



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thamiris Ferreira de Oliveira

**Cotadutida (análogo a oxintomodulina) e tecido adiposo branco
epididimário em camundongos obesos**

Rio de Janeiro

2023

Thamiris Ferreira de Oliveira

Cotadutida (análogo a oxintomodulina) e tecido adiposo branco epididimário em camundongos obesos.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Thamiris Ferreira de.
Cotadutida (análogo a oxintomodulina) e tecido adiposo branco epididimário em camundongos obesos / Thamiris Ferreira de Oliveira. – 2023.
46 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Drogas em investigação – Farmacologia. 2. Resistência à insulina – Teses. 3. Adipócito – Teses. 4. Epidídimo – Patologia – Teses. 5. Obesidade – Teses. I. Mandarin-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 612.349.8:616.682

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Thamiris Ferreira de Oliveira

**Cotadutida (análogo a oxintomodulina) e tecido adiposo branco epididimário em
camundongos obesos**

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

Aprovada em 27 de Janeiro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Profª Drª Jemima Fuentes Ribeiro da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Profª Drª Thereza Cristina Lonzeti Bargut
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Em memória de Ruth M. Ferreira Torres (vó amada) e demais vítimas da COVID-19.

AGRADECIMENTOS

À minha família amada, meus maiores incentivadores.

À toda equipe e amigos do laboratório LMMC e BHEX.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e aos órgãos de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do RiodeJaneiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 001.

À minha alma por transpor a depressão em fé e acreditar que dias melhores viriam.

RESUMO

OLIVEIRA, Thamiris Ferreira de Oliveira **Cotadutida (análogo a oxintomodulina) e tecido adiposo branco epididimário em camundongos obesos**. 2023. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A obesidade e inflamação do tecido adiposo estão associadas a resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). A cotadutida é um duplo agonista GLP-1/glucagon em estudo pré-clínico indicado para tratar DM2 e tem efeito antiobesidade. Camundongos C57BL/6 obesos induzidos por dieta foram tratados por quatro semanas com cotadutida na dosagem de 30nmol/kg. O estudo teve como objetivo investigar os efeitos da cotadutida em modelo de camundongo obeso, enfatizando tecido adiposo branco epididimário (TABe), inflamação e estresse do retículo endoplasmático (RE). A cotadutida reduziu a massa corporal e a intolerância à glicose/resistência à insulina e aumentou a sensibilidade à insulina em camundongos obesos. Além disso, a cotadutida teve efeitos benéficos nos marcadores plasmáticos leptina, adiponectina, proteína quimioatraente de monócitos 1, resistina, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, e reduziu marcadores pró-inflamatórios e do estresse do RE no TABe. A cotadutida também teve efeitos favoráveis nos aspectos estruturais do TABe, com redução de genes relacionados a hipertrofia, proliferação de adipócitos e apoptose. Em conclusão, em camundongos obesos a cotadutida leva ao emagrecimento e controla a resistência à insulina, com melhora na sensibilidade à insulina. A cotadutida diminuiu as citocinas inflamatórias do tecido adiposo, assim como o estresse do RE, com redução da hipertrofia e apoptose de adipócitos. Esses são efeitos muito favoráveis no tratamento do DM2 e obesidade associada, que sinalizam positivamente para a cotadutida como medicamento em análise pré-clínica.

Palavras-chave: Duplo agonismo GLP-1/Glucagon. Inflamação. Adipócito. Análise molecular. Camundongos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thamiris Ferreira de Oliveira **Cotadutida (analogue to oxyntomodulin) and epididymal white adipose tissue in obese mice**. 2023. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Obesity and inflammation of adipose tissue are associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (DM2). Cotadutida is a double agonist GLP-1/glucagon in preclinical study indicated to treat DM2 and has anti-obesity effect. Diet-induced obese C57BL/6 mice were treated for four weeks with codutide at a dosage of 30nmol/kg. The study aimed to investigate the effects of codutide in an obese mouse model, emphasizing epididymal white adipose tissue (EWAT), inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress. Cotadutide disrupted body mass and glucose intolerance/insulin resistance and increased insulin sensitivity in obese mice. In addition, codutide had beneficial effects on plasma markers leptin, adiponectin, monocyte chemoattractant protein 1, resistin, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha, and pro-inflammatory and ER stress markers in BAT. Cotadutide also had effects considered on the related aspects of the TABe, with reduction of markers related to hypertrophy, adipocyte perspective and apoptosis. In conclusion, in obese mice, codutide leads to weight loss and controls insulin resistance, with improvement in insulin sensitivity. Cotadutide absorbed inflammatory cytokines from adipose tissue, as well as ER stress, with reduced adipocyte hypertrophy and apoptosis. These effects are very satisfactory in the treatment of DM2 and associated obesity, which indicate positively for its use as a drug in preclinical analysis.

Keywords: GLP-1/Glucagon dual agonism. Inflammation. Adipocyte. Molecular analysis. Mice.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Peso corporal.....	26
Gráfico 2 –	Teste oral de tolerância à glicose	28
Gráfico 3 –	Dados do tecido adiposo branco epididimário	29
Gráfico 4 –	Expressões gênicas do metabolismo lipídico do TABe.....	30
Gráfico 5 –	Expressões gênicas da matriz extracelular do TABe.....	30
Gráfico 6 –	Expressões dos genes inflamatórios do TABe.....	31
Gráfico 7 –	Apoptose do TABe e expressões gênicas do estresse do RE.....	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Obesidade e inflamação no TAB.....	15
Figura 2 –	Desenho dos grupos experimentais.....	19
Figura 3 –	Divisão dos grupos experimentais para administração da cotadutida.....	21
Figura 4 –	Sequência dos primers.....	25
Figura 5 –	Resumo gráfico	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e conteúdo energético das dietas	20
Tabela 2 – Biometria e bioquímica Média±DP, $P<0,05$ quando $a\neq C$, $b\neq HF$	27
Tabela 3 – Análise de variância de dois fatores	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Dieta Controle
CC	C+Cotadutida
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
COT	Cotadutida
CT	Colesterol Total
DIO	Obesidade Induzida por Dieta
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DNAse	Desoxirribonuclease
DPP-IV	Dipeptidil Peptidase IV
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FIRi	Índice de Resistência à Insulina em Jejum
GLP1	Pepitídeo Similar ao Glucagon 1
GR	Glucagon
HF	Dieta Hiperlipídica
HFC	HF+Cotadutida
MEC	Matriz Extracelular
mRNA	RNA mensageiro
OXM	Hormônio Intestinal Oxintomodulina
PBS	Tampão Fosfato Salino
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
QUICKi	Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina
RE	Retículo Endoplasmático
RI	Resistência à Insulina
RNA	Ácido Ribonucleico
TAB	Tecido Adiposo Branco

TABe	Tecido Adiposo Branco Epididimário
TABs	Tecido Adiposo Branco Subcutâneo
TABv	Tecido Adiposo Branco Visceral
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
UCP1	Proteína Desacopladora 1

LISTA DE SÍMBOLOS

n	Número
±	Mais ou menos
°C	Graus celsius
h	Hora
%	Porcentagem
nmol	Nanomol
kg	Kilograma
pH	PH
mg	Miligrama
rpm	Rotação por minuto
mol	Mol
L	Litro
µm	Micrômetro
g	Grama
log	Logarítimo
µU	Microunidade
mL	Mililitro
dL	Decilitro
µg	Micrograma
Δ	Delta
<	Menor que
>	Maior que
+	Mais
–	Menos
vs	Versus

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	Animais e dietas	19
2.2	Tratamento com cotadutida	20
2.3	Peso corporal, consumo alimentar e energético	21
2.4	Coleta de sangue e extração de tecidos	22
2.5	Análise bioquímica	22
2.6	Teste oral de tolerância à glicose, resistência à insulina (FIRi) e sensibilidade à insulina (QUICKi)	23
2.7	Área transversal média dos adipócitos	23
2.8	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (q-PCR)	24
2.9	Análise estatística	24
3	RESULTADOS	26
3.1	Peso corporal, ingestão de alimentos e energia	26
3.2	Triacilglicerol, colesterol total, adiponectina e leptina	27
3.3	Glicemia de jejum, insulina, FIRi e QUICKi	28
3.4	Perfil inflamatório (análises plasmáticas)	28
3.5	Tamanho dos adipócitos e massa do coxim de TABe	29
3.6	Metabolismo lipídico	29
3.7	Matriz extracelular	30
3.8	Perfil inflamatório (expressão gênica)	31
3.9	Estresse do retículo endoplasmático, apoptose e proliferação celular	32
3.10	ANOVA de dois fatores: dieta e cotadutida	33
4	DISCUSSÃO	35
	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética	46

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, prevalente em adolescentes e adultos que está com crescente incidência no mundo ocidental (Bluher, 2019). Classificada como uma epidemia global, a obesidade gera um grande problema de saúde pública por prejudicar a qualidade de vida e produzir um ônus econômico significativo aos sistemas de saúde (Okunogbe et al., 2022).

O armazenamento do excesso de lipídios decorrente da supernutrição expande e remodela os depósitos adiposos que passam a ser disfuncionais, promovendo deposição de gordura em tecidos ectópicos, inflamação tecidual, resistência à insulina e disfunção metabólica progressiva (Maharjan et al., 2021).

O tecido adiposo possui duas formas principais, tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB é composto por grandes adipócitos uniloculares e poucas mitocôndrias, relacionado à lipólise, lipogênese e armazenamento de energia através do triacilglicerol. Além de secretar diversas citocinas e hormônios capazes de regular múltiplos processos fisiológicos, homeostáticos e imunes (Sakers et al., 2022), possui papel chave no desenvolvimento de doenças adversas associadas à obesidade como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e câncer (Aaseth et al., 2021).

O TAM é formado por adipócitos multiloculares, altamente vascularizados e ricos em mitocôndrias (Pilkington et al., 2021). Escasso em humanos adultos, mas abundante em recém-nascidos e roedores nas regiões interescapular e perirrenal, o TAM se diferencia por ser especializado em dissipar energia na forma de calor (termogênese), em que a proteína desacopladora 1 (UCP1) cataboliza a energia armazenada, promovendo aumento do gasto energético e perda de peso (Yuko e Saito, 2021; Zhang et al., 2021). Além disso, adipócitos marrons secretam adipocinas especiais, conhecidas como batocinas, que têm funções metabólicas significativas (Martins et al., 2022b).

TAB e TAM possuem plasticidade para alterar sua estrutura e metabolismo conforme o estado fisiológico e as condições ambientais do organismo, transdiferenciando-se de forma reversível (Cinti, 2018). Logo, quando há alta demanda termogênica, depósitos do TAB subcutâneo (TABs) podem apresentar o “escurecimento” de adipócitos, devido ao aumento do conteúdo em mitocôndrias, gerando adipócitos beges, termogênicos (Pilkington et al., 2021).

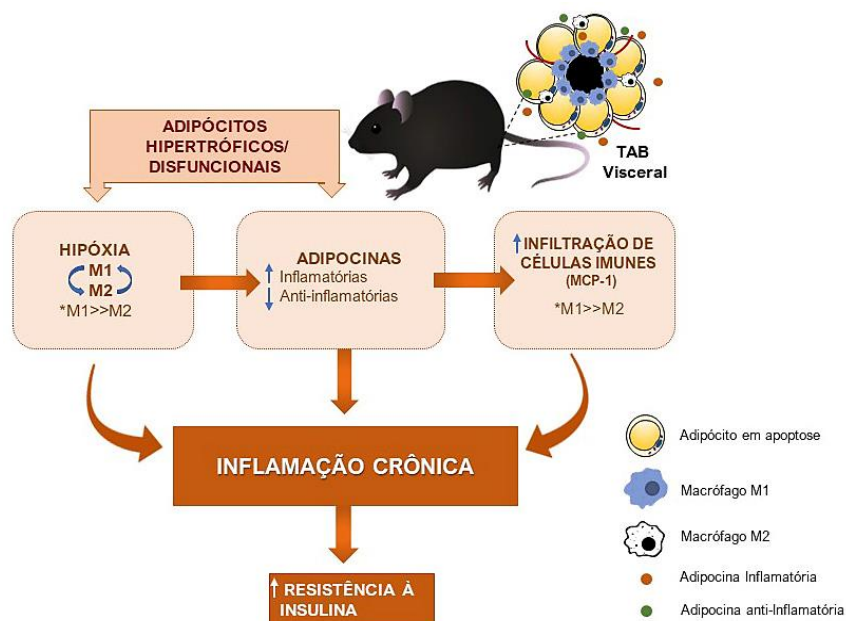
O TAB visceral (TABv) tem associação com o metabolismo e a inflamação (Kawai et al., 2021). Isso ocorre porque os depósitos de gordura visceral são metabolicamente mais ativos e sensíveis ao estímulo lipolítico, relacionados à síndrome metabólica (Ibrahim, 2010).

Em roedores, identificamos o TABs e TABv (com distribuição perigonadal, epididimário em machos e periovariano em fêmeas) (Borges et al., 2020; Mandarin-de-Lacerda et al., 2021). O TABv epididimário se localiza na parte inferior do abdome, conectado ao epidídimo, sendo a porção adequada e mais utilizada em camundongos machos para a avaliação de citocinas e marcadores pró-inflamatórios (Chusyd et al., 2016; Mandarin-de-Lacerda et al., 2021)

Camundongos C57BL/6 submetidos ao consumo crônico de dieta hiperlipídica constituem um modelo muito frequente em estudos de obesidade com o olhar translacional para a doença em humanos (Lutz e Woods, 2012). Portanto, camundongos C57BL/6 com dieta hiperlipídica aumentam a lipogênese, o que resulta em dislipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina/DM2, obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica (Fraulob et al., 2010; Reis-Barbosa et al., 2022b).

Ao atingirem seu limite de expansão celular e tecidual, os adipócitos respondem ao estresse promovendo inflamação, fibrose, hipóxia, secreção alterada de adipocinas e disfunção mitocondrial (Figura 1).

Figura 1 – Obesidade e inflamação no TAB



A expansão patológica do TAB induz a deposição ectópica de gordura em outros tecidos e nos depósitos viscerais, processo definido como lipotoxicidade, que está relacionado a resistência à insulina sistêmica. A hipertrofia excessiva promove hipóxia devido à insuficiência vascular, reduzindo a oxigenação dos depósitos de gordura. Este processo intensifica a secreção de adipocinas inflamatórias e diminui a expressão da adiponectina e do fator de regulação induzível de hipóxia (Figura 1) (Longo et al., 2019).

A má oxigenação do TAB inicia e sustenta a inflamação crônica de baixo grau, além de promover o estresse do retículo endoplasmático (RE) e produção de espécies reativas de oxigênio (Nono Nankam et al., 2021; Taherkhani et al., 2021). A consequente apoptose dos adipócitos induz a infiltração e acúmulo de macrófagos no TAB, sendo observadas estruturas em forma de coroa ao redor dos adipócitos e a polarização dos macrófagos residentes para um fenótipo pró-inflamatório (M1) que expressa óxido nítrico (Martins et al., 2022a).

As estratégias clínicas para o tratamento da obesidade incluem dieta, exercícios, cirurgia bariátrica e uso de medicamentos promotores do gasto energético e da saciedade (Bartesaghi et al., 2022; Conlon et al., 2022). Os agonistas de peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) têm crescido na indicação ao tratamento do DM2 e obesidade devido seus efeitos anorexígenos e hipoglicemiantes (Vianna et al., 2016; Davies et al., 2021).

Os agonistas duplos, nova classe de agentes terapêuticos, têm ganhado importância porque apresentam potencial superior ao monoagonismo GLP-1 no controle da obesidade. Há vários potenciais agonistas duplos e triplos que foram recentemente autorizados, ou estão em análise pela Food and Drug Association dos Estados Unidos, entre os quais a Cotadutida (Spezani e Mandarim-de-Lacerda, 2022).

O hormônio intestinal Oxintomodulina (OXM) é produzido pelas células L no intestino delgado, provendo uma ação balanceada dos receptores GLP-1 e glucagon, atuando como duplo agonista desses receptores (Holst et al., 2018; Nielsen et al., 2020). Como resultado, a OXM aumenta o gasto energético, inibe o apetite e induz a perda de massa corporal em indivíduos obesos. Entretanto, sua meia-vida curta (~10 min) limita sua utilização clínica (Scott et al., 2018) pois necessitaria ser administrada várias vezes ao dia. Por isso, análogos da OXM resistentes à dipeptidil peptidase IV foram desenvolvidos (Ambery et al., 2018).

O acetato de cotadutida (COT) é um exemplo de duplo agonista GLP-1/GR em desenvolvimento (estudo em fase 2), que opera de forma semelhante a OXM na glicemia, gasto energético e perda de peso, com meia vida estendida devido a modificações químicas que viabilizam sua administração uma vez ao dia (Henderson et al., 2016). Sendo indicado

para o tratamento de obesidade, esteatohepatite não alcoólica e doença renal crônica associada ao DM2 (Nahra et al., 2021).

Os mecanismos de ação da COT no metabolismo energético e no apetite ainda não são completamente conhecidos, o que indica a necessidade de mais estudos. A hipótese deste trabalho é que a COT aumenta o gasto energético e diminui o consumo alimentar promovendo balanço energético negativo e diminuição da massa corporal, com alterações na estrutura e fisiologia do TAB. Logo, a COT (agonista GLP-1/glucagon), indicado para o tratamento do diabetes do tipo 2, pode ter efeito benéfico no tecido adiposo branco, com redução de marcadores inflamatórios e do estresse do retículo endoplasmático, que são fatores frequentes na obesidade.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da COT em modelo de camundongo obeso, enfatizando o metabolismo do tecido adiposo branco epididimário.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a alteração da massa corporal;
- b) Realizar dosagens plasmáticas: colesterol total, triacilglicerol, insulina, adiponectina, leptina, IL-6, MCP1, Resistina e TNF-alfa;
- c) Avaliar metabolismo de glicose;
- d) Calcular a massa e a área transversal média dos adipócitos epididimário;
- e) Avaliar a expressão gênica da via lipídica, inflamatória, apoptótica, proliferativa e do estresse do retículo endoplasmático por qPCR.

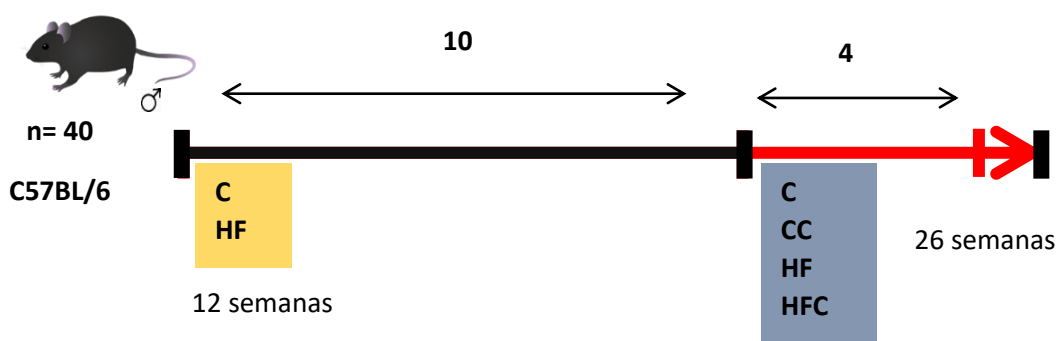
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e dieta

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal local (protocolo CEUA nº 002/2021) e os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas para testes em animais (NHI Pub. No. 85-23, revisado em 1996) e as recomendações ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020). Os animais foram mantidos em caixas ventiladas em condições controladas (20 ± 2 °C, ciclo claro/escuro 12h/12h) e livre acesso a água e comida (Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

Camundongos machos C57BL/6 com três meses de idade (n=40) foram divididos aleatoriamente em dois grupos e mantidos por 10 semanas (Figura 2) consumindo dieta controle (n=20, C, 10 % de energia de lipídios, 14 % de proteínas e 76 % de carboidratos) ou dieta hiperlipídica (n=20, HF, 50 % de energia de lipídios, 14 % de proteína e 36 % de carboidratos). Os ingredientes foram incorporados ao preparo das dietas, sendo as dietas fabricadas pela PragSoluções (Jaú, SP, Brasil) seguindo as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN93M) (Reeves et al., 1993; Aguila et al., 2021). A Tabela 1 fornece detalhamento da composição das dietas.

Figura 2 – Desenho dos grupos experimentais



Legenda: Grupos C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida.
Fonte: A autora, 2023

Tabela 1 – Composição e conteúdo energético das dietas

Ingredientes (g/kg)	Dietas	
	C	HF
Caseína (85% proteína)	140	175
Amido de milho	620.7	348.0
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha	-	238
Fibra	50	50
Mistura de vitaminas	10	10
Mistura mineral	35	35
Cisteína	1.8	1.8
Colina	2.5	2.5
Antioxidante	0.008	0.008
Total (g)	1.000	1.000
Energia (kJ/kg)	15 916	20 920
Carboidratos (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lípido (%)	10	50

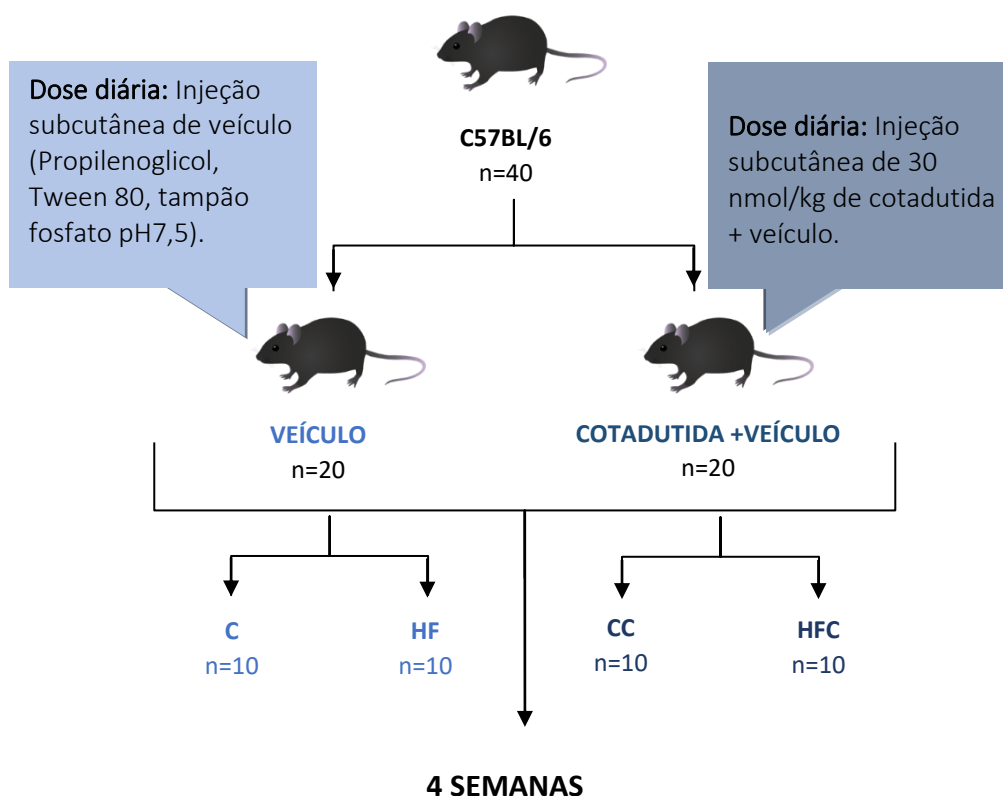
Legenda: dieta controle (C) e hiperlipídica (HF).
 Fonte: Adaptado de Aguila et al., 2021.

2.2 Tratamento com Cotadutida

A COT (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, EUA) foi administrada diariamente por via subcutânea na dosagem de 30 nmol/kg, durante quatro semanas. Os grupos não tratados receberam um volume igual de veículo (Propilenoglicol, Tween 80, tampão fosfato pH 7,5) por via subcutânea (Figura 2). A dose de COT foi escolhida baseada em uma investigação anterior (Henderson et al., 2016) na qual foram comparadas doses de 10 nM/kg e 30 nM/kg. Assim, em camundongos obesos tratados por 30 dias com COT, os resultados do teste de tolerância à glicose foram semelhantes para ambas as doses, enquanto o peso corporal foi reduzido em 30 % e 21 % com as doses de 30 nM/kg e 10 nM/kg, respectivamente. Portanto,

para maximizar as respostas metabólicas à COT, escolheu-se a dose de 30 nM/kg e tratamento de 30 dias. De acordo com a referência citada, esta dose está na faixa segura em termos de tolerabilidade pelos animais. Em humanos a segurança e o perfil farmacocinético da COT suportam dosagem uma vez ao dia de doses inferiores a 150 µg, que podem ser seguidas por uma titulação para doses mais altas até 300 µg (Ambery *et al* 2018; Ali *et al*, 2022).

Figura 3 - Divisão dos grupos experimentais para administração da cotadutida



Legenda: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida.
Fonte: A autora, 2023

2.3 Peso corporal, consumo alimentar e energético

O peso corporal (PC) foi medido semanalmente (sexta-feira ao meio-dia). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente, determinando a diferença entre a dieta colocada nas

gaiolas e a dieta restante após 24h. A ingestão energética foi estimada como o produto da ingestão alimentar e a energia da dieta.

2.4 Coleta de sangue e extração de tecidos

Animais foram anestesiados após seis horas de jejum (Ketamina, 240 mg/kg, Xilazina, 30 mg/kg). O sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma foi separado por centrifugação (712 rpm, 15min). Depósitos do TABe foram dissecadas, pesados e preparados para microscopia de luz e análise molecular (armazenada a -80°C). Para microscopia, os fragmentos foram fixados em formalina tamponada (formaldeído 1,27 mol/L em 0,1 tampão fosfato e pH 7,2) e incluídos em Paraplast plus (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os blocos foram seccionados com 5 μm de espessura e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina.

2.5 Análise bioquímica

Usamos a tecnologia Multiplex Biomarker da Luminex xMAP (MMHMAG-44 K-08, Millipore, Billerica, MA, EUA) para medir IL-6, Insulina, MCP1, Resistina e TNF-alfa. Além disso, triacilglicerol (TAG) e colesterol total (CT) foram medidos com kits comerciais (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). Usamos ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática, Millipore, Merck, Temecula, CA, EUA) para medir insulina (EZRMI-13K), leptina (EZML-82K) e adiponectina (EZMADP-60K) com o leitor ELX800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA)

2.6 Teste oral de tolerância à glicose, resistência à insulina (FIRi) e sensibilidade à insulina (QUICKi)

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi obtido antes (semana 10) e após (semana 14) o tratamento. Inicialmente, os animais ficaram em jejum por seis horas e tiveram o sangue coletado da veia da cauda e a glicemia foi medida (glicômetro AccuChek, Roche, SP, Brasil). Finalmente, os animais receberam sobrecarga com solução de glicose a 25 %, 2 g/kg por gavagem orogástrica, tendo o sangue coletado nos tempos 15, 30, 60 e 120 min para medição da glicemia. Por fim, foram analisadas as curvas de evolução da glicemia e as respectivas áreas sob as curvas (GraphPad Prism v. 9.4.1 for Windows, San Diego, CA, EUA).

Além disso, calculamos o índice de resistência à insulina em jejum ($FIRi = (glicemia \text{ de jejum} \times insulina \text{ de jejum})/25$) (Duncan et al., 1995) e o índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina ($QUICKi = 1 / (\log(I0) + \log(G0))$), sendo I0 a insulina em jejum (em $\mu U/mL$), e G0 a glicemia de jejum (em mg/dL) (Katz et al., 2000).

2.7 Área transversal média dos adipócitos

Analisou-se em lâminas coradas com hematoxilina e eosina, cinquenta adipócitos aleatoriamente em cada grupo, em imagens digitais obtidas de cortes não consecutivos do TABe (microscópio Leica DMRBE, Wetzlar, Alemanha, câmera Infinity 5.1, Lumenera, Ottawa, Canadá). Resumidamente, a densidade de volume dos adipócitos ($Vv [adip]$) foi obtida por contagem de pontos na tela do sistema digital, analisada com o software STEPanizer 1.0, a densidade numérica de adipócitos por área ($QA [adip]$) em contagem numa área-teste conhecida (considerando as linhas de exclusão)(Gundersen, 1977).

A área média dos adipócitos ($\Theta[adip]$) foi determinada pela relação entre $Vv [adip]$ e o dobro da $QA [adip]$ (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Mandarim-de-Lacerda e Del-Sol, 2017):

$$\theta = \frac{Vv[adip]}{2. Q_A[adip]}$$

2.8 Reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase (RTqPCR)

O RNA foi extraído após homogeneização de 30 mg de TABe e adição de Trizol (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Primeiro, 1 µg de RNA tratado com DNase I foi quantificado (Nanovue Spectroscopy, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA). Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA mensageiro (mRNA) das amostras usando o primer oligo para mRNA e Transcriptase Reversa Superscript III (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Os genes alvo estão indicados na Figura 4. Em seguida, os genes e Sybergreen Mix foram adicionados ao cDNA e analisados com o termociclador CFX96 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) para quantificar a reação em cadeia da polimerase. A expressão de cada gene alvo foi normalizada usando a proteína de ligação a TATA (TBP) como controle endógeno. A razão de expressão de mRNA foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $-\Delta CT$ significa a diferença entre o número de ciclos do gene alvo e o controle endógeno (Rao et al., 2013).

2.9 Análise estatística

Primeiro confirmou-se a distribuição normal dos dados (teste Shapiro-Wilk para amostras pequenas) e a homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). Em seguida, apresentou-se a média e o desvio padrão dos resultados. As diferenças entre os dois grupos foram analisadas com o teste t de Student e correção de Welch. Finalmente, com quatro grupos, as diferenças foram testadas com análise de variância (ANOVA) de dois fatores e pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o P-valor $<0,05$ (GraphPad Prism v.9.4.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Figura 4 - Sequências dos primers

Primers	Forward	Reverse
<i>Adipoq</i>	GTAGGTGAAGAGAACGGCCT	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Bcl2</i>	CTTCAGGGATGGGGTGAAC	ATCTCCCTGTTGACGCTCTC
<i>Casp3</i>	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC
<i>Chop</i>	CTGCCTTTTACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Col6a3</i>	GCAATGCATGAGACCCTCTG	ACTCAAGGCCCTTCTGACTC
<i>Fabp4</i>	GCGTAAATGGGGATTTGGTC	CTCCTGTCTGCTGCGGTGATT
<i>Fasn</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGT AT
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTCGTCACCAGCACACAGT
<i>Has2</i>	TGTGAGAGGTTTCTATGTGTCCT	ACCGTACAGTCCAAATGAGAAGT
<i>Il6</i>	TTCTTGGGACTGATGCTGGT	CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA
<i>Lep</i>	CCTGTGGCTTTGGTCCTATC	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
<i>Pparg</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
<i>Tbp</i>	CAAACCTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCCAGAGC
<i>Tnfa</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

Legenda: *Adipoq*, Adiponectina; *Atf* Fator ativador de transcrição; *Bcl*, Linfoma de células B; *Casp*, Caspase; *Chop*, *Col6a3*, Colágeno tipo 6, cadeia alfa 3; *Has2*, Hialuronano sintase 2; *Lep*, Leptina; Proteína homóloga a C/EBP; *Fabp*, Proteína de ligação de ácidos graxos; *Fas*, Ácido graxo sintase; *Gadd*, Parada de crescimento e dano ao DNA; *Il*, Interleucina; *Ppar*, Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; *Tbp*, Proteína de ligação a TATA; *Tnf*, Fator de necrose tumoral.

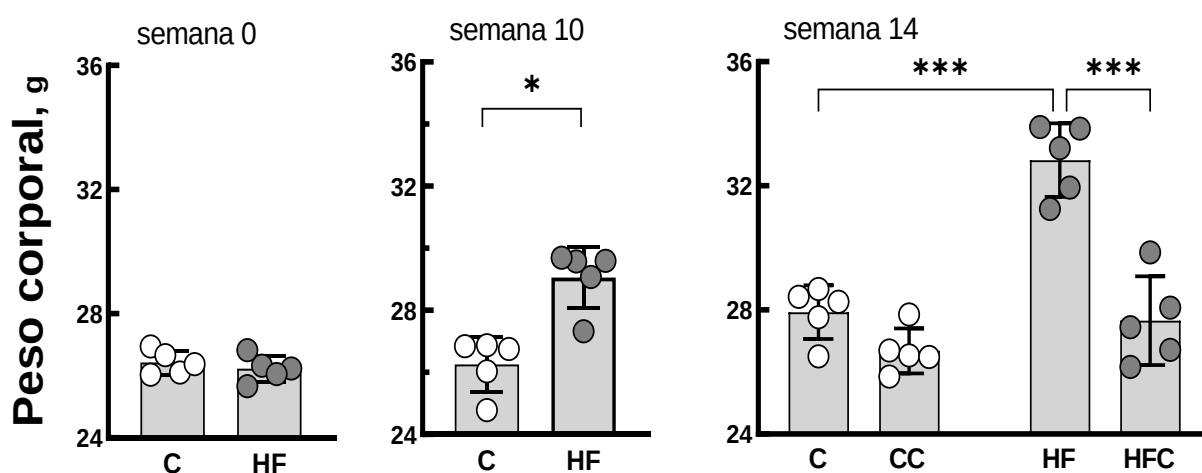
Fonte: A autora, 2023.

3 RESULTADOS

3.1 Peso corporal, ingestão de alimentos e energia

Os animais iniciaram a pesquisa sem diferença no peso corporal. No entanto, este aumentou após 10 semanas de experimentação sendo maior no grupo HF que no grupo C (+11 %), permanecendo maior até a 14ª semana (+18 %). Após o tratamento, o grupo HFC apresentou redução do peso corporal em relação ao grupo HF (−16 %) (Figura 3). A ingestão alimentar foi menor, mas com maior ingestão energética no grupo HF comparado ao grupo C. A COT não alterou a ingestão alimentar ou energética nos animais (Tabela 3).

Gráfico 1- Peso corporal



Legenda: Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2023.

3.2 Triacilglicerol, colesterol total, adiponectina e leptina

TAG (+12 %) e CT (+21 %) foram maiores no grupo HF do que no grupo C, mas reduzidos em HFC vs. HF (TAG, −12 %; CT, −15 %) (Tabela 3).

Adiponectina foi menor no grupo HF vs. C (–44 %) e maior em HFC vs. HF (+43 %). A leptina foi maior no grupo HF vs. C (+156 %) e reduzida em CC vs. C (–51 %) e HFC vs. HF (–45 %) (Tabela 3).

Tabela 2 - Biometria e bioquímica. Média±DP, $P<0,05$ quando ^a≠C, ^b≠HF

Dados	C	CC	HF	HFC
Ingestão de alimentos,				
g/dia/animal				
• 10 ^a semana, n=20	2,9±0,23		2,7±0,33 ^a	
• 14 ^a semana, n=10	3,0±0,06	3,0±0,01	2,7±0,33 ^a	2,6±0,22
Ingestão de energia,				
kJ/dia/animal				
• 10 ^a semana, n=20	46,1±3,64		56.0±6.89 ^a	
• 14 ^a semana, n=10	47,4±0,98	47,5±0,13	55.6±6.82 ^a	54,5±4,52
Plasma, n=5/grupo				
Adiponectina, 10 ⁶ pg/mL	13,0±1,51	13,0±1,33	7.3±0.48 ^a	10.4±1.39 ^b
CT, mg/Dl	47,5±3,81	47,8±2,65	57.6±2.76 ^a	48.7±2.30 ^b
Glicemia de jejum mmol/L	6,8±1,07	6,7±0,76	8,2±0,92	7,4±0,45
IL-6, pg/mL	9.0±2.24	11.7±2.02	14.1±2.77 ^a	17,1±2,40
Insulina, pMol/L	11,0±1,54	10.9±1.07	23.9±3.43 ^a	13.5±2.23 ^b
Leptina, 10 ² pg/mL	41,2±6,22	20.2±2.75 ^a	105.4±2.51 ^a	57.7±13.86 ^b
MCP-1, pg/mL	25,0±2,64	31.8±3.26 ^a	32.5±2.76 ^a	31,8±5,04
Resistina, pg/ml	10.1±1.42	9,9±2,02	17.1±2.89 ^a	10,8±0,68 ^b
TAG, mg/dL	284,7±15,61	281,3±18,18	318.0±6.59 ^a	278.6±18.38 ^b
TNF-alfa, pg/mL	3,5±1,20	4.1±1.66	5.0±2.13	3,9±1,39
FIRi	3,0±0,86	2,9±0,58	7.9±1.67 ^a	4.0±0.69 ^b
QUICKi	0,5±0,03	0,5±0,03	0,4±0,02 ^a	0,5±0,02 ^b

Legenda: FIRi, resistência à insulina em jejum; IL, interleucina; MCP, proteína quimioatraente de monócitos; QUICKi, índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina; TAG, triacilglicerol; CT, colesterol total; TNF, fator de necrose tumoral. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida.

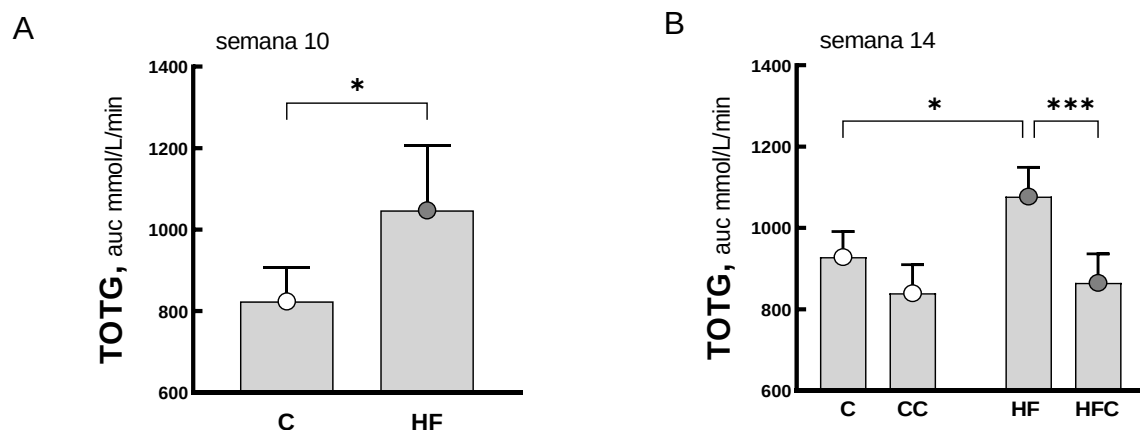
Fonte: A autora, 2023.

3.3 Glicemia em jejum, insulina, FIRi e QUICKi

A glicemia em jejum não foi diferente entre os grupos. No entanto, houve intolerância oral à glicose no grupo HF na 10ª semana comparado ao grupo C, que durou até a 14ª semana. A COT restaurou a tolerância à glicose em HFC vs. HF (Figura 4).

Houve hiperinsulinemia no grupo HF vs. C (+115 %), que foi reduzida pela COT em HFC vs. HF (−45 %). O FIRi foi maior em HF vs. C (+157 %), mas menor em HFC vs. HF (−50 %). Consequentemente, o QUICKi diminuiu no grupo HF vs. C (−18 %), mas aumentou em HFC vs. HF (+15 %) (Tabela 3).

Gráfico 2 - Teste oral de tolerância à glicose



Legenda: A - TOTG, semana 10; B - TOTG, semana 14. Os dados são média ± SD. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. Fonte: A autora, 2023.

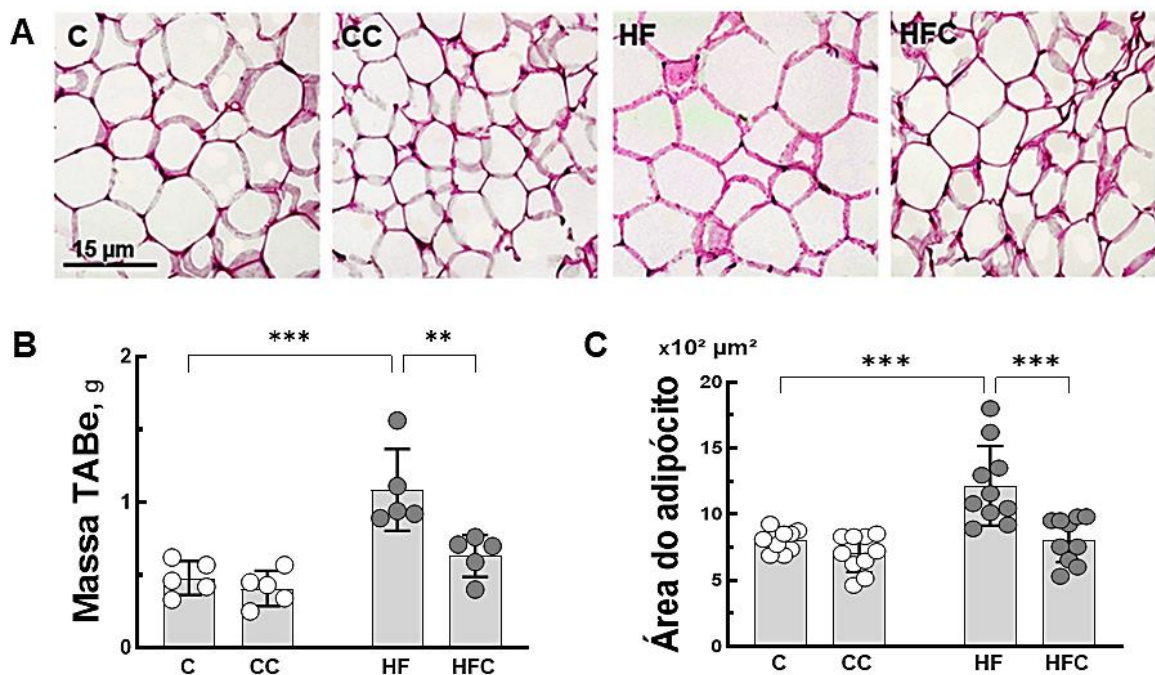
3.4 Perfil inflamatório (dosagens plasmáticas)

MCP-1 (+30 %), resistina (+70 %) e IL6 (+60 %) apresentaram valores plasmáticos maiores no grupo HF em comparação com o grupo C. A COT não alterou os valores de MCP-1 e IL6, mas diminuiu a resistina (HFC vs. HF, −37 %). TNF-alfa não se alterou nos grupos (Tabela 3).

3.5 Tamanho dos adipócitos e massa do coxim de TABe

Observou-se adipócitos hipertrofiados no grupo HF em comparação com o grupo C, que foram diminuídos pela COT (Figura 5A). A massa do TABe aumentou no grupo HF vs. C (+125 %) e diminuiu em HFC vs. HF (–40 %) (Figura 5B). A área seccional média dos adipócitos foi maior em HF vs. C (+50 %), mas diminuiu em HFC vs. HF (–35 %) (Figura 5C).

Gráfico 3 - Dados do tecido adiposo branco epididimário



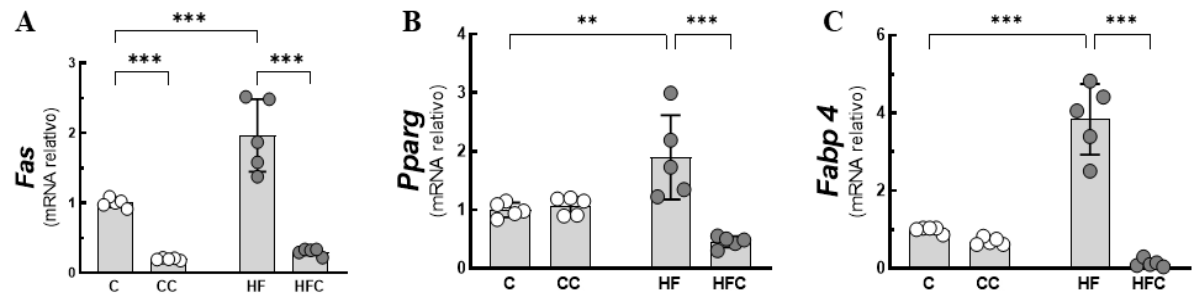
Legenda: A – Adipócitos representativos (fotomicrografias com a mesma ampliação, coloração de hematoxilina e eosina); B – massa do TABe; C – Área média dos adipócitos em corte transversal. Os dados são média ± SD. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2023.

3.6 Metabolismo lipídico

Fas (+97 %), *Pparg* (+90 %) e *Fabp4* (+264 %) aumentaram no grupo HF vs. C, mas foram reduzidos em HFC vs. HF (Figura 6A-C).

Gráfico 4 - Expressões gênicas do metabolismo lipídico do TABe



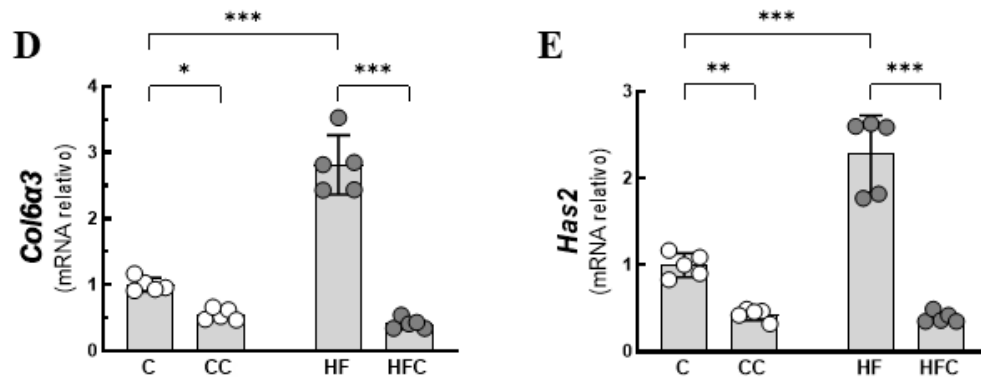
Legenda: A – *Fas*, Ácido graxo sintase; B- *Pparg*, receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma; C *Fabp4*, proteína de ligação a ácidos graxos; D - *Col6a3*, collagenase 6; E – *Has2*, hialuronano sintase 2. Os dados são média $\pm$ desvio padrão. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2023.

3.7 Matriz extracelular

As expressões de *Col6a3* (+180 %) e *Has2* (+130 %) cresceram em HF vs. C, mas foram menores em HFC vs. HF: *Col6a3* (–85 %) e *Has2* (–83 %) (Figura 6D-E).

Gráfico 5 - Expressões gênicas da matriz extracelular do TABe



Legenda: D - *Col6a3*, collagenase 6; E – *Has2*, hialuronano sintase 2. Os dados são média $\pm$ desvio padrão.

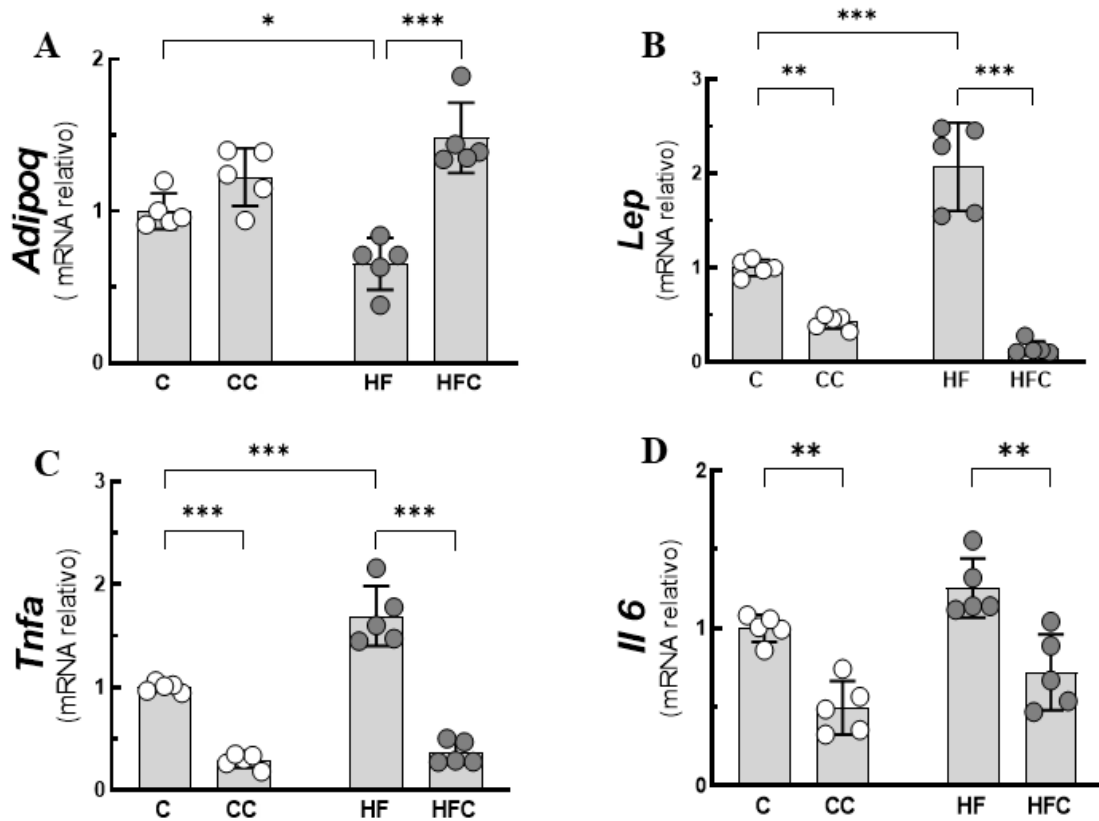
Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2023.

3.8 Perfil inflamatório (expressão gênica)

A expressão do gene da *Adipoq* foi menor no grupo HF em comparação com o grupo C (–35 %), mas aumentou em HFC vs. HF (+130 %) (Figura 7A). *Lep* (+107 %) e *Tnfa* (+69 %) também foram aumentados em HF vs. C, e diminuídos em HFC vs. HF (*Lep*, –93 %; *Tnfa*, –79 %) (Figuras 7B-C). O grupo HF não apresentou aumento na expressão do gene *Il6* em relação ao grupo C. No entanto, a COT diminuiu *Il6* em HFC vs. HF (–42 %) (Figura 7D).

Gráfico 6 - Expressões dos genes inflamatórios do TABe



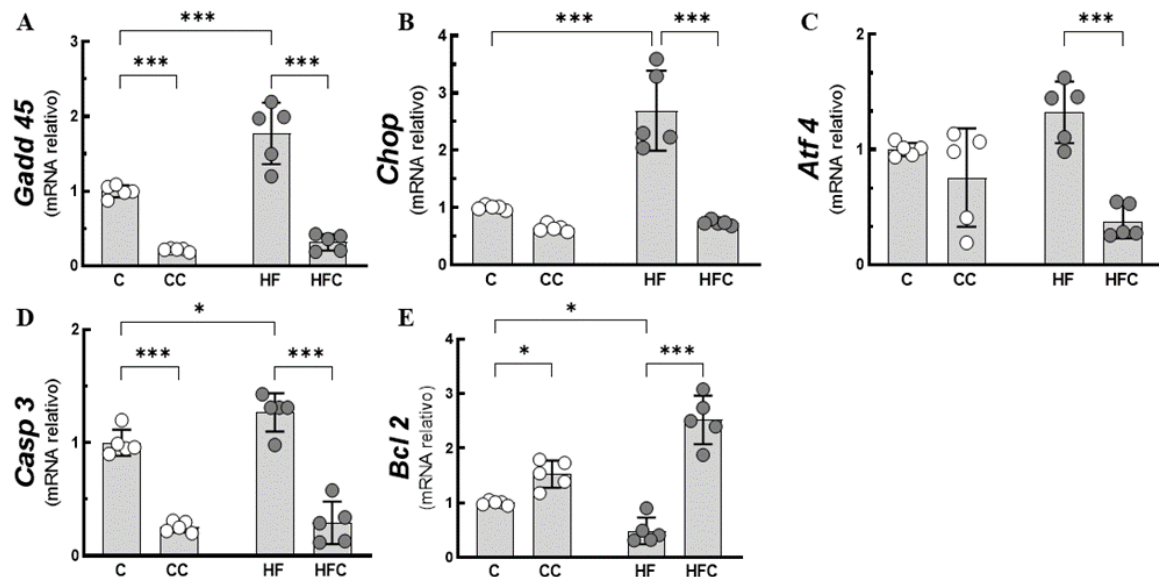
Legenda: A – *Adipoq*, adiponectina; B – *Lep*, leptina; C – *Tnfa*, fator de necrose tumoral alfa; D – *Il6*, interleucina 6. Os dados são média $\pm$ desvio padrão. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2023

3.9 Estresse do retículo endoplasmático, apoptose e proliferação celular

As expressões dos genes *Gadd45* (+142 %, Figura 8A) e *Chop* (+183 %, Figura 8B) foram alteradas em HF vs. C, exceto *Atf4* (Figura 8C). No entanto, a COT diminuiu todas essas expressões em HFC vs. HF. Em HF vs. C, *Casp3* foi aumentada (+27 %, Figura 8D), e *Bcl2* foi diminuído (–50 %, Figura 8E). No entanto, em HFC vs. HF, *Casp3* (–77 %) e *Bcl2* (+419 %) foram reduzidas.

Gráfico 7 - Apoptose do TABe e expressões gênicas do estresse do RE



Legenda: A - *Gadd45*, parada de crescimento e indução de dano ao DNA; B - *Chop*, ativador do fator de transcrição 4; C - *Atf4*, proteína homóloga a C/EBP; D - *Casp3*, caspase 3; E - *Bcl2*, linfoma de células B2. Os dados são média $\pm$ SD. Grupos: C, controle; HF, *high-fat*; CC, controle e cotadutida; HFC, *high-fat* e cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2022

3.10 ANOVA de dois fatores: dieta e cotadutida

Os resultados da ANOVA de dois fatores (dieta, cotadutida e interação entre dieta e cotadutida) são mostrados na Tabela 4. O primeiro bloco de dados incluiu 17 análises relativas à biometria, alimentação, ingestão energética e análises plasmáticas. O segundo bloco de dados refere-se a 14 expressões gênicas no TABe.

No primeiro bloco de dados a dieta foi responsável por alterar 16 medidas (94 %), a COT e a interação entre dieta e COT alterou 12 medidas (71 %).

No segundo bloco de dados a dieta alterou 10 genes (71 %), a COT alterou todos os genes (100 %) e houve interação entre dieta e COT em 12 genes (86 %).

Tabela 3 – Análise de variância de dois fatores (continua)

Dados	% da variação e significância do teste.					
	Dieta		Cotadutida		Dieta vs. Cotadutida	
	%	P-valor	%	P-valor	%	P-valor
Adipócito	23,4	<0,001	22,8	<0,001	8,1	0,02
Adiponectina	63,8	<0,001	9,37	0,01	8,5	0,01
Colesterol total	31,2	<0,001	19,1	0,005	21,4	0,003
Consumo alimentar	67,4	<0,001	3,09	ns	3,6	ns
Consumo energético	49,6	<0,001	0,2	ns	0,3	ns
FIRi	44,2	<0,001	20,1	<0,001	17,9	0,001
Glicemia	31,5	0,01	5,6	ns	3,0	ns
IL-6	51,3	<0,001	15,4	0,02	0,03	ns
Insulina	45,9	<0,001	21,4	<0,001	20,2	<0,001
Leptina	62,5	<0,001	28,5	<0,001	4,3	0,002
Massa corporal	32,4	<0,001	37,8	<0,001	14,5	<0,001
Massa TABe	45,4	<0,001	18,2	0,005	9,5	0,03
MCP1	18,6	0,03	11,9	ns	18,3	0,03
QUICKi	50,1	<0,001	13,3	0,010	11,8	0,01
Resistina	32,2	<0,001	22,6	0,002	19,9	0,003
TNF-alpha	4,4	ns	0,6	ns	6,6	ns
Triacilglicerol	13,1	0,04	25,7	0,007	18,5	0,02

Tabela 3 – Análise de variância de dois fatores (continuação)

Genes						
<i>Adipoq</i>	0,4	ns	58,1	<0,001	19,2	0,002
<i>Atf4</i>	0,1	ns	50,4	<0,001	17,6	0,009
<i>Bcl2</i>	2,3	ns	65,1	<0,001	22,5	<0,001
<i>Casp3</i>	2,7	0,03	88,0	<0,001	1,6	ns
<i>Col6a3</i>	18,1	<0,001	52,6	<0,001	24,6	<0,001
<i>Fabp4</i>	14,6	<0,001	45,1	<0,001	32,6	<0,001
<i>Fas</i>	12,9	<0,001	68,7	<0,001	8,4	0,002
<i>Gadd45</i>	11,1	<0,001	73,5	<0,001	6,6	0,003
<i>Has2</i>	15,4	<0,001	59,9	<0,001	17,4	<0,001
<i>Il6</i>	13,5	0,008	62,5	<0,001	0,04	ns
<i>Lep</i>	6,6	0,002	66,0	<0,001	19,3	<0,001
<i>Pparg</i>	1,3	ns	31,1	<0,001	37,8	<0,001
<i>Tnfa</i>	10,7	<0,001	76,3	<0,001	7,0	<0,001

Fonte: A autora, 2023.

4 DISCUSSÃO

Camundongos obesos induzidos por dieta foram tratados com COT durante 4 semanas, apresentando após o tratamento, perda de peso, melhora na homeostase de glicose, diminuição da resistência e aumento da sensibilidade à insulina, resultados estes que a literatura já conhecia experimentalmente (Henderson *et al.*, 2016). Também observamos redução da inflamação e de reguladores adipogênicos e lipogênicos, acompanhados pela diminuição da massa do TABe, menor área média de adipócitos e atenuação do estresse do RE, sem alteração significativa da ingestão alimentar e consumo energético dos animais tratados.

Quando combinados na dosagem farmacológica correta, GLP-1/Glucagon minimizam o aumento da glicemia, preservando os efeitos lipolíticos e a perda de peso (Sanchez-Garrido *et al.*, 2017). A COT é um duplo agonista que combina a ação hipoglicemiante e anorexígena do GLP-1 (Eriksson *et al.*, 2020) com os efeitos lipolíticos, termogênicos e insulínótropicos do glucagon (Alexiadou e Tan, 2020).

Nosso trabalho demonstrou que a COT promoveu a perda de peso, entretanto seu efeito anorexígeno não resultou em diferença significativa na ingestão alimentar e energética dos animais tratados, como relatado na literatura (Henderson *et al.*, 2016). Esse comportamento alimentar pode ser atribuído ao fato da dieta HF ser mais energética do que a dieta C, causando saciedade. Além de sugerir que o efeito da COT na redução da massa corporal não atua somente através da redução da ingestão alimentar, mas pode estar envolvido também no aumento do gasto de energia, capaz de contribuir para a perda de peso em roedores e humanos (Henderson *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2022).

Apesar do glucagon aumentar a produção hepática de glicose, o agonismo balanceado do GLP-1/Glucagon em uma proporção de aproximadamente 5:1 glp-1 para atividade de glucagon compensou os aumentos induzidos (Parker *et al.*, 2022), controlando a glicemia de camundongos obesos sem prejudicar os níveis de glicose em repouso (Henderson *et al.*, 2016). Em um ensaio clínico de fase 2a a COTA foi eficaz em atenuar a glicemia de jejum e pós-prandial em pacientes com DM2 (Ambery *et al.*, 2018). No presente estudo, os animais do grupo HFC apresentaram redução da tolerância oral à glicose e da resistência à insulina que estava aumentada no grupo HF.

A obesidade leva a uma alteração fenotípica no tecido adiposo, com hipertrofia e geração de novos adipócitos (hiperplasia) (Ghaben e Scherer, 2019). A remodelação do TAB envolve angiogênese, hipóxia e inflamação, que levam a diversas alterações estruturais e

funcionais (Vishvanath e Gupta, 2019). O tamanho, plasticidade e variabilidade dos adipócitos são um desafio para a compreensão da complexidade dos subtipos de adipócitos em diferentes depósitos (Yang Loureiro *et al.*, 2022). A COT afetou a adipogênese, alterando a remodelação do tecido adiposo, reduzindo a massa do TABe e a área de adipócitos de forma paralela à perda de peso. No nível tecidual, os genes *Pparg*, *Fas* e *Fabp4* associados ao metabolismo lipídico, maturação e diferenciação de adipócitos também foram afetados, havendo redução de suas expressões, indicando possível inibição da diferenciação adipogênica e acúmulo de lipídios no TABe (Moseti *et al.*, 2016).

A lipólise basal elevada nos adipócitos hipertróficos prejudica a mobilização de gordura e promove o transbordamento de ácidos graxos livres (AGL) para locais ectópicos, que não são projetados para armazenamento de lipídios (Longo *et al.*, 2019). A hiperlipidemia com níveis elevados de AGL no plasma é uma disfunção metabólica associada com a resistência à insulina (Guo, 2014). Agonistas de GLP-1/Glucagon, em comparação com os monoagonistas GLP-1, têm sido mais eficientes na redução do TAG e CT (Nestor *et al.*, 2022) devido ao efeito adicional do glucagon no gasto de energia e no metabolismo lipídico (Henderson *et al.*, 2016; Darbalaei *et al.*, 2020). Nossos achados em camundongos obesos concordam com esses relatos.

O TABe é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF-alfa, leptina e uma anti-inflamatória como adiponectina (Battineni *et al.*, 2021). A hipertrofia dos adipócitos que ocorre na obesidade induz à liberação de adipocinas que estimulam o sistema imunológico em um fenótipo pró-inflamatório (Saltiel e Olefsky, 2017) afetando a secreção de citocinas, metabolismo dos adipócitos e sensibilidade à insulina (Stolarczyk, 2017). Nossos dados foram coerentes com os de indivíduos obesos que apresentam aumento da TNF-alfa, IL-6, leptina, resistina (Li *et al.*, 2020) e níveis reduzidos de adiponectina (Engin, 2017), promovendo uma resposta inflamatória persistente e de baixo grau (Unamuno *et al.*, 2018). Os resultados atuais destacaram o efeito benéfico da COT na restauração da leptina, resistina e adiponectina em camundongos obesos.

A matriz extracelular (MEC) do tecido adiposo de camundongos regula a função dos adipócitos e a sensibilidade à insulina em condições fisiopatológicas (Guglielmi *et al.*, 2015). A MEC de camundongos expressa colágeno VI, que libera endotropina como produto de clivagem (Col6a3), aumentando citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina, fibrose, acúmulo anormal de lipídios e diminuição da fosforilação da lipase hormônio sensível (Zhao *et al.*, 2016). Além disso, o glicosaminoglicano hialuronan é associado à migração celular, inflamação e adipogênese. A isoforma de hialuronan Has2 é abundante em camundongos

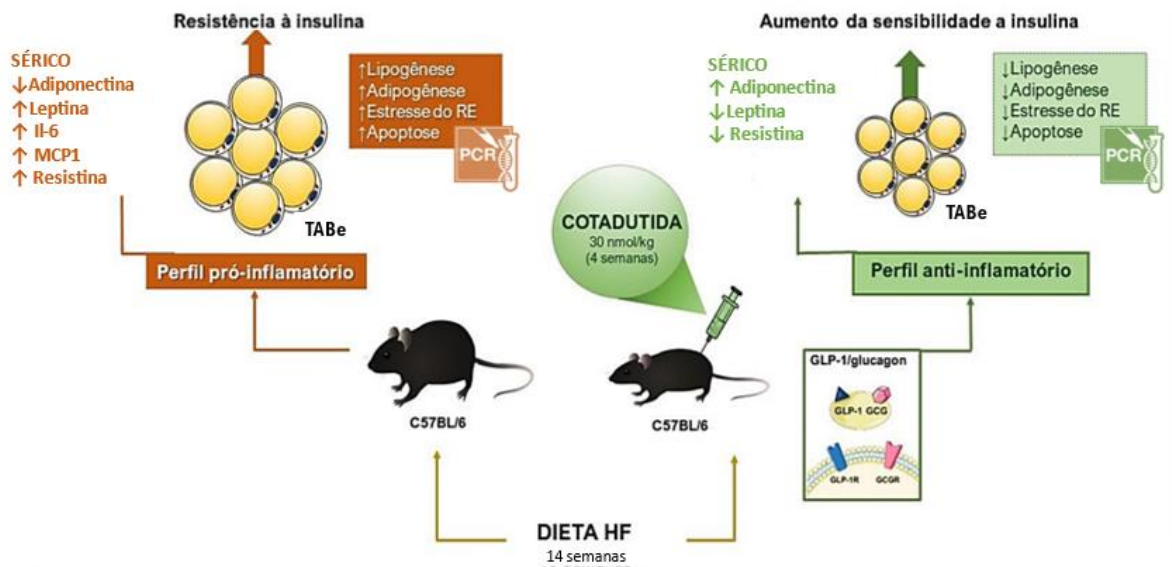
(Caon *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021) e tem papel no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina em camundongos obesos (Kang *et al.*, 2013). Nossos camundongos obesos mostraram aumento de expressões de *Col6a3* e *Has2*. COT diminuiu essas expressões indicando efeitos benéficos no tecido adiposo.

A resistência à insulina está ligada diretamente ao aumento do estresse do RE (Cheng *et al.*, 2020). O consumo contínuo de alimento com alto teor de gordura 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 (Ajoolahady *et al.*, 2022).

A inflamação é um componente primário do estresse do RE e obesidade, que tem permeado os estudos feitos no laboratório da UERJ (Pontes-da-Silva *et al.*, 2022; Reis-Barbosa *et al.*, 2022a). Além disso, a expressão de *Atf4*, *Chop* e *Gadd45* sob estresse contínuo resultam em apoptose (Rasheva e Domingos, 2009). Consequentemente, a atenuação do estresse do RE pode contribuir para o tratamento de alterações metabólicas na obesidade (Menikdiwela *et al.*, 2021). Portanto, é notável que a COT diminuiu os reguladores de estresse do RE no TABe de camundongos obesos.

A COT também apresentou resultado significativo sobre os componentes de proteases ICEM/CED-3 que desempenham papel na inflamação e funcionam como um fator pró-apoptótico (*Casp3* é um membro da família de proteases ou caspases do ácido cisteína-aspartico) (Alnemri *et al.*, 1996). Em contraste, a *Bcl2* é um fator anti-apoptose (Mahmoud e El-Sakhawy, 2011). Em camundongos obesos, a *Casp3* foi aumentada e *Bcl2* foi diminuída, um achado esperado na obesidade com resistência à insulina (Tinahones *et al.*, 2013). É notável que a COT, por sinergia, tenha regulado esses genes no TABe de camundongos obesos.

Figura 5 – Resumo gráfico



Fonte: A autora, 2023.

CONCLUSÕES

O modelo de camundongo obeso induzido por dieta desenvolve alterações metabólicas e orgânicas compatíveis com humanos obesos, incluindo acúmulo de gordura branca visceral. O duplo agonismo GLP-1/Glucagon tem efeitos benéficos no tratamento da obesidade com resistência à insulina, promovendo perda de peso, melhora da intolerância oral à glicose e da resistência à insulina. Além disso, COT suprime reguladores adipogênicos e lipogênicos na gordura epididimária de camundongos obesos, diminuindo os marcadores pró-inflamatórios, estresse do RE e apoptose dos adipócitos. Esses achados sugerem uma apreciação favorável ao duplo agonismo GLP-1/Glucagon que está em avaliação pelas agências reguladoras para se tornar um medicamento de uso humano.

REFERÊNCIAS

- Aaseth J, Ellefsen S, Alehagen U, Sundfor TM, Alexander J. Diets and drugs for weight loss and health in obesity - An update. *Biomed Pharmacother* 2021; 140: 111789 (doi: 10.1016/j.biopha.2021.111789)
- Aguila MB, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA. Nutritional Research and Fetal Programming: Parental Nutrition Influences the Structure and Function of the Organs. *Int J Morphol* 2021; 39: 327-334 (doi: 10.4067/s0717-95022021000100327)
- 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)
- 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)
- Ali MM, Hafez A, Abdelgalil MS, Hasan MT, El-Ghannam MM, Ghogar OM et al. Impact of Cotadutide drug on patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord* 2022; 22: 113 (doi: 10.1186/s12902-022-01031-5).
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171 (doi: 10.1016/s0092-8674(00)81334-3)
- 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)
- Bartesaghi S, Wallenius K, Hovdal D, Liljeblad M, Wallin S, Dekker N et al. Subcutaneous delivery of FGF21 mRNA therapy reverses obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022; 28: 500-513 (doi: 10.1016/j.omtn.2022.04.010)
- Battineni G, Sagaro GG, Chintalapudi N, Amenta F, Tomassoni D, Tayebati SK. Impact of Obesity-Induced Inflammation on Cardiovascular Diseases (CVD). *Int J Mol Sci* 2021; 22: (doi: 10.3390/ijms22094798)
- Bluher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15: 288-298 (doi: 10.1038/s41574-019-0176-8)
- Borges CC, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Vitamin D restriction enhances periovarian adipose tissue inflammation in a model of menopause. *Climacteric* 2020; 23: 99-104 (doi: 10.1080/13697137.2019.1597841)
- Caon I, Parnigoni A, Viola M, Karousou E, Passi A, Vigetti D. Cell Energy Metabolism and Hyaluronan Synthesis. *J Histochem Cytochem* 2021; 69: 35-47 (doi: 10.1369/0022155420929772)

- 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)
- Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr* 2016; 3: 10 (doi: 10.3389/fnut.2016.00010)
- Cinti S. Adipose Organ Development and Remodeling. *Compr Physiol* 2018; 8: 1357-1431 (doi: 10.1002/cphy.c170042)
- Conlon JM, O'Harte FPM, Flatt PR. Dual-agonist incretin peptides from fish with potential for obesity-related Type 2 diabetes therapy - A review. *Peptides* 2022; 147: 170706 (doi: 10.1016/j.peptides.2021.170706)
- 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).
- Davies M, Faerch L, Jeppesen OK, Pakseresht A, Pedersen SD, Perreault L et al. Semaglutide 2.4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2021; 397: 971-984 (doi: 10.1016/S0140-6736(21)00213-0)
- Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet* 1995; 346: 120-121 (doi: 10.1016/s0140-6736(95)92143-5)
- Engin A. Adiponectin-Resistance in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 415-441 (doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_18)
- 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)
- 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/jcbn.09-83)
- Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20: 242-258 (doi: 10.1038/s41580-018-0093-z)
- Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M et al. Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes* 2015; 5: e175 (doi: 10.1038/nutd.2015.22)
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111: 219-223 (doi: 10.1111/j.1365-2818.1977.tb00062.x)

- Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014; 220: T1-T23 (doi: 10.1530/JOE-13-0327)
- 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)
- Holst JJ, Albrechtsen NJW, Gabe MBN, Rosenkilde MM. Oxyntomodulin: Actions and role in diabetes. *Peptides* 2018; 100: 48-53 (doi: 10.1016/j.peptides.2017.09.018)
- Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010; 11: 11-18 (doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x)
- Kang L, Lantier L, Kennedy A, Bonner JS, Mayes WH, Bracy DP et al. Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. *Diabetes* 2013; 62: 1888-1896 (doi: 10.2337/db12-1502)
- 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)
- Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2021; 320: C375-C391 (doi: 10.1152/ajpcell.00379.2020)
- Li Z, Zhang C, Du JX, Zhao J, Shi MT, Jin MW et al. Adipocytes promote tumor progression and induce PD-L1 expression via TNF- α /IL-6 signaling. *Cancer Cell Int* 2020; 20: 179 (doi: 10.1186/s12935-020-01269-w)
- Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* 2019; 20: (doi: 10.3390/ijms20092358)
- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012; Chapter 5: Unit5 61 (doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58)
- Maharjan BR, McLennan SV, Yee C, Twigg SM, Williams PF. The Effect of a Sustained High-Fat Diet on the Metabolism of White and Brown Adipose Tissue and Its Impact on Insulin Resistance: A Selected Time Point Cross-Sectional Study. *Int J Mol Sci* 2021; 22: (doi: 10.3390/ijms222413639)
- Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Significance of Bcl-2 and Bcl-6 immunostaining in B-Non Hodgkin's lymphoma. *Hematol Rep* 2011; 3: e26 (doi: 10.4081/hr.2011.e26)
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486 (doi: 10.1590/S0001-37652003000400006)
- 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)
- Martins FF, Marinho TS, Cardoso LEM, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Aguila MB et al. Semaglutide (GLP-1 receptor agonist) stimulates browning on subcutaneous fat adipocytes and mitigates inflammation and endoplasmic reticulum stress in visceral fat adipocytes of obese mice. *Cell Biochem Funct* 2022a; 40: 1-11 (doi: 10.1002/cbf.3751)
- Martins FF, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue as an endocrine organ: updates on the emerging role of batokines. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2022b; 43: 44-53 (doi: 10.1515/hmbci-2022-0044)
- Menikdiwela KR, Torres Guimaraes JP, 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)
- Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci* 2016; 17: (doi: 10.3390/ijms17010124)
- 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/dci.2100000000000000)
- Nestor JJ, Parkes D, Feigh M, Suschak JJ, Harris MS. Effects of ALT-801, a GLP-1 and glucagon receptor dual agonist, in a translational mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* 2022; 12: 6666 (doi: 10.1038/s41598-022-10577-2)
- Nielsen MS, Ritz C, Wewer Albrechtsen NJ, Holst JJ, le Roux CW, Sjodin A. Oxyntomodulin and Glicentin May Predict the Effect of Bariatric Surgery on Food Preferences and Weight Loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: (doi: 10.1210/clinem/dgaa061)
- Nono Nankam PA, Nguelefack TB, Goedecke JH, Bluher M. Contribution of Adipose Tissue Oxidative Stress to Obesity-Associated Diabetes Risk and Ethnic Differences: Focus on Women of African Ancestry. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10: (doi: 10.3390/antiox10040622)
- Okunogbe A, Nugent R, Spencer G, Powis J, Ralston J, Wilding J. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. *BMJ Glob Health* 2022; 7: (doi: 10.1136/bmjgh-2022-009773)
- 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)
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Exp Physiol* 2020; 105: 1459-1466 (doi: 10.1113/EP088870)

- Pilkington AC, Paz HA, Wankhade UD. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 599134 (doi: 10.3389/fendo.2021.599134)
- Pontes-da-Silva RM, Marinho TS, Cardoso LEM, Mandarin-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)
- Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Journal of computational biology* 2013; 20: 703-711 (doi: 10.1007/s10495-009-0341-y)
- Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007 (doi: 10.1007/s10495-009-0341-y)
- 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, Mandarin-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, Mandarin-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)
- Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* 2022; 185: 419-446 (doi: 10.1016/j.cell.2021.12.016)
- Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017; 127: 1-4 (doi: 10.1172/JCI92035)
- Sanchez-Garrido MA, Brandt SJ, Clemmensen C, Muller TD, DiMarchi RD, Tschop MH. GLP-1/glucagon receptor co-agonism for treatment of obesity. *Diabetologia* 2017; 60: 1851-1861 (doi: 10.1007/s00125-017-4354-8)
- Scott R, Minnion J, Tan T, Bloom SR. Oxyntomodulin analogue increases energy expenditure via the glucagon receptor. *Peptides* 2018; 104: 70-77 (doi: 10.1016/j.peptides.2018.04.008)
- Spezani R, Mandarin-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)
- Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol* 2017; 37: 35-40 (doi: 10.1016/j.coph.2017.08.006)

- Taherkhani S, Suzuki K, Ruhee RT. A Brief Overview of Oxidative Stress in Adipose Tissue with a Therapeutic Approach to Taking Antioxidant Supplements. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10: (doi: 10.3390/antiox10040594)
- Tinahones FJ, Coin Araguez L, Murri M, Oliva Olivera W, Mayas Torres MD, Barbarroja N et al. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care* 2013; 36: 513-521 (doi: 10.2337/dc12-0194)
- Unamuno X, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Becerril S, Fruhbeck G, Catalan V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest* 2018; 48: e12997 (doi: 10.1111/eci.12997)
- Vianna ARB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2016; 24: 626-633 (doi: 10.1002/oby.21387)
- Vishvanath L, Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest* 2019; 129: 4022-4031 (doi: 10.1172/JCI129191)
- Yang Loureiro Z, Solivan-Rivera J, Corvera S. Adipocyte Heterogeneity Underlying Adipose Tissue Functions. *Endocrinology* 2022; 163: (doi: 10.1210/endocr/bqab138)
- Yuko OO, Saito M. Brown Fat as a Regulator of Systemic Metabolism beyond Thermogenesis. *Diabetes Metab J* 2021; 45: 840-852 (doi: 10.4093/dmj.2020.0291)
- Zhang Z, Yang D, Xiang J, Zhou J, Cao H, Che Q et al. Non-shivering Thermogenesis Signalling Regulation and Potential Therapeutic Applications of Brown Adipose Tissue. *Int J Biol Sci* 2021; 17: 2853-2870 (doi: 10.7150/ijbs.60354)
- Zhao Y, Gu X, Zhang N, Kolonin MG, An Z, Sun K. Divergent functions of endotrophin on different cell populations in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 311: E952-E963 (doi: 10.1152/ajpendo.00314.2016)
- Zhu Y, Li N, Huang M, Bartels M, Dagne S, Zhao S et al. Adipose tissue hyaluronan production improves systemic glucose homeostasis and primes adipocytes for CL 316,243-stimulated lipolysis. *Nat Commun* 2021; 12: 4829 (doi: 10.1038/s41467-021-25025-4)

ANEXO – Aprovação do 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 Mandarin 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