C offspring but were reduced in HFMel vs. HF offspring. Liver lipid content was lessened in HFMel vs. HF offspring by 50%. Also, lipid metabolism, pro-inflammatory and endoplasmic reticulum (ER) stress genes were higher expressed in HF vs. C offspring but reduced in HFMel vs. HF offspring. Contrarily, beta-oxidation and antioxidant enzyme genes were less expressed in HF vs. C offspring but improved in HFMel vs. HF offspring. Finally, AMPK/mTOR pathway genes, initially dysregulated in the HF, were restored in the HFMel offspring.

Significance: The obese mother leads to liver alterations in the offspring. Current findings demonstrated the maternal melatonin supplementation during pregnancy and lactation in adult offspring's liver. Consequently, the effects were seen in mitigating the liver's AMPK/mTOR pathway genes, lipogenesis, beta-oxidation, inflammation, oxidative stress, and ER stress, preventing liver disease progression in the offspring.

1. Introduction

A significant challenge in people's health is the growing prevalence

of obesity and its comorbidities, which limits the quality of life and has a high cost for the health system. In addition, the obese mother changes her offspring's phenotype, with changes that persist into adulthood

Abbreviations: Acac, Acetyl-Coa Carboxylase Alpha; Akt1, Protein Kinase B; ALT, Alanine transaminase; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; AST, Aspartate transaminase; Atf4, Activating Transcription Factor 4; BW, Body weight; Cat, Catalase; Chop, C/EBP Homologous Protein; Chrebp, Carbohydrate-responsive Element-binding Protein; Cpt1b, Carnitine Palmitoyltransferase-1b; Eef2, Eukaryotic Translation Elongation Factor 2; EI, Energy intake; Eif4ebp1, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4e Binding Protein 1; ER, Endoplasmic reticulum; Fas, Fatty Acid Synthase; FI, Food intake; Gadd45, Growth Arrest and DNA-damage-inducible Protein; Gpx, Glutathione peroxidase; Gr, Glutathione reductase; Il, Interleukin; Ir, Insulin receptor; LW, Liver weight; Mtorc, Mechanistic Target of Rapamycin Complex; NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease; Nr1h3, Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3; Pik3c2a, Phosphoinositide 3-Kinase; Ppara, Peroxisome Proliferator-activated Receptor; Prkg2, 5' AMP-activated Protein Kinase Subunit Gamma-2; Rps6kb1, Ribosomal Protein S6 Kinase Polypeptide 1; Sirt1, Sirtuin 1; Sod, Superoxide dismutase; Srebf1, Sterol-regulatory Element Binding Protein-1; TAG, Triacylglycerol; Tbp, TATA-box Binding Protein; TC, Total cholesterol; Tnfa, Tumor Necrosis Factor Alpha; Tsc2, Tuberous Sclerosis Complex 2; Ulk3, Unc-51-like kinase 3.

^{*} Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: mandarim@uerj.br (C.A. Mandarin-de-Lacerda), mbaguila@uerj.br (M.B. Aguilã).

URL: <https://www.lmme.uerj.br> (C.A. Mandarin-de-Lacerda).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121253>

Received 15 October 2022; Received in revised form 23 November 2022; Accepted 26 November 2022

Available online 6 December 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO D – Artigos publicados relacionados.

Journal of Molecular Endocrinology

Journal of Molecular
Endocrinology

I A Marcondes-de-Castro
et al.

70:3

e220168

RESEARCH

Cotadutide effect in liver and adipose tissue in obese mice

Ilitch Aquino Marcondes-de-Castro¹, Thamiris Ferreira Oliveira¹, Renata Spezani¹, Thatiany Souza Marinho¹, Luiz Eduardo Macedo Cardoso¹, Marcia Barbosa Aguilã¹ and Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda¹

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to C A Mandarim-de-Lacerda: mandarim@uerj.br

Abstract

Obesity, adipose tissue inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) are associated with insulin resistance and type 2 diabetes (T2D). Cotadutide is a dual agonist GLP-1/glucagon, currently in a preclinical study phase 2 that presents an anti-obesity effect. Diet-induced obese (DIO) C57BL/6 mice were treated for 4 weeks with cotadutide (30 nm/kg once a day at 14:00 h). The study focused on epididymal white adipose tissue (eWAT), liver (NAFLD), inflammation, lipid metabolism, AMP-activated protein kinase (AMPK)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathways, and the endoplasmic reticulum (ER) stress. As a result, cotadutide controlled weight gain, glucose intolerance, and insulin resistance and showed beneficial effects on plasma markers in DIO mice (triacylglycerol, total cholesterol, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase, leptin, adiponectin, monocyte chemoattractant protein-1, resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor- α). Also, cotadutide lessened liver fat accumulation, eWAT proinflammatory markers, and ER stress. In addition, cotadutide improved lipid metabolism genes in eWAT, fatty acid synthase, peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mitigates adipocyte hypertrophy and apoptosis. Furthermore, the effects of cotadutide were related to liver AMPK/mTOR pathway and ER stress. In conclusion, cotadutide induces weight loss and treats glucose intolerance and insulin resistance in DIO mice. In addition, cotadutide shows beneficial effects on liver lipid metabolism, mitigating steatosis, inflammation, and ER stress. Besides, in adipocytes, cotadutide decreases hypertrophy and reduces apoptosis. These actions rescuing the AMPK and mTOR pathway, improving lipid metabolism, and lessening NAFLD, inflammation, and ER stress in both eWAT and liver of DIO mice indicate cotadutide as a potentially new pharmacological treatment for T2D and associated obesity.

Key Words

- ▶ inflammation
- ▶ lipogenesis
- ▶ ER stress
- ▶ NAFLD
- ▶ mice

Journal of Molecular
Endocrinology
(2023) 70, e220168

ANEXO E – Artigos publicados relacionados.

Journal of Gastroenterology and Hepatology

REVIEW ARTICLE

AMPK/mTOR pathway significance in healthy liver and non-alcoholic fatty liver disease and its progression

Ilitch Aquino Marcondes-de-Castro,  Pedro Henrique Reis-Barbosa,  Thatiany Souza Marinho, 
Marcia Barbosa Aguilã  and Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda 

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Centre, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

Key words

AMPK/mTOR pathway, autophagy, lipid metabolism, non-alcoholic fatty liver disease, obesity.

Accepted for publication 14 June 2023.

Correspondence

Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda,
Laboratory of Morphometry, Metabolism, and
Cardiovascular Diseases, Biomedical Centre,
Institute of Biology, Rio de Janeiro State
University, Av 28 de Setembro 87 fds, PO Box:
20551-030 RJ, Rio de Janeiro, Brazil.
Email: mandarim@uerj.br

Abstract

Obesity is related to several organs, but the liver is particularly affected. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is a cellular energy sensor and regulator of liver lipid dysfunction and glucose metabolism. The mechanistic target of rapamycin (mTOR) is a protein kinase regulating cell growth, survival, metabolism, and immunity. Together, these pathways are involved in obesity, insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its progression, and autophagy. During energy demand, liver kinase B (LKB) phosphorylation helps activate the AMPK/mTOR pathways. Likewise, the protein forkhead box O family (FOXO) negatively regulates adipogenesis by binding to the promoter sites of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha, initiating adipogenesis. In addition, acetyl-CoA carboxylase, which regulates de novo lipogenesis, is linked to LKB and FOXO in developing NAFLD. The kinase complex, consisting of Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 or 2 (ULK1, ULK2) by stimulating autophagy, and eliminating fat droplets in NAFLD, is regulated by mTORC1 and negatively regulated by AMPK that suppresses liver lipogenesis and increases fatty acid oxidation. Also, ULK1 is essential for initiating phagophore formation, establishing macrophagy, and generating autophagosomes. The selective breakdown of lipid droplets through macroautophagy, or macrolipophagy, occurs on a cellular energy level using free fatty acids. In addition, mTORC1 promotes lipogenesis by activating sterol regulatory element-binding protein. Finding new components and novel regulatory modes in signaling is significant for a better understanding of the AMPK/mTOR pathways, potentially facilitating the development of future diagnostic and therapeutic strategies for NAFLD and its progression to non-alcoholic steatohepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.