



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

Renata Spezani de Souza

Cotadutida (agonista duplo GLP-1/glucagon) afeta o pâncreas, tecido adiposo marrom e hipotálamo de camundongos obesos

Rio de Janeiro

2025

Renata Spezani de Souza

Cotadutida (agonista duplo GLP-1/glucagon) afeta o pâncreas, tecido adiposo marrom e hipotálamo de camundongos obesos

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

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

Rio de Janeiro

2025

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

S752 Spezani, Renata (Renata Spezani de Souza)

Cotadutida (agonista duplo GLP-1/glucagon) afeta o pâncreas, tecido adiposo marrom e hipotálamo de camundongos obesos / Renata Spezani de Souza. – 2025. 94 f.

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

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1– Agonista. 2. Hipotálamo – Efeitos dos fármacos – Teses. 3. Pâncreas – Fisiopatologia – Teses. 4. Diabetes Mellitus Tipo 2 – Metabolismo - Teses. I. Mandarin-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-008:615.2

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Renata Spezani de Souza

Cotadutida (agonista duplo GLP-1/glucagon) afeta o pâncreas, tecido adiposo marrom e hipotálamo de camundongos obesos

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

Aprovada em 19 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Alex Rafacho
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro
2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos animais de laboratório que têm um papel crucial no avanço da ciência. É com um sentimento de respeito e gratidão que reconheço o sacrifício deles em nome do progresso e do bem-estar da humanidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo e por acreditarem na minha capacidade de perseverar, pois estradas difíceis geralmente levam a lindos destinos.

Aos meus familiares de sangue e de coração, todos contribuem de alguma forma na minha jornada e escolhas com palavras de encorajamento.

Ao meu amor, Alex Farah, que sempre será meu professor, amigo, companheiro, incentivador, dedicando sempre o seu melhor a mim, cuidando e entendendo os meus momentos de distanciamento. Obrigada pelo amor, cuidado e por me conhecer melhor do que a mim mesma.

Ao meu orientador professor Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda por ter me inspirado a produzir na pesquisa com dedicação e afinco, sempre com toda a disposição para me ajudar. Obrigada por ser fonte de inspiração para que eu pudesse sempre ir adiante superando meus limites.

Aos professores que fizeram parte da minha formação para chegar até aqui. Sem eles nada disso seria possível.

A todos do LMMC por todo suporte técnico na realização do trabalho e humano nos momentos mais difíceis, tornando-os mais leves.

Gratidão à Mel (*in memoriam*) e Frida, minhas companheiras de quatro patas, que me fazem caminhar com mais leveza e trazem sempre de volta a minha essência e a conexão com a natureza.

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

Agradeço também a FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho.

Aprendi com as primaveras a deixar-me
cortar e a voltar sempre inteira.

Cecília Meirelles

RESUMO

SPEZANI, Renata. **Cotadutida (agonista duplo GLP-1/glucagon) afeta o pâncreas, tecido adiposo marrom e hipotálamo de camundongos obesos**. 2025. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Obesidade e Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2): Um Impacto Multifacetado. A obesidade combinada com o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) induz alterações profundas nas células alfa e beta, no tecido adiposo marrom (TAM) e nos neuropeptídeos hipotalâmicos. As células beta, como reguladoras chave da produção de insulina, continuam sendo o principal alvo para terapias de reposição celular e regeneração, visando o tratamento do DM2. Estratégias atuais concentram-se em estimular a proliferação das células beta e promover sua maturidade funcional. Paralelamente, uma abordagem terapêutica emergente envolve a reprogramação de diferentes tipos celulares em produtores de insulina. Nesse contexto, as células alfa destacam-se como candidatas promissoras devido à sua semelhança fenotípica com as células beta e à acessibilidade do seu genoma para transdiferenciação. **Cotadutida: Um Novo Agonista Dual do Receptor GLP-1/Glucagon.** A cotadutida, um novo agonista dual dos receptores GLP-1/glucagon, apresenta potencial para melhorar a arquitetura e a função das ilhotas pancreáticas, remodelar o TAM interescapular, aumentar a termogênese e modular os neuropeptídeos hipotalâmicos. Este estudo investigou os efeitos da cotadutida em camundongos obesos. Camundongos machos C57BL/6, com 12 semanas de idade, foram alimentados com dieta controle (C, 10% kJ de gordura) ou dieta hiperlipídica (HF, 50% kJ de gordura) por 10 semanas. Posteriormente, os animais foram divididos em quatro grupos e tratados diariamente por 30 dias com injeções subcutâneas de cotadutida (30 nmol/kg) ou veículo: C, CC (controle + cotadutida), HF e HFC (hiperlipídica + cotadutida). **Principais Achados e Efeitos da Cotadutida.** A administração de cotadutida no grupo HFC resultou em perda de peso significativa e melhora na sensibilidade à insulina. Esses benefícios foram evidenciados pelo aumento na expressão de substrato do receptor de insulina 1 e da família de carreadores de soluto 2 nas ilhotas pancreáticas isoladas. Além disso, a cotadutida estimulou fatores de transcrição associados à transdiferenciação das células das ilhotas e minimizou o estresse do retículo endoplasmático (RE). No TAM, a cotadutida reverteu a hipertrofia dos adipócitos, o desarranjo estrutural e o acúmulo de lipídios observados no grupo HF. Ademais, promoveu a termogênese, aumentou a temperatura corporal, melhorou a angiogênese e a lipólise, além de estimular a biogênese mitocondrial. No hipotálamo, o tratamento com cotadutida no grupo HFC melhorou a expressão de genes relacionados ao equilíbrio energético e suas vias de sinalização associadas, indicando modulação do eixo intestino-cérebro. **Conclusões e Implicações.** Concluindo, este estudo demonstra que a cotadutida exerce benefícios significativos em camundongos obesos, incluindo redução de peso, melhor controle glicêmico e aumento da sensibilidade à insulina. A cotadutida também melhorou a remodelação adversa das ilhotas pancreáticas, aprimorando marcadores de transdiferenciação, proliferação, apoptose e estresse do RE. Além disso, seus efeitos termogênicos no TAM interescapular e seu papel na modulação do equilíbrio energético através do eixo intestino-cérebro oferecem novas perspectivas sobre seus mecanismos de ação. Esses achados destacam os potenciais benefícios translacionais da cotadutida para o tratamento da obesidade e do DM2.

Palavras-chave: Células beta. Dieta hiperlipídica. Neuropeptídeos hipotalâmicos. Termogênese. Transdiferenciação.

ABSTRACT

SPEZANI, Renata. *Cotadutide (a dual agonist of GLP-1/glucagon) affects the pancreas, brown adipose tissue, and hypothalamus of obese mice*. 2025. 94 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): A Multifaceted Impact. Obesity combined with T2DM induces profound alterations in alpha- and beta-cells, brown adipose tissue (BAT), and hypothalamic neuropeptides. Beta cells, as key regulators of insulin production, remain a primary target for cell replacement and regenerative therapies aimed at treating T2DM. Current strategies focus on enhancing beta-cell proliferation and promoting functional maturity. Meanwhile, an emerging therapeutic avenue involves reprogramming various cell types into insulin-producing cells. Among these, alpha cells stand out as promising candidates due to their phenotypic similarity to beta cells and their genomic accessibility for transdifferentiation. **Cotadutide: A Novel Dual GLP-1/Glucagon Receptor Agonist.** Cotadutide, a novel dual GLP-1/glucagon receptor agonist, holds potential for improving islet cell architecture and function, remodeling interscapular BAT, enhancing thermogenesis, and modulating hypothalamic neuropeptides. This study explored the effects of cotadutide in obese mice. Twelve-week-old male C57BL/6 mice were fed either a control diet (C, 10% kJ fat) or a high-fat diet (HF, 50% kJ fat) for ten weeks. Subsequently, the animals were divided into four groups and treated daily for 30 days with subcutaneous injections of cotadutide (30 nmol/kg) or vehicle: C, CC (control + cotadutide), HF, and HFC (high fat + cotadutide). **Key Findings and Effects of Cotadutide.** Cotadutide administration in the HFC group resulted in significant weight loss and improved insulin sensitivity. These benefits were evidenced by increased expression of insulin receptor substrate 1 and solute carrier family 2 in isolated pancreatic islets. Additionally, cotadutide enhanced transcription factors associated with islet cell transdifferentiation and alleviated markers of endoplasmic reticulum (ER) stress. In BAT, cotadutide reversed adipocyte hypertrophy, structural disarray, and lipid accumulation observed in the HF group. Furthermore, cotadutide promoted thermogenesis, increased body temperature, enhanced angiogenesis and lipolysis, and stimulated mitochondrial biogenesis. In the hypothalamus, cotadutide treatment in the HFC group improved the expression of genes linked to energy balance and associated signaling pathways, indicating modulation of the gut-brain axis. **Conclusions and Implications.** In conclusion, this study demonstrates that cotadutide exerts profound benefits in obese mice, including weight reduction, enhanced glycemic control, and improved insulin sensitivity. Cotadutide also ameliorated adverse remodeling of pancreatic islets by improving markers of transdifferentiation, proliferation, apoptosis, and ER stress. Additionally, its thermogenic effects on interscapular BAT and its role in energy balance modulation through the gut-brain axis provide new insights into its mechanisms of action. These findings highlight the potential translational benefits of cotadutide for addressing obesity and T2DM.

Keywords: Beta cells. High-fat diet. Hypothalamic neuropeptides. Thermogenesis.

Transdifferentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores de transcrição na diferenciação de células alfa e beta	18
Figura 2. Representação hipotética da conversão de células alfa em células tipo beta mediada por fatores transcripcionais	19
Figura 3. Agonismo duplo GLP-1R/GCGR comparado ao monoagonista GLP-1R.....	23
Figura 4. Efeitos sinérgicos de agonismo de GLP-1R/GCGR.....	25
Figura 5. Desenho experimental	31
Figura 6. Citoarquitetura das áreas do hipotálamo na região do núcleo arqueado (ARC).	36
Figura 7. Evolução do peso corporal	42
Figura 8. Teste oral de tolerância à glicose.....	43
Figura 9. Citocinas	44
Figura 10. Hormônios e receptores	45
Figura 11. Ilhotas, células alfa e beta.....	47
Figura 12. Fatores transcripcionais	48
Figura 13. Fatores de transcrição, proliferação e apoptose	49
Figura 14. Fatores de estresse do retículo endoplasmático	50
Figura 15. Tecido adiposo marrom interescapular (TAM)	51
Figura 16. Marcadores termogênicos do TAM	52
Figura 17. Termografia dorsal infravermelha	53
Figura 18. Termogênese do TAM interescapular e marcadores de angiogênese.....	54
Figura 19. Lipólise do TAM interescapular e marcadores de biogênese mitocondrial	55
Figura 20. Imunofluorescência duplamente marcada de cortes coronais da região hipotalâmica	57
Figura 21. Expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos	58
Figura 22. Expressão gênica hipotalâmica	59
Figura 23. Expressão gênica hipotalâmica	60
Figura 24. Expressão de proteínas e genes hipotalâmicos	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e conteúdo energético das dietas experimentais.	30
Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no qPCR.	40
Tabela 3. Ingestão alimentar, ingestão de energia, metabolismo de glicose e lipídios e hormônios da saciedade.....	46
Tabela 4. Análise de variância de dois fatores	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Adam10</i>	<i>Desintegrina e metalopeptidase domínio 10</i>
<i>Adipoq</i>	Adiponectina
ADP	Adenosina difosfato
<i>Adrb3</i>	<i>Receptor beta-3 adrenérgico</i>
<i>Agrp</i>	Proteína relacionada ao <i>agouti</i> (gene)
AgRP	Proteína relacionada ao <i>agouti</i>
<i>Agrp</i>	<i>Neuropeptídeo relacionado à agouti</i>
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ARC	Núcleo arqueado
<i>Arx</i>	Fator de transcrição <i>aristaless-related homeobox</i>
ATF	Fator de transcrição ativador
<i>Atf4</i>	<i>Ativador do fator de transcrição 4</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
B3AR	Receptor beta 3 adrenérgico
<i>Bcl2</i>	<i>Leucemia/linfoma de células B 2</i>
<i>Bmp8b</i>	<i>Proteína morfogenética óssea 8b</i>
BSA	Albumina do soro de leite
C	Controle
<i>Calcr</i>	<i>Receptor de calcitonina</i>
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
<i>Casp3</i>	<i>Caspase 3</i>
CEUA	Comissão de ética para uso de animais
<i>Chop</i>	<i>Transcrito 3 indutível por dano ao DNA</i>
<i>Cidea</i>	<i>Ativador de morte celular</i>
CT	Colesterol total
<i>Ctr</i>	<i>Receptor de calcitonina</i>
DIO	Obesidade induzida por dieta

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIRi	Índice de resistência à insulina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
<i>Gadd45</i>	<i>Parada do crescimento e indução de dano ao DNA 45</i>
GCG	Glucagon
<i>Gcg</i>	<i>Glucagon (gene)</i>
GCGR	Receptor de glucagon
<i>Gcgr</i>	<i>Receptor de glucagon (gene)</i>
GHR	Receptor do hormônio do crescimento
GIP	Polipeptídeo inibidor gástrico
GLP1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLP1R	Receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon
<i>Glp1r</i>	<i>Receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (gene)</i>
<i>Glut2</i>	<i>Transportador de glicose tipo 2</i>
GPR	Receptor acoplado à proteína G
HF	Alto teor de gordura
<i>Hspg2</i>	<i>Perlecan (heparan sulfato proteoglicano 2)</i>
IA	Ingestão alimentar
<i>Iapp</i>	<i>Polipeptídeo amiloide de ilhotas</i>
ICV	Intracerebroventricular
IE	Ingestão energética
<i>Il6</i>	<i>Interleucina 6 (gene)</i>
IL6	Interleucina 6
Insm1	insulinoma associado 1
<i>Irs1</i>	<i>Substrato 1 do receptor de insulina</i>
<i>Isl1</i>	<i>Fator de transcrição ISL1, LIM/homeodomínio</i>
<i>Lep</i>	<i>Leptina; receptor de leptina</i>
<i>Lepr</i>	<i>Receptor de leptina</i>
<i>Maf</i>	<i>Família de oncogenes de fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf</i>

<i>Mc4r</i>	<i>Receptor de melanocortina-4</i>
<i>Neurod1</i>	<i>Diferenciação neurogênica 1</i>
<i>Ngn3</i>	<i>Neurogenina 3</i>
Nkx2.2	NK2 homeobox 2
Nkx6.1	NK6 homeobox 1
NPY	Neuropeptídeo Y
<i>Npy</i>	<i>Neuropeptídeo Y (gene)</i>
<i>Nrf1</i>	<i>Fator nuclear respiratório 1</i>
<i>Opa1</i>	<i>Dinamina mitocondrial semelhante à GTPase</i>
OXM	Oxintomodulina
<i>Pax</i>	<i>Caixa pareada</i>
<i>Pcna</i>	<i>Antígeno nuclear de células em proliferação</i>
<i>Pdx1</i>	<i>Homeobox 1 pancreático e duodenal</i>
<i>Pgc1a</i>	<i>Coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma</i>
<i>Plin1</i>	<i>Perilipina 1</i>
PNOC	Prepronociceptina
<i>Pomc</i>	<i>Pro-opiomelanocortina (gene)</i>
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR	Receptor agonista proliferador de peroxisoma
PPP	Polipeptídeo pancreático
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Polipeptídeo intestinal Y
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
QUICKi	Índice de sensibilidade à insulina
<i>Ramp3</i>	<i>Atividade do receptor (calcitonina) modificando a proteína 3</i>
RE	Retículo endoplasmático
<i>Rfx6</i>	<i>Fator regulador X, 6</i>
RI	Receptor de insulina
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
<i>Socs3</i>	<i>Supressor de sinalização de citocina 3</i>
SST	somatostatina

TAB	Tecido adiposo branco
TAC	Taquicinina 1
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
<i>Tbp</i>	<i>Proteína de ligação à caixa TATA</i>
<i>Tfam</i>	<i>Fator de transcrição A, mitocondrial</i>
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
<i>Ucp1</i>	<i>Proteína desacopladora 1 (gene)</i>
UCP1	Proteína desacopladora 1 (anticorpo)
<i>Vegfa</i>	<i>Fator de crescimento endotelial vascular A</i>
VMH	Núcleo ventromedial hipotalâmico
Vv	Densidade de volume
Xbp1	Proteína de ligação ao fator X-box 1

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 OBJETIVOS	28
1.1 Objetivo geral	28
1.2 Objetivos específicos:	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Animais	29
2.2 Dieta	29
2.3 Peso corporal, ingestão de alimentos, consumo de energia e metabolismo de glicose	31
2.4 Termografia interescapular infravermelha	31
2.5 Sacrifício e extração de tecidos	32
2.6 Análises plasmáticas	34
2.7 Quantificação de células alfa e beta	34
2.8 Imuno-histoquímica do TAM	35
2.9 Imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a laser	36
2.10 Western blotting	37
2.11 RT-qPCR	38
2.12 Análise estatística	41
3 RESULTADOS	42
3.1 Pâncreas	42
3.1.1 Benefícios da cotadutida na perda de peso, ingestão alimentar e metabolismo de glicose em camundongos obesos	42
3.1.2 Cotadutida melhora o metabolismo lipídico, os hormônios da saciedade e o perfil inflamatório	44
3.1.3 Cotadutida diminuiu a massa hipertrofiada de células alfa e beta em camundongos obesos	47

3.1.4 Os marcadores de transcrição e proliferação de ilhotas foram aumentados e a apoptose foi diminuída pela cotadutida	48
3.1.5 O estresse do retículo endoplasmático (RE) nas células das ilhotas foi mitigado pela cotadutida	49
3.2 Tecido adiposo marrom interescapular (TAM)	50
3.2.1 Cotadutida regula marcadores termogênicos no TAM de camundongos obesos.....	50
3.2.2 Cotadutida aumenta a temperatura corporal de camundongos obesos	52
3.2.3 Cotadutida aumenta a termogênese e os marcadores de angiogênese no TAM interescapular de camundongos obesos	53
3.2.4 Cotadutida melhora lipólise e biogênese mitocondrial em TAM de camundongos obesos	54
3.3 Hipotálamo	56
3.3.1 Efeitos da cotadutida nos neuropeptídeos hipotalâmicos anorexígenos e orexígenos	56
3.3.2 A cotadutida altera o equilíbrio energético através dos hormônios e dos seus receptores	58
4 DISCUSSÃO	62
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A – Aprovação do comitê de ética	86
ANEXO B – Artigo de revisão publicado em 2024.....	87
ANEXO C – Artigo de revisão publicado em 2022	88
ANEXO D – Artigo de pesquisa publicado em 2023	89
ANEXO E – Artigo de pesquisa publicado em 2024	90
ANEXO F – Artigo de pesquisa publicado em 2023.....	91
ANEXO G – Artigo de pesquisa publicado em colaboração em 2023.....	92
ANEXO H – Artigo de revisão publicado em 2024	93
ANEXO I – Artigo de revisão publicado em colaboração em 2023.....	94

INTRODUÇÃO

A obesidade contribui para a disfunção das ilhotas pancreáticas através da inflamação crônica dos tecidos e do excesso de nutrientes disponíveis que causam hipertrofia compensatória das células beta, insuficiência dessas células e resistência à insulina [1]. Este insulto pode progredir para danos relativos ou absolutos à função das células beta e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [2]. Os mecanismos moleculares relacionados à flexibilidade adaptativa da função das células beta fornecem uma visão mais aprofundada sobre a patogênese do DM2 [3].

A hiperglicemia crônica causa um desequilíbrio na homeostase do cálcio intracelular, causando um acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (RE) das células beta, levando à disfunção dessas células [4]. O estresse crônico do RE leva à reprogramação transcricional e translacional da função das células beta e dos reguladores de identidade, o que indica uma elevada plasticidade adaptativa nessas células [5].

No pâncreas, cinco células compartilham perfis epigenéticos semelhantes, compondo as ilhotas pancreáticas secretoras de hormônios: glucagon (células alfa), insulina (células beta), somatostatina (células delta), grelina (células épsilon) e polipeptídeo pancreático (células PPP) que são essenciais para regular a homeostase da glicose [6]. Apesar de serem caracterizadas como uma população celular estável e terminalmente diferenciada, as células endócrinas apresentam maior plasticidade quando estressadas [7].

As células beta são o foco principal para substituição celular e terapias regenerativas no tratamento do DM2. O conceito de reparo endógeno é uma promessa considerável como estratégia para restabelecer a massa de células beta e atingir a normoglicemia em indivíduos com DM2. Assim, abordagens viáveis têm como alvo subpopulações distintas de células beta para aumentar a proliferação ou melhorar a maturidade celular [8].

Por outro lado, transformar diferentes tipos de células em células produtoras de insulina poderia ajudar a melhorar o controle da glicose [9]. As células pancreáticas não beta, como células alfa, delta, ductais e acinares, têm um perfil epigenético semelhante às células beta e podem ser reprogramadas [10, 11].

No entanto, as células alfa são as candidatas mais atraentes para o tratamento do DM2, uma vez que são semelhantes em desenvolvimento às células beta, facilitando a reprogramação [12]. Notavelmente, as células alfa têm um genoma acessível e são, portanto, suscetíveis à transdiferenciação [13]. Além disso, sob condições fisiológicas, a massa de células beta é

regulada através da replicação ou transformação de células alfa, controlada através de um estágio celular conhecido como “célula beta virgem”, que constitui um nicho neogênico nas periferias das ilhotas pancreáticas em humanos e camundongos [14].

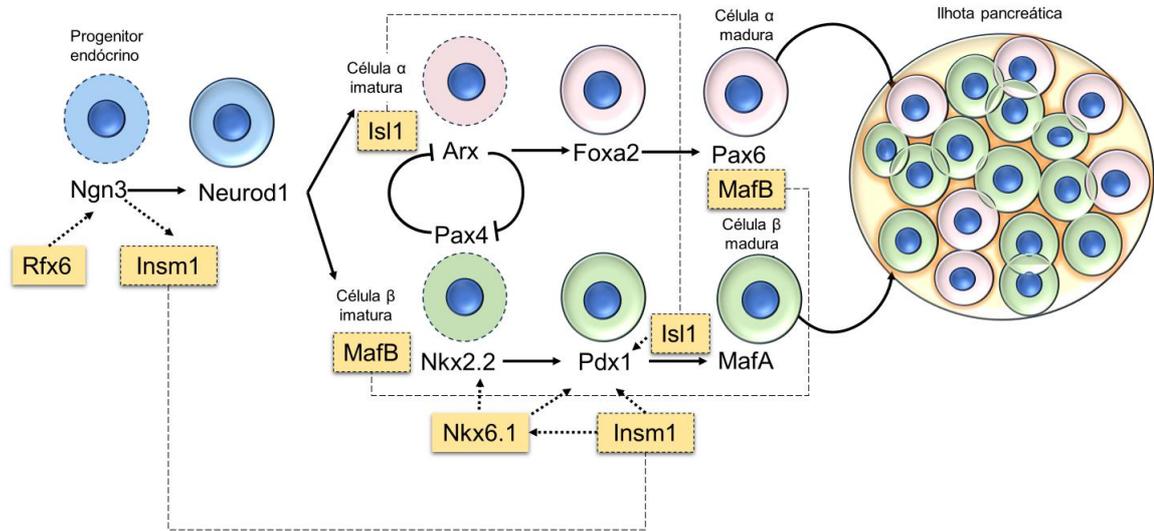
Fatores de transcrição de células alfa e beta humanas revelam padrões de expressão menos específicos durante o desenvolvimento do pâncreas fetal. Durante os estágios iniciais de desenvolvimento, Pdx1 e Nkx6.1 são amplamente expressos em todo o epitélio pancreático em desenvolvimento, mas estão restritos ao seu destino entre 13 (treze) e 15 (quinze) semanas de gestação [15]. Outros fatores de transcrição, como Arx e Nkx2.2, já ficam direcionados às suas respectivas linhagens com 9 (nove) semanas de gestação [16].

A Figura 1 esquematiza os principais fatores de transcrição que regulam o desenvolvimento do pâncreas endócrino e os processos de diferenciação das células alfa e beta. Vale ressaltar que muitos desses fatores transcricionais contemplam os dois tipos de células que compartilham uma origem comum do desenvolvimento e exibem transcriptomas e epigenomas sobrepostos [13]. Portanto, são os alvos mais estudados para o tratamento do diabetes.

Além disso, as células beta também sofrem transdiferenciação. As células beta em ilhotas pancreáticas humanas infectadas com SARS-CoV-2 produziram níveis mais baixos de insulina, enquanto o glucagon e a tripsina aumentaram, o que mostrou uma maior expressão de marcadores de células alfa e acinares, sugerindo transdiferenciação celular pós-infecção [17]. Além disso, a deleção da resposta ao estresse do RE, mediada pela proteína de ligação ao fator X-box 1 (Xbp1), em células beta adultas de camundongos leva à transdiferenciação beta para alfa e ao aumento da massa de células alfa desativando genes de identidade de células beta, como insulina, Pdx1, Nkx6.1, Beta2 e Foxa1 [18].

A Figura 2 ilustra a potencial transdiferenciação de células alfa para beta resultante de intervenções em receptores que afetam os fatores de transcrição. Os receptores podem coexistir nas células beta, mediando a função das células endócrinas nas ilhotas pancreáticas.

Figura 1. Fatores de transcrição na diferenciação de células alfa e beta

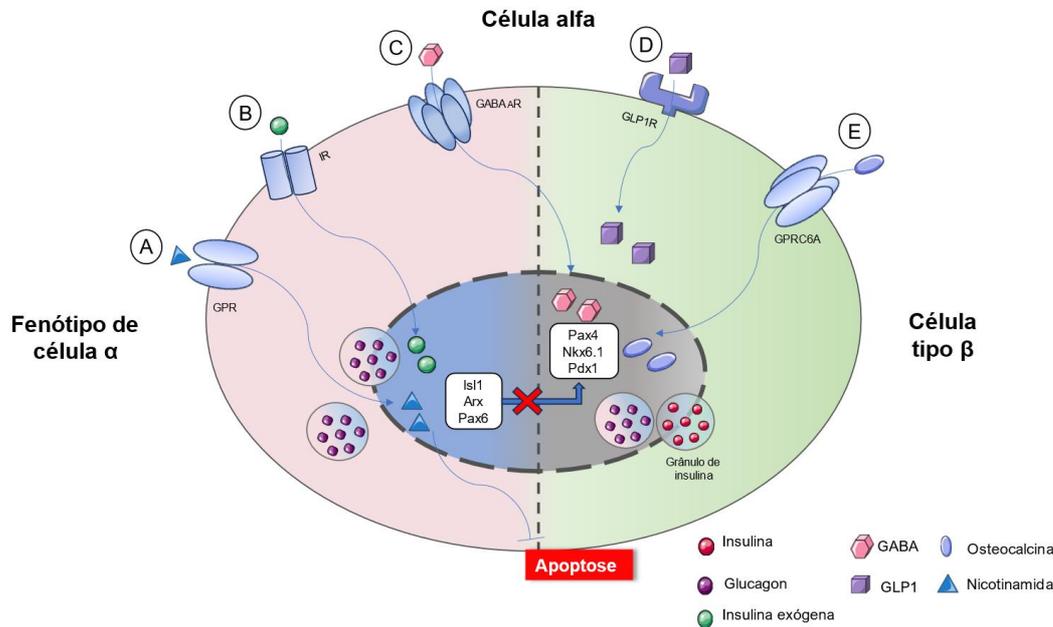


Legenda: Arx, homeobox relacionado a aristaless; Foxa2, forkhead box A2; Isl1, fator de transcrição ISL1; Insm1, insulinoma associado 1; Maf, família de oncogenes de fibrossarcoma musculoponeurótico v-maf; Neurod1, diferenciação neurogênica 1; Ngn3, neurogenina 3; Nkx, NK homeobox; Pax, caixa pareada; Pdx1, homeobox 1 pancreático e duodenal; Rfx6, fator regulador X, 6.

Nota: Ngn3 aumenta durante o desenvolvimento embrionário e afeta todas as células endócrinas pancreáticas. Neurod1 é necessário para a diferenciação inicial de células alfa e beta. Rfx6 reduz Ngn3. Isl1 ativa a transcrição de Arx em células alfa. Isl1 e Pdx1 regulam os genes ligados à insulina estimulada por glicose nas células beta. Arx inicia a diferenciação, inibe Pax4 e Foxa2 completa a diferenciação das células alfa. MafB mantém a função das células alfa e Pax6 promove a produção de glucagon. MafB participa da diferenciação de células beta durante a fase embrionária. Ngn3 ativa o Insm1 na diferenciação endócrina pancreática, e o Insm1 tem um papel no desenvolvimento da linhagem de células beta pancreáticas. Pax4 e Nkx2.2 estão ligados à linhagem de células beta. Nkx6.1 reduz Nkx2.2 na transcrição de células beta pancreáticas. Nkx6.1 gera células beta funcionais junto com Pdx1. MafA aumenta a expressão do gene da insulina.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 2. Representação hipotética da conversão de células alfa em células tipo beta mediada por fatores transcripcionais



Legenda: GABA, ácido gama-aminobutírico; GLP1R, receptor de GLP1; GPR, receptor acoplado à proteína G; GPRC6A, membro A da família de receptores acoplados à proteína G; MafA, família de oncogenes de fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf, Proteína A; Nkx6.1, NK6 homeobox 1; Pax4, caixa pareada 4; Pdx1, homeobox 1 pancreático e duodenal.

Nota: A - A nicotinamida ativa o GPR e inibe a apoptose das células beta; B - A insulina exógena ativa o receptor de insulina e inibe a apoptose das células beta; C - O GABA ativa o receptor GABA A e inibe os fatores de transcrição das células alfa, aumenta o fator de transcrição das células beta e aumenta o número relativo de células 'bihormonais', expressando insulina e glucagon ; D - Incretinas (mono, duplas ou triagonistas) ativam o GLP1R e potencializam fatores transcripcionais (Pax4, Pdx1, Nkx6.1 e MafA); E - A osteocalcina ativa o GPRC6A e aumenta os fatores transcripcionais, principalmente Pdx1, para controlar a proliferação de células beta.

Fonte: A autora, 2024.

Medicamentos antidiabéticos clinicamente aprovados, baseados em incretinas, restringem a transdiferenciação de células beta em alfa, diminuindo o dano às células beta e a resistência à insulina [19]. A terapia medicamentosa antidiabética favorece a transdiferenciação de células alfa para células beta pancreáticas [20] como, por exemplo, a administração de liraglutida a longo prazo em camundongos adultos com DM2 preserva a capacidade de neogênese pancreática a partir do botão primitivo [21].

Além disso, a adição exógena de insulina ou GABA em um cenário de estresse grave de células beta levou à transdiferenciação de células alfa em direção à linhagem de células beta 'bi-hormonais' positivas para insulina/glucagon em camundongos [22]. Ademais, a nicotinamida, um fator na diferenciação das células-tronco em células beta, reduziu a apoptose

de células beta [23], indiretamente tornando a avaliação da massa de células beta um achado significativo para inferir sobre a função das células beta [24, 25].

A polifarmacoterapia pode ativar vias de transdiferenciação de células de ilhotas aditivas ou redundantes simultaneamente. Uma abordagem farmacológica tripla (insulina mais GLP-1-estrogênio) foi testada para aumentar a eficácia de ambos os medicamentos e, mais especificamente, reduzir a necessidade de insulina. A terapia combinada restaurou a tolerância padrão à glicose, aumentou a secreção de insulina estimulada pela glicose e aumentou a contagem de células beta [26].

A suplementação de osteocalcina aumentou a expressão nuclear de Pdx1 e Nkx6.1 em camundongos LDLr^{-/-}, indicando aumento da identidade das células beta pancreáticas [27]. A osteocalcina se liga e ativa o receptor GPRC6A regulando a proliferação de células beta e a secreção de insulina [27, 28].

Além disso, os efeitos de curto e longo prazo da taurina nas células beta pancreáticas foram suscetíveis à forma como ela interagiu com GLP-1, forskolina, tolbutamida e despolarização da membrana, contribuindo para o efeito antiapoptótico do GLP-1 [29].

Embora a transdiferenciação seja uma estratégia potencial para o tratamento do DM2, persiste uma limitação quanto à possibilidade de as células endócrinas se transdiferenciarem em células beta em indivíduos com doença pancreática, uma vez que experimentos de rastreamento de linhagem não podem ser realizados em humanos [9]. Células polihormonais também são observadas durante o desenvolvimento pancreático normal em humanos. No entanto, é incerto se essas células sofrem desdiferenciação para um estado mais embrionário ou se transdiferenciam em outro tipo de célula endócrina [7]. A sequência de eventos – se a transdiferenciação endócrina precede a reprogramação – permanece não elucidada em humanos e roedores.

Como evidências experimentais e clínicas demonstraram que o tecido adiposo marrom (TAM) é funcional em humanos adultos [30, 31], ele tem sido considerado um complemento ao controle da obesidade. O objetivo é preservar os adipócitos marrons e estimular o desenvolvimento de precursores marrons pré-existentes [32], estimulando a termogênese adrenérgica adaptativa [33].

Além disso, a associação entre obesidade e alterações metabólicas relacionadas à resistência à insulina e ao descontrole da glicemia que levam ao DM2 e ao aumento do risco de doenças coronarianas [34], podem se beneficiar da ativação do TAM. O TAM é um local essencial de eliminação de glicose, depuração de triglicerídeos e ação da insulina, sendo, portanto, potencialmente um alvo no controle da obesidade e suas comorbidades [35], por

exemplo, nas terapias que utilizam agonista do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1R) [36]. Além disso, no modelo de obesidade, o transplante de TAM de animais magros para animais obesos leva à perda de peso em animais obesos com melhora das comorbidades [37].

Uma característica essencial dos adipócitos marrons é o seu conteúdo mitocondrial e atividade termogênica [38, 39]. As mitocôndrias produzem calor pelo vazamento de H⁺ através de sua membrana interna para o espaço da membrana sob a regulação da proteína desacopladora (UCP) -1 e do transportador ADP/ATP [40]. No entanto, mecanismos termogênicos independentes de UCP1 expandem a função dos adipócitos marrons e beges na homeostase energética [41].

Intervenções nutricionais de longo prazo contribuem não farmacologicamente para aumentar a massa e a atividade do TAM, ajudando no controle da obesidade [42]. Além disso, a beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa ajuda a manter o fenótipo dos adipócitos marrons durante a ativação e quiescência [43].

Dentro do sistema nervoso central (SNC), numerosas populações neuronais expressam GLP-1R, incluindo núcleos hipotalâmicos cruciais para a regulação do balanço energético [44]. Além disso, muitas áreas extra hipotalâmicas possui sítios de ligação para GLP-1. Foi demonstrado que a administração periférica de GLP-1 ativa neurônios em diferentes regiões do SNC, sugerindo a existência de locais cerebrais acessíveis pela corrente sanguínea [45].

A contribuição hipotalâmica para o controle do balanço energético é especialmente evidente nos neurônios dos núcleos arqueado (ARC) e paraventricular (PVN) [46]. As vias envolvidas na saciedade e no apetite em casos de obesidade são parcialmente conhecidas [47, 48]. O objetivo é o equilíbrio dos neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y - NPY e peptídeo relacionado à agouti - AgRP) e neuropeptídeos anorexígenos (pro-opiomelanocortina – POMC – e transcrito regulado por cocaína e anfetamina - CART) e como os peptídeos podem ser modulados por diferentes dietas e drogas [49-51].

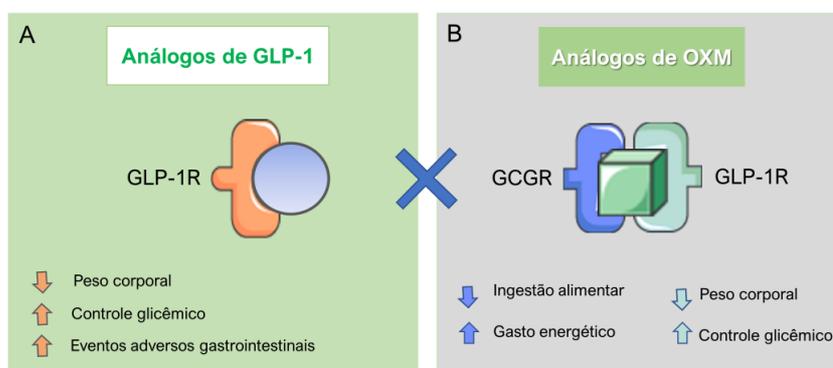
A administração central de GLP-1 resulta na redução dos níveis de NPY e AGRP, enquanto eleva a expressão de POMC e CART durante o jejum. A ativação do GLP-1 no SNC não apenas inibe a ingestão de alimentos, mas também controla a regulação glicêmica [52]. Adicionalmente, o GLP-1 no cérebro influencia o metabolismo de lipídios no tecido adiposo branco (TAB) e a termogênese no TAM por meio da ativação do sistema nervoso simpático (SNS). Com base em evidências de que o glucagon (GCG) pode promover a termogênese do TAM por ações no SNC, sugere-se que os agonistas GLP-1R/GCGR intensificam a atividade

do SNS no TAM, promovendo a termogênese e contribuindo para o controle do equilíbrio energético [53].

Em contraste com os agentes antidiabéticos mais antigos, estudos em larga escala centrados na segurança cardiovascular, combinados com a falta de efeitos adversos potencialmente fatais, como a hipoglicemia [54], estabeleceram tratamentos baseados na utilização do agonista de GLP-1R como pedra angular no tratamento do DM2. A perda de peso promovida pelo GLP-1R está associada à redução da mortalidade em pacientes com DM2, melhorando as comorbidades relacionadas e reduzindo a necessidade de medicamentos para hiperglicemia, hipertensão e hiperlipidemia [55].

A sinalização sustentada do GLP-1R leva à diminuição do apetite e da ingestão alimentar, resultando na consequente redução do peso corporal. Assim, foram desenvolvidos análogos do GLP-1R, modificando sua estrutura química para resistir à degradação pela dipeptidil-peptidase 4 (DPP4) que permite uma dosagem mais conveniente, seja diária ou mesmo semanalmente [56] (Fig. 3A).

Figura 3. Agonismo duplo GLP-1R/GCGR comparado ao monoagonista GLP-1R



Legenda: DPP4, dipeptidil peptidase 4; GCGR, receptor de glucagon; GLP1R, receptor de GLP1; OXM, oxintomodulina.

Nota: A - A ativação do GLP-1RA melhora o controle glicêmico, reduz o peso corporal, mas aumenta os efeitos gastrointestinais adversos. B - A ativação do GCGR reduz a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético. Análogos de OXM resistentes à DPP4 foram desenvolvidos para estender seus efeitos através de substituições peptídicas. A combinação de GLP-1R/GCGR promove melhor controle glicêmico e reduz o peso corporal sem efeitos adversos graves.

Fonte: A autora, 2022.

No entanto, a modulação de múltiplos alvos metabólicos surgiu com uma nova geração de medicamentos que combinam dois ou três receptores para aumentar os efeitos terapêuticos, utilizando mais de uma via regulatória para tratar doenças metabólicas devido a efeitos sinérgicos de medicamentos [57].

GLP-1RA combinado com outros hormônios intestinais, que podem ter benefícios complementares, foram propostos em várias combinações de agonistas de receptores duplos ou triplos (GLP-1 com GIP, GLP-1 com GCG e GLP-1 com GCG e com GIP) para promover o tratamento da obesidade e DM2 e melhorar os benefícios comprovados do agonista de GLP-1R. Além disso, esses hormônios estão associados ao chamado efeito incretina, que ocorre quando a glicose oral leva ao aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas em comparação com a administração intravenosa de glicose [58].

O glucagon é um potencial candidato ao agonismo duplo, pois apresenta efeitos insulíntrópicos, reduz a ingestão alimentar, melhora o gasto energético e a oxidação de ácidos graxos, reduzindo a esteatose hepática [56].

O gene do receptor de glucagon é expresso no fígado, tecido adiposo, rim, coração, baço, ovário e ilhotas pancreáticas. A expressão aumentada do receptor no fígado e nos rins torna esses órgãos os principais responsáveis pela depuração do glucagon, principalmente através da endocitose mediada pelo receptor e, em menor grau, pela proteólise endovascular

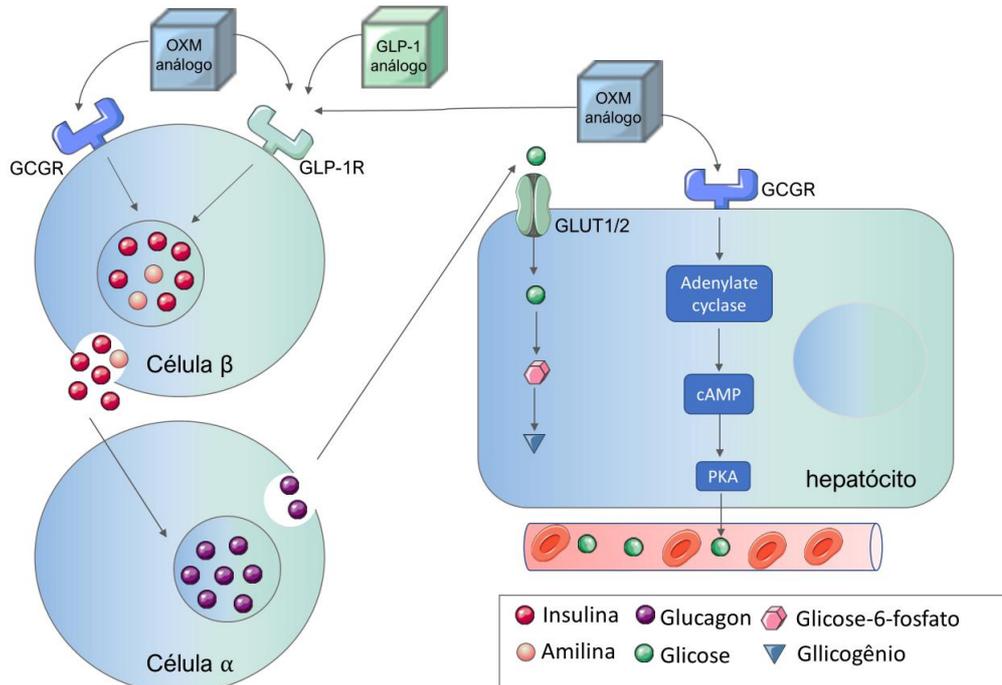
pela DPP4 e pela degradação enzimática na membrana celular, levando a uma curta meia-vida do glucagon no plasma circulante [59].

Embora o agonismo do GCGR pareça contraintuitivo como tratamento para o DM2 devido ao seu efeito no aumento da glicose hepática, o glucagon pode suprimir o apetite devido ao atraso no esvaziamento gástrico e ao aumento do gasto energético consequente ao catabolismo de aminoácidos, ureagênese e oxidação de ácidos graxos [60].

GLP-1 e GCG são hormônios glicorreguladores com ações opostas na regulação da glicose plasmática. No entanto, ações complementares na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético sugerem que o duplo agonismo GLP-1R/GCGR poderia proporcionar benefícios adicionais em relação ao agonismo de GLP-1R isolado, gerando interesse em desenvolver agonistas duais unimoleculares estáveis, ligando a alta potência de GLP-1R e GCGR [61]. Além disso, os efeitos relativos da ativação induzida em cada um dos receptores são provavelmente cruciais para uma eficácia ótima, uma vez que uma ativação robusta do GLP1R tende a induzir eventos adversos, como náuseas [62]. Por outro lado, a regulação positiva do GCGR pode aumentar a glicemia por gliconeogênese e glicogenólise, neutralizando o melhor controle da glicemia oferecido pelo GLP-1R [63]. Portanto, resíduos não conservados foram substituídos nos segmentos médio e C-terminal dos peptídeos para gerar agonismo duplo GLP-1R/GCGR de alta potência, melhorando a dinâmica conformacional do peptídeo e aumentando sua eficiência na ativação de GLP-1R em comparação ao GCGR [61] (Fig.3B).

Terapias agonistas duplas com doses mais baixas e efeitos sinérgicos em mais de um receptor simultaneamente podem minimizar os efeitos adversos (Fig.4). Atualmente, os compostos em desenvolvimento utilizando o eixo incretina exemplificam melhor esta vantagem. Além disso, a secreção de insulina induzida pela incretina é indireta e dependente da glicose, prevenindo assim a hipoglicemia ao recrutar a microbiota intestinal e seus metabólitos para diversificar a resposta induzida por drogas [64].

Figura 4. Efeitos sinérgicos de agonismo de GLP-1R/GCGR



Legenda: AMPc, adenosina monofosfato cíclico; GCGR, receptor de glucagon; GLP1R, receptor de GLP1; PKA, proteína quinase A; OXM, oxintomodulina.

Nota: Estimulação de células beta pancreáticas por análogos da OXM induz a secreção de insulina, inibindo a secreção de glucagon pelas células alfa. Além disso, diminuição dos níveis circulantes de glucagon resultam em menor indução da produção hepática de glicose. O análogo de OXM no hepatócito ativa a adenilil ciclase via proteína G com subsequente geração de AMPc e ativação da PKA e outros mediadores a jusante como modo primário de sinalização intracelular.

Fonte: A autora, 2022.

A oxintomodulina (OXM) é um peptídeo duplo endógeno e unimolecular GLP-1R/GCGR secretado pelas células L do intestino delgado em resposta à ingestão de nutrientes como um produto adicional do processamento diferencial de proglucagon intestinal [65]. 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 [66]. A secreção de OXM é estimulada por nutrientes luminiais, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas [67]. Em indivíduos com obesidade mórbida, alterações nos hormônios gastrointestinais, como OXM e glicentina, estão implicadas na supressão pós-operatória da ingestão alimentar, levando à perda de peso após bypass gástrico em Y-de-Roux e gastrectomia vertical [68]. Além disso, a cirurgia bariátrica pode aumentar a OXM, ativando o GLP-1R/GCGR [69].

No entanto, a utilidade clínica do OXM é limitada devido à sua menor potência *in vitro*, meia-vida curta (~ 10 min) e rápida depuração renal *in vivo* do OXM nativo, dificultando seu desenvolvimento como tratamento de longo prazo para a obesidade [56, 70]. Assim, a

administração diária repetida de doses suprafisiológicas (três ou quatro vezes ao dia) de OXM seria necessário para alcançar um efeito farmacológico satisfatório em humanos. Portanto, análogos de OXM resistentes a DPP4 com efeitos prolongados foram desenvolvidos através de substituições de peptídeos para evitar a digestão por protease e rápida filtração glomerular para melhorar a meia-vida circulatória in vivo [71, 72].

Adicionalmente, existem desvantagens dos agonistas GLP-1R relacionadas a eventos adversos dose-dependentes, o que pode 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 destes efeitos [73]. Além disso, quando os efeitos secundários são consistentes e intoleráveis após semanas/meses de titulação, deve ser implementada uma dose mais baixa ou uma combinação de terapêuticas antidiabéticas para evitar a descontinuação do tratamento [74]. Assim, o interesse em desenvolver terapias mais eficazes e com menos efeitos adversos foi crescendo, contribuindo para o desenvolvimento de agonistas unimoleculares duais e tri-agonistas, que atuam em dois ou mais receptores GLP-1R, GCGR e GIPR [75], tendo como foco aumentar ou equilibrar a potência dos peptídeos nos receptores alvo e diminuir efeitos adversos [70].

Portanto, a relação de atividade entre o GLP-1 e o glucagon foi estudada para atingir o impacto benéfico máximo de cada receptor no agonismo [76, 77]. Assim, a cotadutida (anteriormente referido como MEDI 0382) é um agonista duplo balanceado GLP-1R/GCGR com perfil de atividade in vitro de 5:1 GLP-1R/GCGR [78], apresentando farmacocinética adequada para otimizar a segurança e a eficácia [79, 80]. Nos estudos de fase 1 e 2, a cotadutida demonstrou ter a capacidade de facilitar a perda de peso e o controle glicêmico e tem potencial para ser usado no tratamento da obesidade e do DM2 [78, 81, 82].

Além disso, a ativação do componente GCGR da cotadutida aumenta a função mitocondrial, estimulando o gasto energético e a oxidação de gordura, um mecanismo essencial na resolução de NASH em camundongos [69].

Em abril de 2023, a AstraZeneca decidiu encerrar o seu programa clínico de seu agonista diário de GLP1R/GCGR, a cotadutida, em favor do desenvolvimento de AZD9550, um GLP1R/GCGR injetável uma vez por semana.

No presente trabalho investigamos o efeito da cotadutida nos componentes da via de transdiferenciação nas ilhotas pancreáticas, bem como na remodelação das ilhotas, na termogênese no TAM e, finalmente, na sinalização nos neurônios presentes no ARC do hipotálamo (vias orexígenas e anorexígenas) para contribuir para o efeito da cotadutida na perda de peso. Optamos por realizar o estudo em camundongos obesos induzidos por dieta (DIO)

porque este modelo reproduz de perto a obesidade e suas comorbidades observadas em humanos [83-85].

A hipótese desse trabalho é que a cotadutida beneficia potencialmente a função das células beta através da transdiferenciação celular e mitigação do estresse do RE, contribuindo para a plasticidade adaptativa das ilhotas de camundongos DIO. Além disso, a cotadutida pode atuar no aumento da termogênese no TAM interescapular, em consonância com o aumento do gasto energético e, para mais além, contribuir no balanço da fome e saciedade através da regulação dos neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos presentes no hipotálamo.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações estruturais e moleculares na célula beta pancreática, no TAM e no hipotálamo em camundongos obesos induzidos por dieta sob o efeito da cotadutida.

1.2 Objetivos específicos:

- a) Avaliar as alterações da massa corporal, ingestão, energia alimentar e do metabolismo de glicose;
- b) Analisar a histologia do pâncreas, do tecido adiposo marrom e do hipotálamo;
- c) Analisar a expressão gênica na ilhota pancreática dos fatores de transcrição relativos à identidade e função de células beta, da inflamação e dos marcadores de estresse do retículo endoplasmático;
- d) Analisar a expressão gênica e proteica no tecido adiposo marrom dos marcadores de termogênese e biogênese mitocondrial;
- e) Analisar a expressão gênica e proteica do hipotálamo dos marcadores de fome e saciedade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, devido à sua predisposição à obesidade quando alimentados com dieta hiperlipídica [86]. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular (LMMC), sendo mantidos em ambiente controlado de temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), ciclos de luz de 12/12h claro-escuro, com acesso livre à comida e à água.

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NHI N°. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Cuidados e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo n° CEUA 002/2021).

2.2 Dieta

As dietas experimentais foram feitas pela empresa Pragsoluções (Jaú, SP, Brasil), seguindo as recomendações da AIN-93, sendo a composição detalhada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição e conteúdo energético das dietas experimentais

COMPOSIÇÃO(g/Kg)	Grupos	
	C	HF
Caseína	140	175
Amido de milho	620,7	348
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	238
Fibra	50	50
Mistura de Vitaminas	10	10
Mistura de Minerais	35	35
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,060
Total (g)	1000	1000
Energia (kJ /Kg)	16000	21000
Hidrato de carbono (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lipídio (%)	10	50

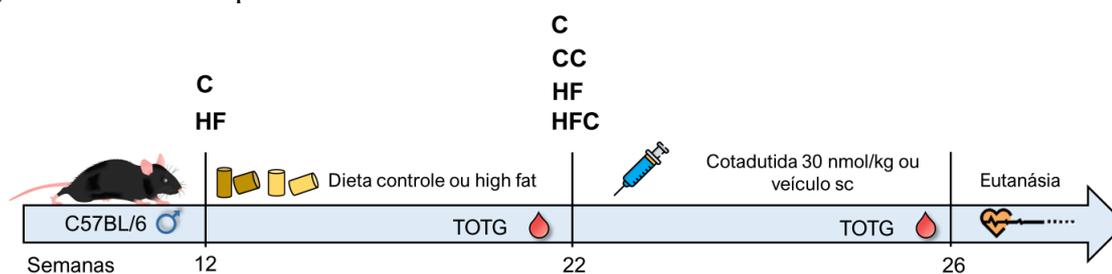
Legenda: Grupos: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica)

Fonte: Adaptado de Reeves, Nielsen, Fahey [87]

Inicialmente, os camundongos com 12 semanas foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=40 por grupo) e receberam dietas diferentes durante um período de dez semanas. Um grupo recebeu dieta controle (ração padrão para roedores), designado como grupo **C**. O outro grupo recebeu uma dieta hiperlipídica (*high-fat*), designado como grupo **HF**.

Após as dez semanas com as suas respectivas dietas experimentais, os animais dos grupos **C** (n=40) e **HF** (n=40) foram divididos novamente em quatro grupos (n=20 por grupo) e tratados com cotadutida (ou veículo) por mais quatro semanas. A cotadutida foi administrada diariamente por via subcutânea a 30 nmol/kg de peso corporal (Astrazeneca, Gaithersburg, MD, EUA) diluída em veículo (50 mM fosfato tampão, pH 7,5, contendo 1,85 % propileno glicol e 0,04 % v/v Tween 80, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Mo., EUA) ou apenas no veículo [88]. Assim, foram estabelecidos quatro grupos experimentais: C (dieta controle + veículo), CC (dieta controle + cotadutida), HF (dieta com alto teor de gordura + veículo) e HFC (dieta com alto teor de gordura + cotadutida). Os grupos foram formados conforme o esquema representado na figura 5.

Figura 5. Desenho experimental



Legenda: Grupos: C (controle + veículo), CC (controle + cotadutida), HF (alto teor de gordura + veículo) e HFC (alto teor de gordura + cotadutida).

Fonte: A autora, 2021.

2.3 Peso corporal, ingestão de alimentos, consumo de energia e metabolismo de glicose

Uma vez por semana, o peso corporal foi mensurado (terça-feira, 11h), e a ingestão alimentar (g/dia) foi monitorada diariamente, subtraindo-se da quantidade total de alimentos oferecidos, a quantidade remanescente na caixa após 24h. O consumo de energia foi o produto da ingestão de alimentos pelo valor energético da dieta (kJ/g).

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi medido antes (10^a semana) e após o tratamento (14^a semana). Os animais permaneceram em jejum por seis horas e receberam sobrecarga de glicose (2 g glicose/kg, solução salina estéril a 25 %, NaCl a 0,9 %) por gavagem oral. Amostras de sangue foram coletados na veia da cauda. A concentração de glicose foi medida em zero, 15, 30, 60 e 120 min (glicômetro Accu-Chek, Roche, SP, Brasil) e a “área sob a curva” foi analisada (GraphPad Prism v.9.5.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Além disso, o índice de resistência à insulina em jejum [$FIRi = \text{glicose} \cdot \text{insulina} / 25$] [89] e índice quantitativo de sensibilidade à insulina [$QUICKi = 1 / (\log(I0) + \log(G0))$] [90] foram determinados.

2.4 Termografia interescapular infravermelha

A temperatura interescapular dos animais foi obtida à temperatura ambiente em camundongo previamente treinado e alojado em câmara transparente Plexiglas especialmente destinada a este fim. A distância entre a câmera e o animal foi fixada e a fotografia térmica foi

tirada de cima com o animal em repouso, focando na região interescapular (infrared FLIR C2 camera, FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, EUA). Em cada animal, as análises foram realizadas na semana 10 (antes do tratamento) e na semana 14 (após o tratamento).

2.5 Sacrifício e extração de tecidos

Os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas e parte deles foram submetidos à anestesia profunda com injeção intraperitoneal 240 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina, Cristalia, Itapira, SP, Brasil). O sangue foi coletado por punção cardíaca, heparinizado (dalteparina de sódio, Fragmin, Pfizer, São Paulo, SP, Brasil), em seguida abriu-se a caixa torácica e o coração foi exposto para a coleta por punção cardíaca de amostras sanguíneas, que em seguida, foram centrifugadas em temperatura ambiente (712 G por 15 minutos), com a finalidade de separar o plasma, sendo imediatamente estocados a -80 °C até a realização das análises bioquímicas.

Os hipotálamos desses animais foram removidos cuidadosamente (dorsalmente pelo tálamo, ventralmente pelo quiasma óptico e caudalmente pelos corpos mamilares), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C para as técnicas de biologia celular e molecular. O pâncreas e o tecido adiposo marrom (TAM) interescapular foram dissecados, pesados e mantidos em fixação recém-preparada (formaldeído a 4% w/v, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, 48 h a temperatura ambiente) ou congelados a -80 °C para análise molecular. O TAM e o pâncreas fixados foram incorporados em Paraplast Plus (SigmaAldrich Co., St. Louis, Mo., USA), e os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina ou processados para análises imuno-histoquímicas.

Os animais destinados ao isolamento de ilhotas pancreáticas tiveram o ducto biliar comum acessado por uma cânula para insuflar o pâncreas com solução de Hanks (14025126, Invitrogen, CA, EUA), soro bovino (1 mg/mL) e colagenase (C9263, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) [91], dissecado e imerso em solução de colagenase a 37 °C (20 min). Ilhotas foram coletados sob ampliação (Microscópio Estéreo Zoom Luxeo 4D, Labomed, CA, EUA).

Os animais destinados a perfusão cerebral foram profundamente anestesiados e perfundidos por pressão pelo ventrículo esquerdo com solução salina a 0,9 % para a remoção total do sangue e, em seguida com solução fixadora de paraformaldeído a 4 % (PFA, tampão fosfato 0,1 M, PBS, pH 7,4) [92]. Os encéfalos foram isolados e rapidamente imersos em uma

solução de PFA a 4 % (4 horas a 4° C). Posteriormente, foram crioprotégidos com sacarose a 30 % em PBS e mantidos durante à noite a 4 °C. Feito isso, os cérebros foram congelados em meio de inclusão específico para corte (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europa, Holanda) e congelados em nitrogênio líquido. Finalmente, os blocos foram seccionados em plano coronal de acordo com coordenadas estereotáxicas buscando a região hipotalâmica de interesse (região do ARC, Bregma -1,23 mm a -2,79 mm) [93], obtendo-se cortes com espessura nominal de 25 µm em criostato (Leica Biosystems modelo Leica CM1860) a -16 ± 2 °C. Os cortes foram aderidos a lâminas adesivas (Leica Micro Systems, Wetzlar, Alemanha), permanecendo a -20° C até a realização da imunofluorescência.

2.6 Análises plasmáticas

As amostras de sangue coletadas no momento da eutanásia dos camundongos foram utilizadas para avaliar quantitativamente as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triacilglicerol feitas por método enzimático colorimétrico utilizando um espectrofotômetro automático e kits comerciais de acordo com as instruções especificadas (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações plasmáticas de adiponectina (EZMADP-60K) e GLP-1 (total) (EZGLP1T-36BK) foram realizadas em duplicata, utilizando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Millipore, Merck, Temecula, CA, EUA) com o leitor de microplacas Accuris SmartReader UV-Vis (modelo MR9610, Nova Jersey, EUA). Além disso, amilina, peptídeo C, grelina, GIP, GLP-1 (forma ativa), glucagon, insulina, leptina, PPP e PYY foram medidos por imunoenaios Biomarker Multiplex para tecnologia Luminex xMAP, Millipore, Billerica, MA, EUA, cat. N° MMHE-44 K).

2.7 Quantificação de células alfa e beta

O pâncreas foi seccionado serialmente com 5 μm de espessura a cada vigésimo corte ao longo de todo o pâncreas e corado com hematoxilina e eosina (HE). Os demais cortes foram incubados com anticorpos anti-insulina (sc 9168, Santa Cruz Biotech, CA, EUA; 1:100) e anti-glucagon (CSB PA002654, Cusabio; 1:100). Os anticorpos secundários foram conjugados com estreptavidina-peroxidase e revelado com diaminobenzidina líquida (DAB, Histostain Plus Kit, Invitrogen, CA, EUA). Então, os cortes foram contra corados com hematoxilina. As imagens digitais foram obtidas usando um microscópio Nikon modelo 80i e um digital DS-Ri1 câmera (Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

A densidade de volume das ilhotas (V_v [ilhota, pâncreas]) foi estimada nos cortes corados com HE por contagem de pontos, conforme descrito previamente [94]. Em seguida, a massa da ilhota (M [ilhota, pâncreas]) foi determinada multiplicando-se V_v [ilhota, pâncreas] e massa do pâncreas. Além disso, foi estimado a densidade de volume de células alfa (V_v [célula alfa, ilhota]) e beta (V_v [célula beta, ilhota]) por análise de imagem em cortes imunomarcados com anticorpos anti-glucagon e anti-insulina, respectivamente.

Resumidamente, as ilhotas foram delimitadas por ferramenta digital e as imagens obtidas na tela de deconvolução correspondeu às imagens DAB computadas em unidades de intensidade de cor, assim convertidas em densidade óptica (ImageJ v. 1.53/FIJI <http://imagej.nih.gov/ij>) [95]. Feito isto, as massas de células alfa e células beta foram estimadas (o produto de Vv [célula alfa, ilhota], ou Vv [célula beta, ilhota] e M [ilhota, pâncreas]) [25].

2.8 Imuno-histoquímica do TAM

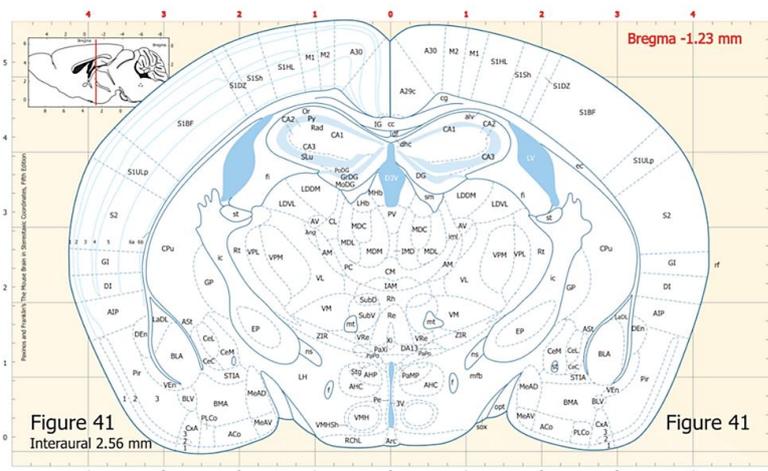
Os cortes de TAM foram submetidos a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0 a 60 °C/20 min), bloqueando a peroxidase (RE7157) e proteína (RE7158, Leica Biosystems, VISTA, CA, EUA), depois incubados com anticorpo primário para o receptor beta-3 adrenérgico (B3AR, sc1473; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); interleucina-6 (IL6, AB7737, Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK); receptor alfa ativado por proliferador do peroxisoma (PPAR α , CSB-945095; Cusabio, College Park, MD, EUA; e proteína de desacoplamento 1 (UCP1, CSB025554RESHu; Cusabio College, Park, EUA). Foi utilizado bloqueio primário, revelado com diaminobenzidina (Método de Detecção de Polímeros Novolink, RE7280-K, Leica Biosystems, Vista, CA, EUA), e contra corados com hematoxilina. As imagens digitais foram obtidas usando o microscópio Nikon 80i e uma câmera DS-Ri1 (Nikon Instruments, Inc., Melville, Nova Iorque, EUA).

2.9 Imunofluorescência e microscopia confocal de varredura a *laser*

As lâminas com os cortes previamente armazenados a -20°C foram retirados do freezer para ambientação, alocadas em câmara úmida e, em seguida, tratadas com solução de PBS-Triton a 0,3 % e bloqueadas com 5 % de albumina de soro bovino durante uma hora, imunomarcadas com os anticorpos primários NPY (PAA879Mu01) e POMC (ab32893) ou AgRP (sc-18634) e CART (PAA362Mu01) diluídos em PBS/BSA 1 %, permanecendo em refrigeração durante a noite. Na manhã seguinte, as amostras foram lavadas e imunomarcadas com um anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa 488 (NPY/AgRP) ou 546 (POMC/CART), contra corados com dicloridrato de 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Em seguida, as lâminas foram montadas com *slow-fade* (Invitrogen) com a finalidade de manter a fluorescência. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

Finalmente, os cortes duplamente marcados com NPY/POMC ou AgRP/CART foram identificados e as imagens foram obtidas em microscópio confocal de varredura a *laser* (Leica TCS-SPE; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e um atlas foi utilizado para auxiliar a observação da citoarquitetura das áreas do hipotálamo, compreendendo o ARC correspondente a região de bregma -1,23 mm a -2,79mm [93] ilustrada na figura 6.

Figura 6. Citoarquitetura das áreas do hipotálamo na região do núcleo arqueado (ARC).



Fonte: Paxinos e Franklin [93]

2.10 Western blotting

A proteína total do TAM foi extraída usando esferas de vidro e um tampão de lise (RIPA, composto por Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, desoxicolato de sódio 0,5 %, SDS 0,1 %, EDTA 1 mM, 1 nM NaF, 1 mM Na₃VO₄ e 1 mM PMSF) contendo inibidores, protease (P8340, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e fosfatase (P0044, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Quantidades equivalentes de proteína total foram aquecidas em tampão de amostra contendo SDS (Laemmli, Biorad; azul de bromofenol e beta mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 5 min a 100 °C e separados por SDS-PAGE. Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de transferência de difluoreto de polivinila (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

A membrana foi bloqueada por incubação com BSA e depois incubada com os anticorpos primários: beta-tubulina (sc-5274, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); B3AR (sc-1473, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); IL6 (AB7737, Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, Reino Unido); PPAR α (CSB-PA945095, Cusabio, College Park, MD, EUA); e UCP1 (sc-518024, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). A beta-tubulina serviu como controle de carga de proteínas.

A proteína total do hipotálamo foi extraída utilizando tampão de lise e inibidores de protease. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína foi determinada utilizando o kit BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e padronizada para 40 μ g. Após a desnaturação, a eletroforese separou as proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferiu-as para uma membrana de transferência de PVDF (n° 10600023 Amersham Hybond, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) 5 % diluído em tampão salino usando Tris (TBS-T, 20 mmol/L Tris/HCl, pH 7,4 e 500 mmol/L NaCl) em temperatura ambiente por uma hora para evitar ligação inespecífica. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários AGRP (sc-18634), CART (PAA362Mu01), GCGR (CSB-PA009316LA01HU), GLP1R (CSB-PA002699), NPY (PAA879Mu01), POMC (ab32893) e a beta-actina (sc-81178) foi utilizada como controle de carga de proteína.

No dia seguinte, cada membrana (TAM ou hipotálamo) foi incubada com o anticorpo secundário durante uma hora à temperatura ambiente. A expressão proteica foi analisada por quimioluminescência com reagente ECL e as imagens das bandas foram obtidas com

ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada utilizando o software FIJI ImageJ (v. 1.52p, NIH, ImageJ.nih.gov/ij, EUA).

2.11 RT-qPCR

As ilhotas pancreáticas isoladas, o TAM e os hipotálamos que foram previamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C , tiveram o RNA total extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, adicionou-se clorofórmio PA sobre o material e este foi centrifugado (12 min a 120 G a 4°C) para retirar resíduos de DNA remanescentes. Ao sobrenadante coletado, foi adicionado isopropanol e novamente centrifugado, desprezando-se o sobrenadante das amostras e adicionando-se álcool 70 % para purificar o material genético. Em seguida, o conteúdo foi descartado, acrescentando-se água deionizada para a ressuspensão do RNA. Finalmente, o material foi homogeneizado e levado ao banho seco por cinco minutos.

A concentração de RNA foi determinada usando a espectroscopia Nanovue (GE Life Sciences), e 1 μg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) para eliminar qualquer resíduo de DNA e depois foi adicionado EDTA para interromper a reação. A síntese do cDNA da primeira cadeia foi realizada usando iniciadores (*primers*) Oligo (dT) e transcriptase reversa *superscript III* (ambos de Invitrogen) a partir do mRNA e ao terminar a síntese, o material foi armazenado a -20°C . Para a análise, o material reservado foi previamente retirado do freezer para ambientação e uma mistura de água deionizada, *mix SYBR® Green* (Invitrogen) e *primer*, foi adicionada para que o DNA fosse amplificado e quantificado. Após a pré-desnaturação e ativação da polimerase por 4 minutos a 95°C , 40 ciclos foram realizados (90°C durante 10 segundos e 60°C por 15 segundos) seguido de uma curva de fusão (60 a 95°C com taxa de aquecimento de $0,1^{\circ}\text{C/s}$). Os controles negativos foram feitos em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada.

O PCR quantitativo (qPCR) usou um sistema termociclador CFX96 em tempo real (Biorad). Os *primers* para os respectivos tecidos (Tabela 2) foram projetados usando o *software* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). O *Tbp* (do inglês, *TATA-box-binding protein*) foi utilizado como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados. A eficiência do qPCR para o gene alvo e controle endógeno são aproximadamente iguais e foram calculados através de uma série de diluição de cDNA. A razão de expressão do mRNA foi

calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $-\Delta\Delta C_t$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes alvo e do controle endógeno [96]. A nomenclatura de genes e proteínas foi utilizada de acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura Genética Padronizada para Camundongos [97].

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados no qPCR

Gene	5'-3'	3'-5'
Ilhota pancreática		
<i>Adipoq</i>	TACTGCAACATTCCGGGACT	GTAGGTGAAGAGAACGGCCT
<i>Arx</i>	CACCCTAAGCCTACCCAGAG	TTGGCCCATACGATGCAATG
<i>Atf4</i>	GCCTTTCCGGGACAGATTG	GCTCATCTGGCATGGTTTCC
<i>Bcl2</i>	CTTCAGGGATGGGGTGAAC	ATCTCCCTGTTGACGCTCTC
<i>Casp3</i>	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC
<i>Chop</i>	TCACTACTCTTGACCCTGCG	GACTGGAATCTGGAGAGCGA
<i>Ctr</i>	ACTCCAGTCTTCAGGCTCC	GGCAACTGATGAATCCGGTC
<i>Gadd45</i>	GCAGAGCAGAAGACCGAAAG	TATCGGGGTCTACGTTGAGC
<i>Glp1r</i>	AGTCTAAGCGAGGGGAGAGA	GCAAGTGTCTGAAGCCAACA
<i>Gcg</i>	GATCATTCCCAGCTTCCAG	CTGGTAAAGGTCCCTTCAGC
<i>Glut2</i>	TCCCTGGGATGAAGAGGAGA	CACCCACCAAGAATGAGGC
<i>Iapp</i>	CATCCTCTCTGTGGCACTGA	TGCACTTCCGTTTGTCCATC
<i>Il6</i>	TTCTTGGGACTGATGCTGGT	CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA
<i>Irs1</i>	CTGCCGAAGATTCCTCTCT	GCAGCTGTGTCTACCTTTCG
<i>Lep</i>	TCAAGCAGTGCCTATCCAGA	CGACTGCGTGTGTGAAATGT
<i>Mafa</i>	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCA	GCACTTCTCGCTCTCCAGAA
<i>Neurod1</i>	GGTGCATCCCTACTCTACC	GGCTTTCAAAGAAGGGCTCC
<i>Ngn3</i>	CATCCAAGTGTCCCCAGAGA	TGGGGTGAATTGGAAGTGA
<i>Pax4</i>	GATCCAACACCAGCTTTGCA	GTTGAGTCCAGTGCAAGCTC
<i>Pax6</i>	CGGAGTGAATCAGCTTGGTG	CATGGGTCTGCAGAATTCGG
<i>Pcna</i>	GAGAGCTTGGCAATGGGAAC	AGGTACCTCAGAGCAAACGT
<i>Pdx1</i>	AGGAAAACAAGAGGACCCGT	GTTCAACATCACTGCCAGCT
<i>Ramp3</i>	TCTTCCACTGTTGTTGCTGC	GTTGCACCACTTCCAGACAG
<i>Tnfa</i>	GTGCCTATGTCTCAGCCTCT	GGTCTGGGCCATAGAAGTGA
TAM		
<i>Adrb3</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	TTAGCCACAACGAACACTCG
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
<i>Cidea</i>	TGGTGGACACAGAGGAGTTC	GTGACTCTGGCTATTCCCGA
<i>Nrf1</i>	GTTGGTACAGGGGCAACAGT	GTAACGTGGCCAGTTTTGT
<i>Pgc1a</i>	GCACCAGAAAACAGCTCCAA	ACACAGCTTGACAGGGATGA
<i>Ppara</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGA	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
<i>Tfam</i>	GAAGAACGCATGGAGGAGAG	TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTACGAC
<i>Vegfa</i>	CACGACAGAAGGAGAGCAGA	CACAGGACGGCTTGAAGATG
Hipotalamo		
<i>Agpr</i>	AGAAGACAACAGCAGACCGA	TCGCGGTTCTGTGGATCTAG
<i>Calcr</i>	ACTCCAGTCTTCAGGCTCC	GGCAACTGATGAATCCGGTC
<i>Gcgr</i>	CAGCTTATGAGTGCAGGCAG	AACCTTGGGAGACTACTGGC
<i>Glp1r</i>	AGTCTAAGCGAGGGGAGAGA	GCAAGTGTCTGAAGCCAACA
<i>Lep</i>	TCAAGCAGTGCCTATCCAGA	CGACTGCGTGTGTGAAATGT
<i>Lepr</i>	TGGATGGGGACGTTACCTTC	ATCAGGTGACAGTGTCCAGG
<i>Mc4r</i>	TACTCTGATGGAGGGTGC	TTGGCGGATGGCACCAGTGC
<i>Npy</i>	TCGCTCTATCTCTGCTCGTG	AGAGCGGAGTAGTATCTGGC
<i>Pomc</i>	GCTTGCAAACCTCGACCTCTC	TGACCCATGACGTACTTCCG
<i>Socs3</i>	CTCCAAAAGCGAGTACCAGC	GTCGCGGATAAGAAAGGTGC
<i>Sst</i>	GAGCCCAACCAGACAGAGAA	CATTGCTGGGTTCCAGTTGG
<i>Tac1</i>	CCAGATCAAGGAGGCAATGC	TGAGAGATCTGGCCATGTCC
Gene constitutivo		
<i>Tbp</i>	CAAACCTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCCAGAGC

Legenda: *Adipoq*, adiponectina; *Adrb3*, receptor beta-3 adrenérgico; *Agrp*, neuropeptídeo relacionado à agouti; *Arx*, homeobox relacionado a *aristales*; *Atf4*, ativador do fator de transcrição 4; *Bcl2*, leucemia/linfoma de células B 2; *Bmp8b*, proteína morfogenética óssea; *Calcr*, receptor de calcitonina; *Casp3*, caspase 3; *Chop*, transcrição 3 indutível por dano ao DNA; *Cidea*, ativador de morte celular; *Ctr*, receptor de calcitonina; *Gadd45*, parada do crescimento e indução de dano ao DNA 45; *Glp1r*, receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon; *Gcg*, glucagon; *Gcgr*, receptor de glucagon; *Glut2*, família de transportadores de soluto 2 (transportador de glicose facilitado), membro 2; *Iapp*, polipeptídeo amilóide de ilhotas; *Il6*, interleucina 6; *Irs1*, substrato 1 do receptor de insulina; *Lep*, leptina; *Lepr*, receptor de leptina; *Mafa*, família de oncogenes de fibrossarcoma musculoponeurótico *v-maf*, proteína A; *Mc4r*, receptor de melanocortina-4; *Neurod1*, diferenciação neurogênica 1; *Ngn3*, neurogenina 3; *Npy*, neuropeptídeo Y; *Nrf1*, fator nuclear respiratório 1; *Pax*, caixa pareada; *Pcna*, antígeno nuclear de células em proliferação; *Pdx1*, homeobox 1 pancreático e duodenal; *Pgc1a*, coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; *Pomc*, pró-opiomelanocortina; *Ppara*, receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; *Ramp3*, proteína 3 modificadora da atividade do receptor (calcitonina); *Socs3*, supressor da sinalização de citocina 3; *Sst*, somatostatina; *Tac1*, taquiquinina 1; *Tbp*, proteína de ligação à caixa TATA; *Tfam*, fator de transcrição mitocondrial; *Tnfa*, fator de necrose tumoral alfa; *Ucp1*, proteína desacopladora 1; *Vegfa*, fator de crescimento endotelial vascular A.

Fonte: A autora, 2024.

2.12 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP) após teste de Shapiro-Wilk para amostras pequenas e teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias. O teste t de Welch foi utilizado para comparar as diferenças entre os grupos C e HF até a 10^a semana. A análise de variância ANOVA bidirecional foi utilizada ao final do experimento, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (GraphPad Prism versão 10.1 para Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA). O nível de significância $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

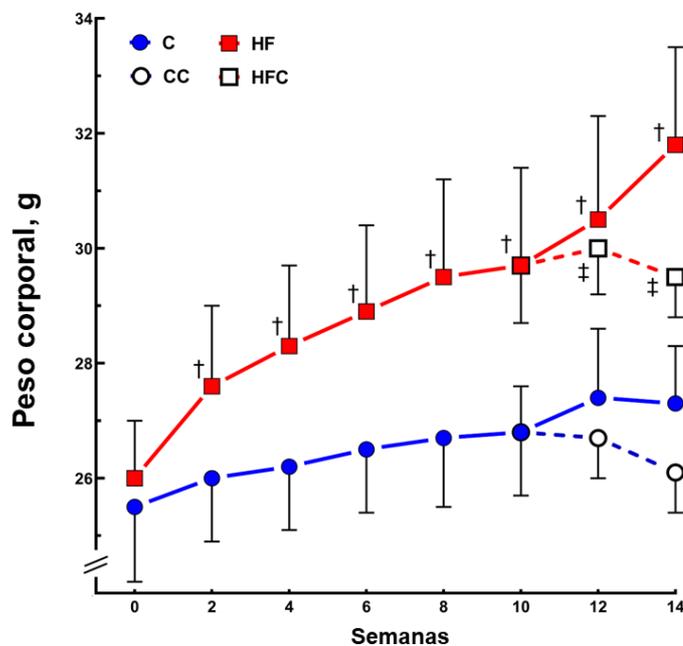
3 RESULTADOS

3.1 Pâncreas

3.1.1 Benefícios da cotadutida na perda de peso, ingestão alimentar e metabolismo de glicose em camundongos obesos

Inicialmente o peso corporal do grupo HF não teve diferença significativa quando comparado ao grupo C. Na 2ª semana o peso corporal aumentou em 6 % no grupo HF em contraste ao grupo C, continuando a aumentar até o final do experimento. Finalmente, na 14ª semana, o peso corporal foi 18 % maior no grupo HF do que no grupo C. No entanto, o peso corporal diminuiu 8 % no grupo HFC em comparação ao grupo HF (fig. 7).

Figura 7. Evolução do peso corporal



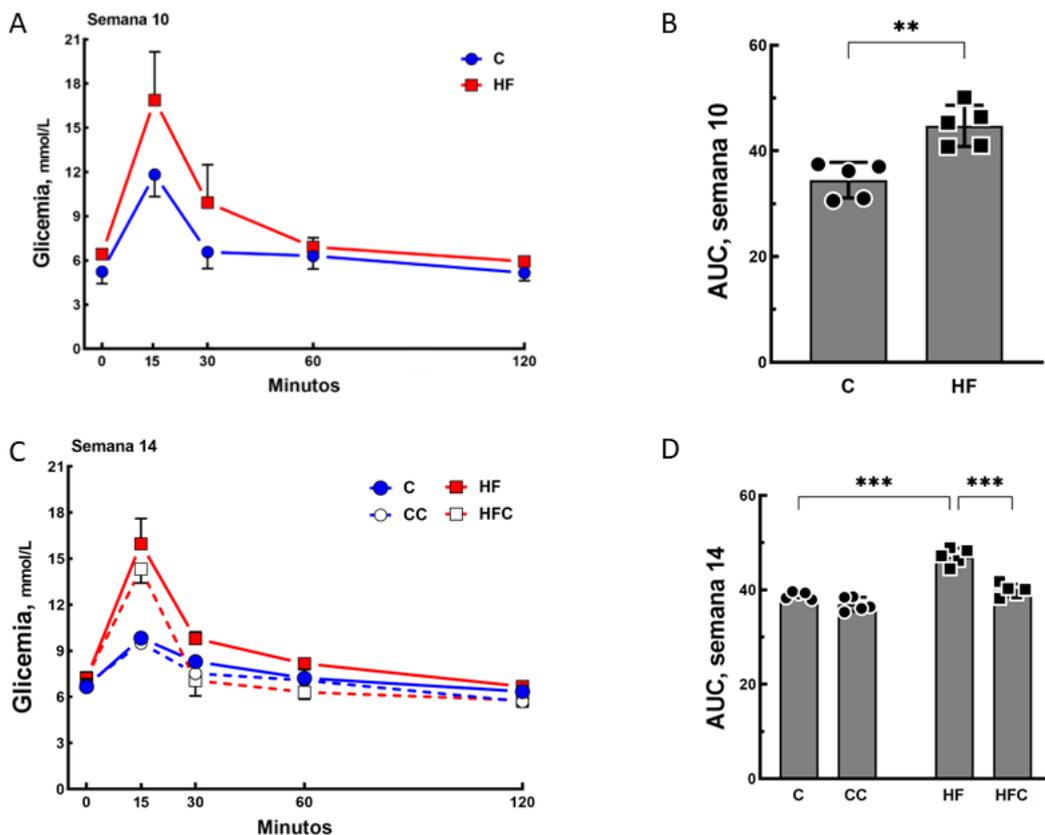
Legenda: (média \pm DP; 10ª semana, n = 20/grupo; 14ª semana, n = 10/grupo). Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. $P < 0,05$, quando $\dagger \neq C$ e $\ddagger \neq HF$.

Fonte: A autora, 2024.

Embora a ingestão alimentar tenha sido menor no grupo HF do que no grupo C antes da cotadutida (-17 %), a ingestão energética foi maior no grupo HF em comparação ao grupo C (+12 %). Além disso, as concentrações plasmáticas de TAG e CT aumentaram em HF vs. C, mas foram significativamente reduzidas em HFC vs. HF (Tabela 3).

Houve intolerância à glicose no grupo HF em comparação ao grupo C desde a 10ª semana (fig. 8A-B). No entanto, a intolerância à glicose diminuiu no grupo HFC vs. HF na 14ª semana (Fig. 8C-D). O peptídeo C, ligado à produção endógena de insulina, foi maior em HF vs. C (+150 %), mas menor em HFC vs. HF (-40 %). Além disso, o nível de insulina aumentou em HF vs. C (+30 %), mas diminuiu em HFC vs. HF (-25 %) (Tabela 3). De forma similar, o FIRi foi maior (+120 %) e o QUICKi foi menor (-12 %) em HF vs. C. No entanto, o FIRi foi menor (-30 %) e o QUICKi foi aumentado (+8 %) em HFC vs. HF (Tabela 3).

Figura 8. Teste oral de tolerância à glicose



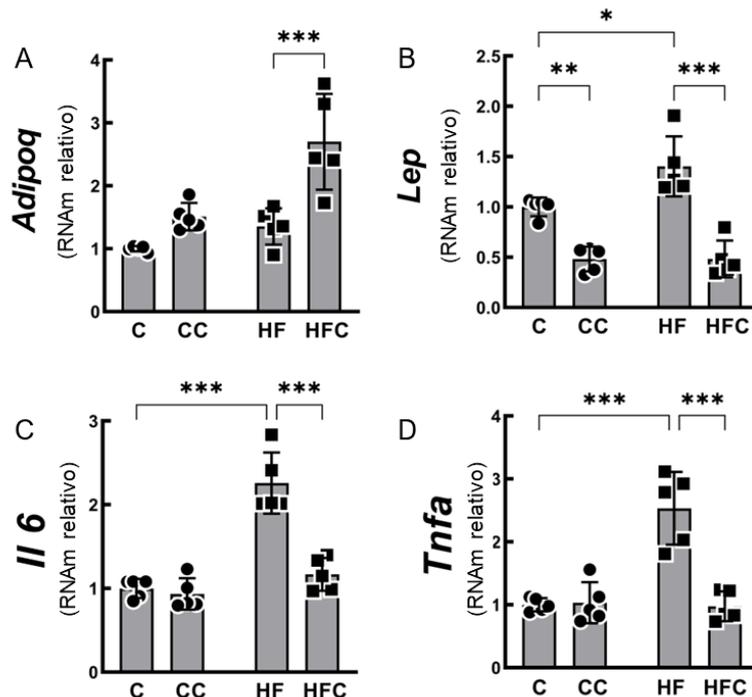
Legenda: A, Curvas de glicemia na semana 10; B, AUC na semana 10; C, Curvas de glicemia na semana 14; D, AUC na semana 14. Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2024.

3.1.2 Cotadutida melhora o metabolismo lipídico, os hormônios da saciedade e o perfil inflamatório

A adiponectina (-33 %) e a leptina (+200 %) foram alteradas no grupo HF em comparação ao grupo C, mas a leptina foi reduzida no HFC vs. HF (-65 %) (Tabela 3). A expressão do gene *Adipoq* foi maior em HFC vs. HF (+100 %, fig. 9A) e a expressão do gene *Lep* foi maior em HF vs. C (+40 %), mas diminuiu em HFC vs. HF (-65 %, fig. 9B). Além disso, *Il-6* (+126 %) e *Tnf-alfa* (+153 %) foram maiores em HF vs. C, mas reduzidos em HFC vs. HF (*Il-6*, -48 %; *Tnf-alfa*, -60 %) (fig. 9C-D).

Figura 9. Citocinas



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Nota: (expressões relativas de mRNA, média ± DP, n = 5/grupo). A, adiponectina; B, leptina; C, interleucina 6; D, fator de necrose tumoral alfa.

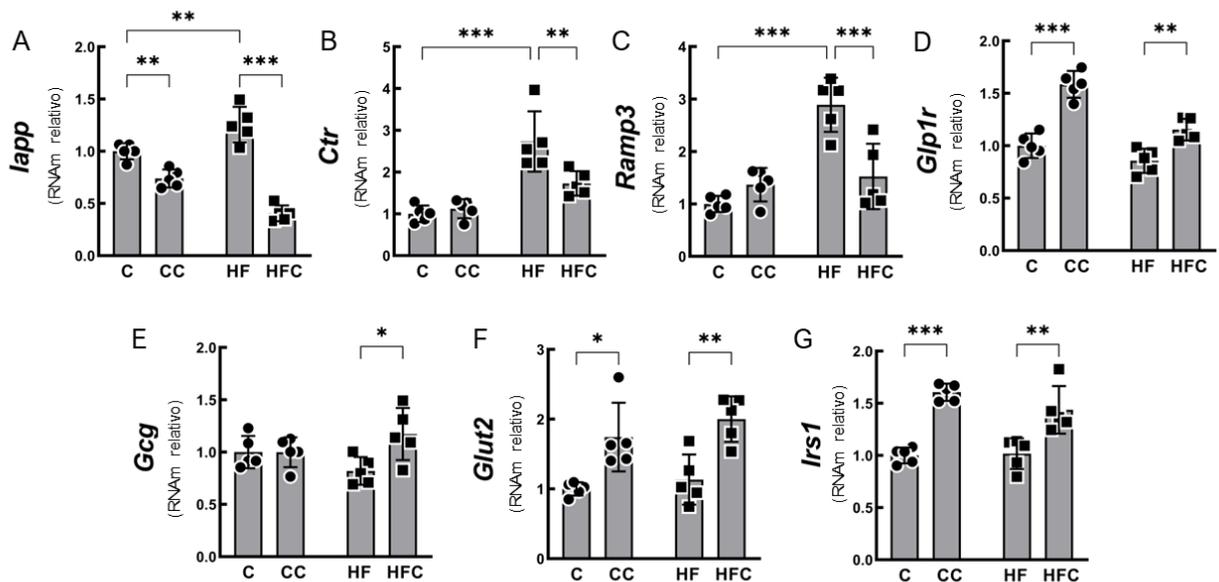
Fonte: A autora, 2024.

A amilina plasmática (polipeptídeo amilóide das ilhotas, IAPP, +24 %) e a expressão do gene *Iapp* (+25 %) foram aumentadas em HF vs. C, mas diminuíram em HFC vs. HF (-16 % e -68 %, respectivamente) e em CC vs. C (-30 %) na expressão gênica (Tabela 3 e fig.

10A). Além disso, as expressões funcionais do gene do receptor de amilina, *Ctr* (+173 %) e *Ramp3* (+190 %), foram maiores em HF vs. C e mais baixas em HFC vs. HF (*Ctr*, - 37 %; *Ramp3*, - 47 %; fig. 10B-C).

Ademais, o GLP-1 (total) foi menor em HF vs. C (-6 %), mas maior em HFC vs. HF (+18 %). O GLP-1 (ativo) também foi maior em HFC vs. HF (+28 %) (Tabela 3). Além disso, a expressão do gene *Glp1r* foi maior em HFC vs. HF (+35 %) e CC vs. C (60 %) (fig. 10D). O glucagon foi maior em HF vs. C (+52 %) e HFC vs. HF (+51 %) (Tabela 3), e a expressão do gene *Gcg* foi maior em HFC vs. HF (+43 %) (fig. 10E). Além disso, *Glut2* (+77 %) e *Irs1* (+41 %) foram maiores em HFC vs. HF e em CC vs. C (60 %) (fig. 10F-G). O polipeptídeo inibitório gástrico (GIP, +38 %), grelina (+22 %) e polipeptídeo pancreático (PPP, +76 %) foram maiores em HFC vs. HF. O peptídeo YY (PYY) não apresentou resultado significativo (Tabela 3).

Figura 10. Hormônios e receptores



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Nota: (expressões relativas de mRNA, média ± DP, n = 5/grupo). A, polipeptídeo amiloide de ilhotas; B, receptor de calcitonina; C, receptor (calcitonina) proteína modificadora de atividade 3; D, receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon; E, glucagon; F, membro 2 da família de transportadores de soluto 2 (transportador de glicose facilitado); G, substrato 1 do receptor de insulina.

Fonte: A autora, 2024.

Tabela 3. Ingestão alimentar, ingestão de energia, metabolismo de glicose e lipídios e hormônios da saciedade

Dados	C	HF		
Antes da cotadutida (10ª semana, n=20/grupo)				
IA (g/dia/animal)	3,0±0,03	2,5±0,27†		
IE (kJ/dia/animal)	48,2±0,55	54,1±5,42‡		
Data	C	CC	HF	HFC
Depois da cotadutida (14ª semana, n=10/grupo)				
IA (g/dia/animal)	3,1±0,02	3,0±0,01	2,9±0,23†	2,7±0,31
IE (kJ/day/mouse)	48,2±0,27	47,5±0,17	59,8±4,97†	55,7±6,68
C-peptídeo (pg/mL)	204,9±107,84	216,4±53,95	509,2±107,26†	293,5±93,82‡
Insulina (pMol/L)	12,6±1,63	11,9±0,69	20,7±2,74†	12,6±1,22‡
FIRi	3,4±0,36	3,3±0,35	7,0±0,90†	3,7±0,38‡
QUICKi	0,58±0,01	0,62±0,02	0,46±0,01†	0,57±0,01‡
Plasma (14ª semana, n=10/grupo)				
Adiponectina (10 ⁶ pg/mL)	12,25±1,15	12,60±0,54	8,14±1,15†	9,79±0,06
Amilina (pg/mL)	9,39±1,31	9,62±1,47	11,69±0,69†	9,84±0,83‡
Grelina (pg/mL)	2,44±0,34	2,97±0,43†	2,82±0,35	3,43±0,35‡
GIP (pg/mL)	167,39±36,98	184,95±33,54	149,91±29,72	249,84±31,60‡
GLP-1 (ativa) (pg/mL)	1,89±0,43	2,99±0,69†	2,31±0,23	2,96±0,53‡
GLP-1 (total) (pg/mL)	85,67±0,97	117,59±8,11†	80,29±6,23†	94,62±6,59‡
Glucagon (pg/mL)	8,81±0,96	11,96±2,41	13,41±2,67†	20,23±6,43‡
Leptina (10 ² pg/mL)	17,03±9,44	11,98±2,79	51,70±10,98†	18,55±5,96‡
PPP (pg/mL)	6,69±3,56	15,97±5,54†	6,97±1,69	12,29±4,43‡
PYY (pg/mL)	98,64±52,12	162,69±44,85†	154,58±38,52	193,45±55,32
TAG (mg/dL)	285,53±18,8	286,73±15,49	316,01±10,58†	285,83±15,97‡
TC (mg/dL)	47,68±3,10	47,94±1,59	56,38±1,94†	48,85±2,51‡

Legenda: auc, área sob a curva; CT, colesterol total; FIRi, índice de resistência à insulina em jejum; GIP, polipeptídeo inibitório gástrico; GLP-1, peptídeo-1 semelhante ao glucagon; IA, ingestão alimentar; IE, ingestão energética; PPP, polipeptídeo pancreático; PYY, peptídeo YY; QUICKi, índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina. TAG, triacilglicerol; TOTG, teste oral de tolerância à glicose.

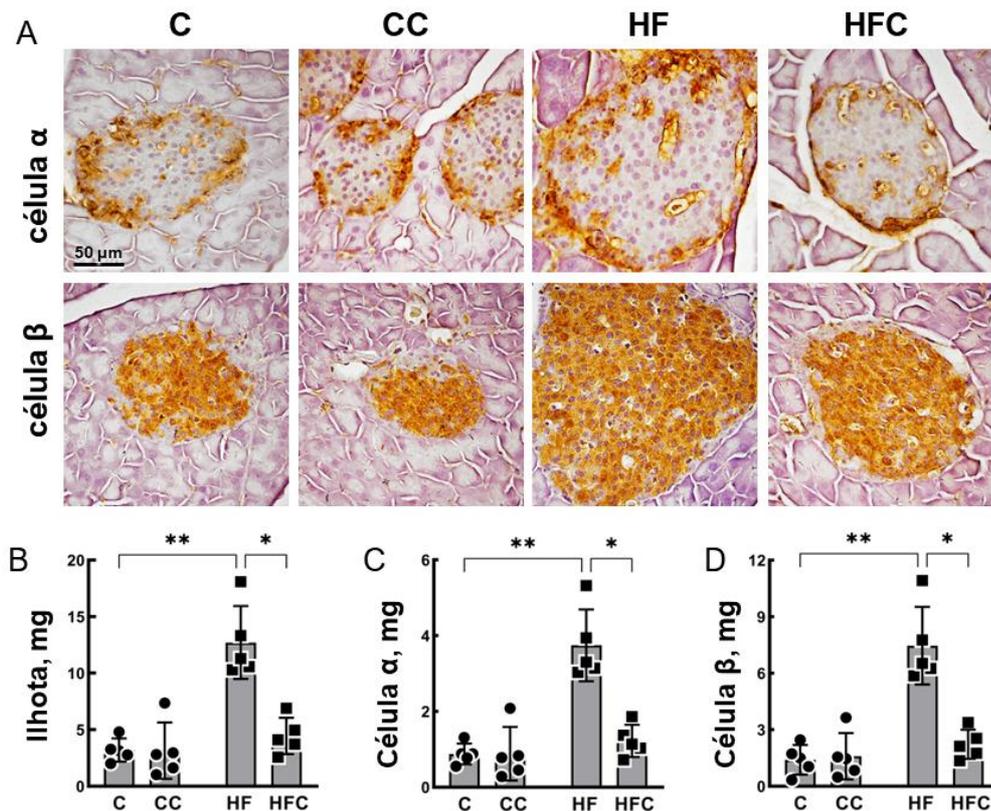
Nota: Os dados são apresentados como média e SD. Até a 10ª semana, as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste t de Welch. Em seguida, na 14ª semana, as diferenças foram testadas com ANOVA a dois fatores e teste de comparações múltiplas de Tukey (P<0,05) quando: †≠C, ‡≠HF. Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida.

Fonte: A autora, 2024.

3.1.3 Cotadutida diminuiu a massa hipertrofiada de células alfa e beta em camundongos obesos

As células alfa e beta das ilhotas marcadas com anticorpos anti-glucagon e anti-insulina, respectivamente, foram ilustradas na fig. 11A. As ilhotas estavam hipertrofiadas, comparando o grupo HF com os demais grupos. A massa de ilhotas se mostrou maior no grupo HF vs. C (+440 %), mas uma massa de ilhotas menor no HFC vs. HF (-71 %) (fig. 11B). As células alfa (+470 %, fig. 11C) e células beta (+508 %, fig. 11D) se mostraram quantitativamente maiores em HF vs. C, porém menores em HFC vs. HF (célula alfa, -27 %; célula beta, -76 %) (fig. 11C-D).

Figura 11. Ilhotas, células alfa e beta



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01.

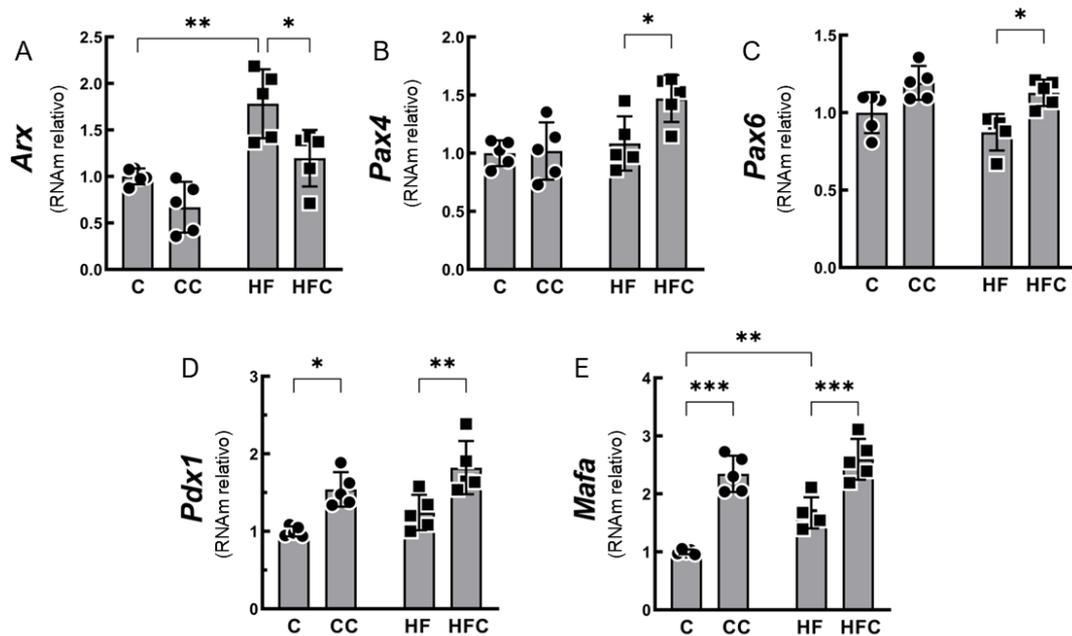
Nota: (média ± DP, n = 5/grupo). A, fotomicrografias de ilhotas marcadas com anti-glucagon (células alfa, periferia das ilhotas) e anti-insulina (células beta, centro das ilhotas) (mesma ampliação para todas as imagens); B, massa e diâmetro das ilhotas; C, massa de células alfa; D, massa de células beta.

Fonte: A autora, 2024.

3.1.4 Os marcadores de transcrição e proliferação de ilhotas foram aumentados e a apoptose foi diminuída pela cotadutida

O homeobox relacionado a aristaless (*Arx*) foi maior em HF vs. C (+78 %), mas menor em HFC vs. HF (- 15 %) (fig. 12A). As caixas pareadas 4 (*Pax 4*, +36 %) e 6 (*Pax 6*, +30 %) foram maiores em HFC vs. HF (fig. 12B-C). Além disso, o homeobox pancreático e duodenal (*Pdx1*, + 47 %) e a proteína A da família do oncogene do fibrossarcoma musculoponeurótico Vmaf (*Mafa*, + 55 %) foram aumentados em HFC vs. HF e em CC vs. C (*Pdx1*, + 50 %; *Mafa*, + 130 %) (fig. 12D-E).

Figura 12. Fatores transcripcionais



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

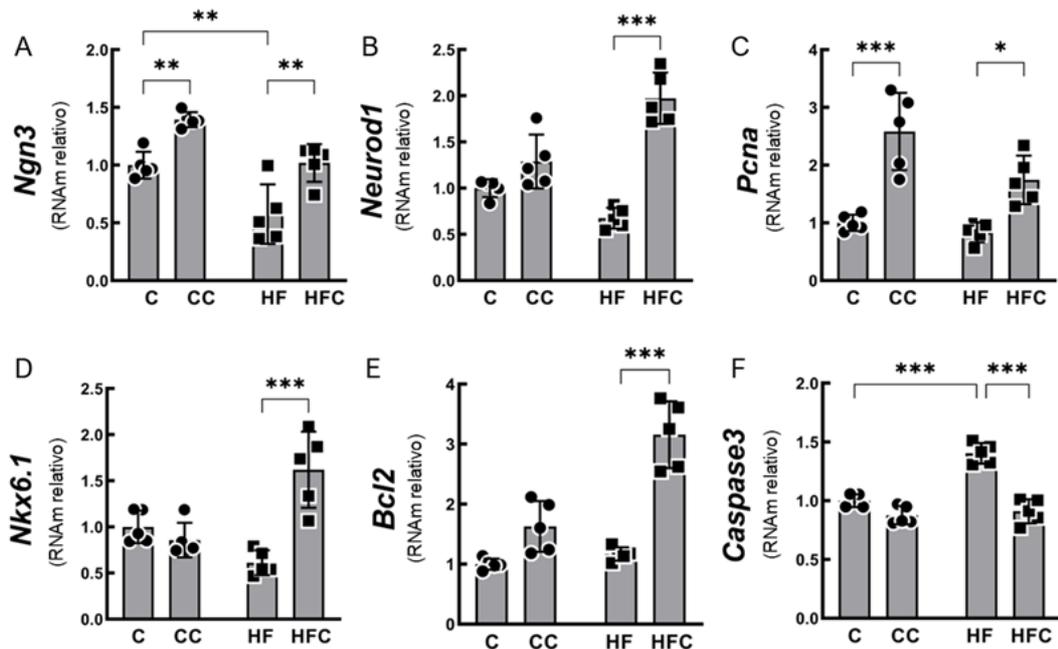
Nota: (expressões relativas de mRNA, média ± DP, n = 5/grupo). A, homeobox relacionado a aristaless; B, caixa pareada 4; C, caixa pareada 6; D, homeobox 1 pancreático e duodenal; E, proteína A da família do oncogene do fibrossarcoma musculoponeurótico v-maf

Fonte: A autora, 2024.

A expressão do gene neurogenina 3 (*Ngn3*) foi menor em HF vs. C (- 42 %), mas maior em HFC vs. HF (+77 %) e em CC vs. C (30 %) (fig. 13A). Além disso, a diferenciação neurogênica 1 (*Neurod1*) foi maior em HFC vs. HF (+190 %) (fig. 13B). Antígeno nuclear de células em proliferação (*Pcna*, +110 %), NK6 homeobox 1 (*Nkx6.1*, +165 %) e leucemia/linfoma celular

2 (*Bcl2*, +170 %) foram maiores em HFC vs. HF (fig. 13C-E). O *Pcna* também foi maior no grupo CC vs. C (165 %). Contrariamente, a expressão do gene Caspase 3 (*Casp3*) foi menor em HFC vs. HF (-35 %) (fig. 13F).

Figura 13. Fatores de transcrição, proliferação e apoptose



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

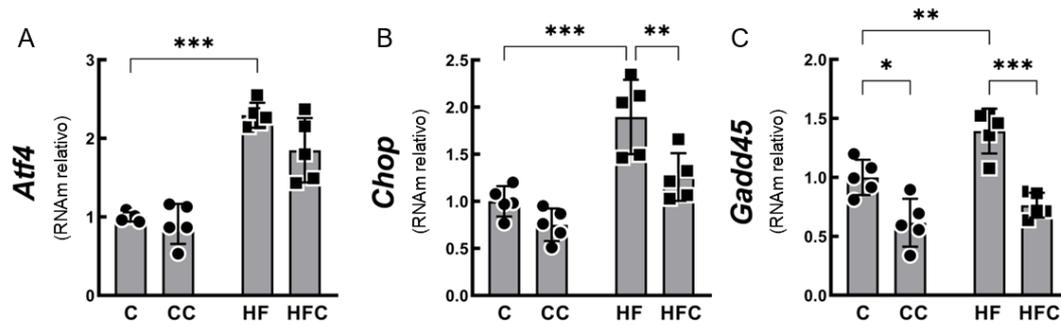
Nota: (expressões relativas de mRNA, média \pm DP, n= 5/grupo). A, neurogenina 3; B, diferenciação neurogênica 1; C, antígeno nuclear de células em proliferação; D, homeobox NK6 1; E, leucemia/linfoma de células B 2; F, caspase 3.

Fonte: A autora, 2024.

3.1.5 O estresse do retículo endoplasmático (RE) nas células das ilhotas foi mitigado pela cotadutida

Os marcadores de estresse RE foram maiores em HF vs. C (fator de transcrição ativador 4, *Atf4*, +130 %; transcrito 3 indutível por dano ao DNA, *Ddit3* ou *Chop*, +90 %; parada de crescimento e fator 45 indutível por dano ao DNA, *Gadd45*, +40 %) foram maiores em HF vs. C, mas menores em HFC vs. HF (*Chop*, -34 %; *Gadd45*, - 40 %) e em CC vs. C somente em *Gadd45* (- 40 %) (fig. 14A-C).

Figura 14. Fatores de estresse do retículo endoplasmático



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Nota: (expressões relativas de mRNA, média \pm DP, $n = 5$ /grupo). A, ativador do fator de transcrição 4; B, transcrito 3 indutível por dano ao DNA; C, interrupção do crescimento e indução de dano ao DNA 45.

Fonte: A autora, 2024..

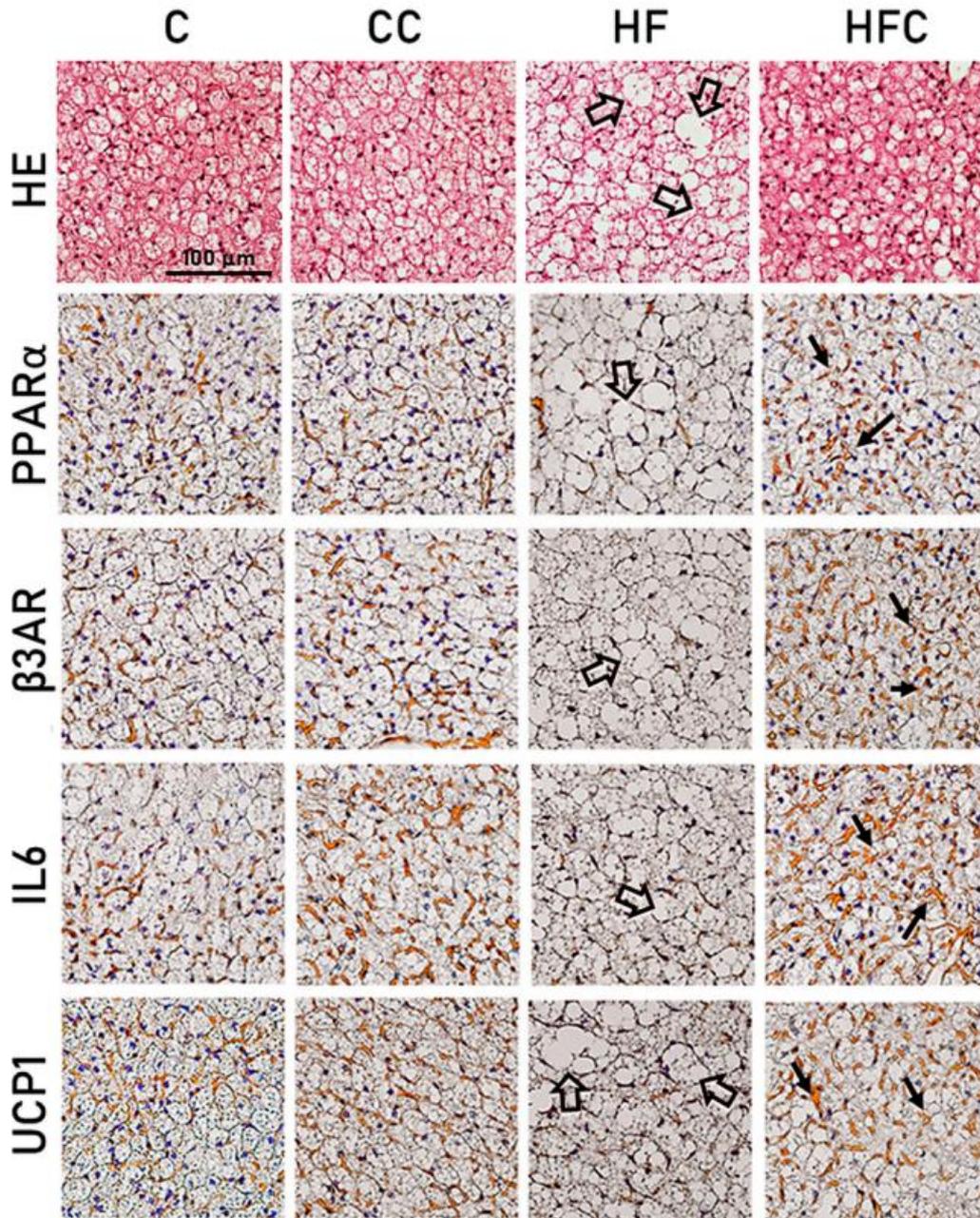
3.2 Tecido adiposo marrom interescapular (TAM)

3.2.1 Cotadutida regula marcadores termogênicos no TAM de camundongos obesos

A estrutura típica dos adipócitos marrons multiloculares observada nos grupos controle foi alterada com invasão de gordura, hipertrofia e desordem estrutural nos adipócitos marrons do grupo HF (“branqueamento”). A cotadutida recuperou à sua aparência multilocular regular no grupo HFC (fig. 15).

A marcação para PPAR α , β 3AR, IL6 e UCP1 diminuiu no grupo HF em comparação ao grupo C. No entanto, melhorou no grupo HFC em comparação ao grupo HF (fig. 15). Esses achados concordam com as expressões gênicas e proteicas, conforme demonstrado por PPAR α (fig. 16A-B), β 3AR (fig. 16C-D), IL6 (fig. 16E-F) e UCP1 (Fig. 16G-H), as quais foram diminuídas no grupo HF em comparação com o grupo C, mas aumentou no grupo HFC em comparação com o grupo HF.

Figura 15. Tecido adiposo marrom interescapular (TAM)

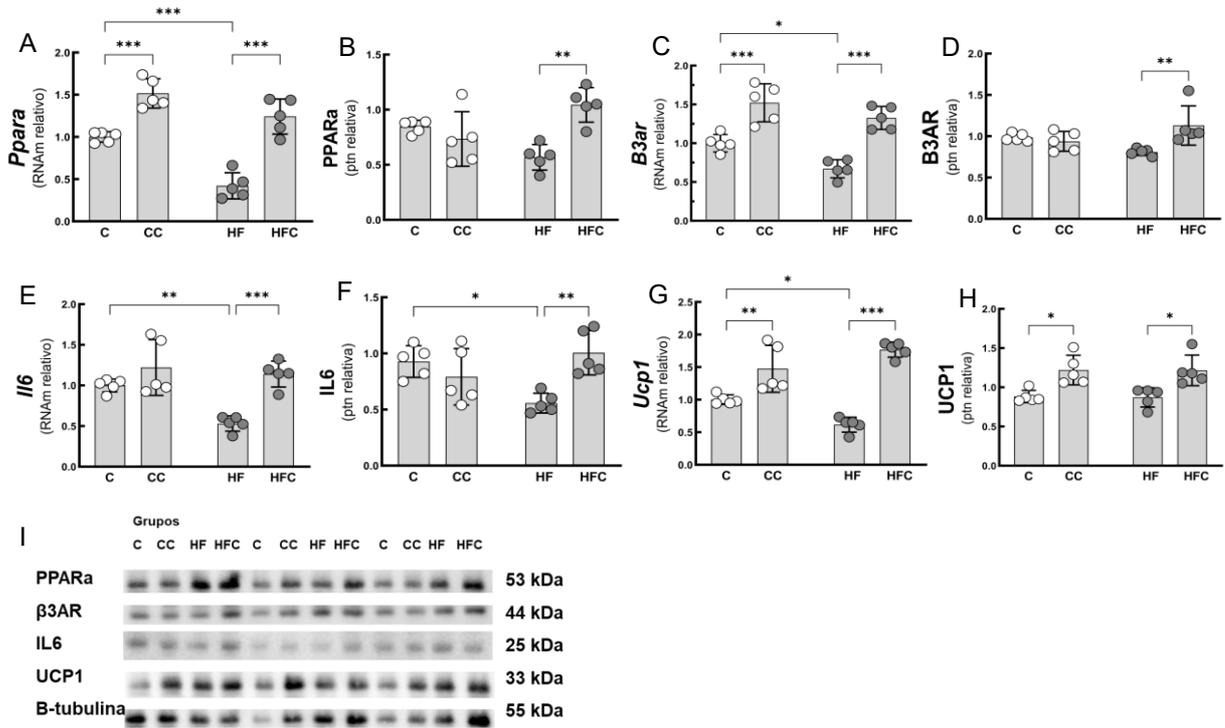


Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida.

Nota: Fotomicrografias representativas na mesma ampliação coradas por hematoxilina e eosina (HE) e marcadas para proteínas típicas do TAM: receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR α), receptor adrenérgico beta-3 (β 3AR), interleucina 6 (IL6) e proteína desacopladora 1 (UCP1). No grupo HF, o TAM foi invadido por gordura (setas vazadas), uma situação frequentemente descrita na obesidade e conhecida como “branqueamento”, que ocorre em paralelo com o declínio da imuno coloração das proteínas do TAM. Contudo, após o tratamento com cotadutida, estas proteínas aparecem mais marcadas no grupo HFC (setas pretas) e diminuição do “branqueamento”.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 16. Marcadores termogênicos do TAM



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

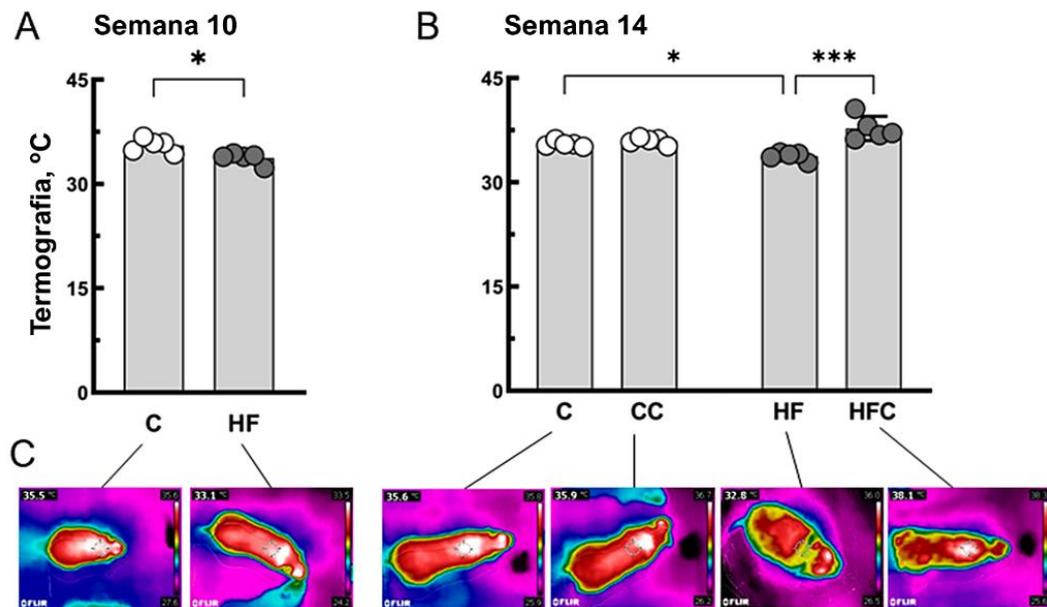
Nota: Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma, A - expressão de mRNA, B - expressão de proteína; receptor beta-3 adrenérgico, C - expressão de mRNA, D - expressão de proteína; Interleucina 6, E - expressão de mRNA, F - expressão de proteína; Proteína de desacoplamento 1, G - expressão de mRNA, H - expressão de proteína. I - Bandas representativas quantificadas por densitometria e apresentadas nas Figuras 2B, 2D, 2F e 2H. Os dados são apresentados como média \pm DP (n = 5/grupo).

Fonte: A autora, 2024.

3.2.2 Cotadutida aumenta a temperatura corporal de camundongos obesos

Antes do tratamento (10^a semana), a temperatura corporal foi menor no grupo HF em comparação com o grupo C (-5 %, Fig. 17A). No entanto, após o tratamento (14^a semana), a temperatura corporal foi maior no grupo HFC em comparação com o grupo HF (+12 %, Fig. 17B). As imagens infravermelhas termográficas ilustram a variação da temperatura corporal (Fig. 17C).

Figura 17. Termografia dorsal infravermelha



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Nota: As medidas foram realizadas em A, 10ª semana (antes do tratamento) e B, 14ª semana (após o tratamento). Os dados são apresentados como média \pm DP ($n = 5$ /grupo). C, Imagens termográficas representativas dos animais.

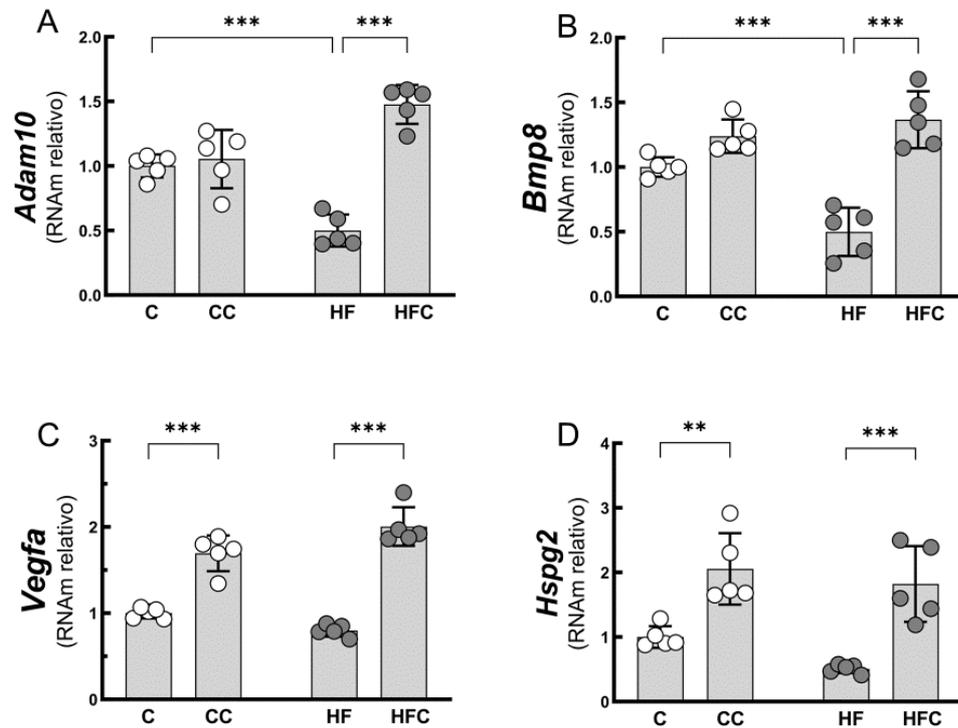
Fonte: A autora, 2024.

3.2.3 Cotadutida aumenta a termogênese e os marcadores de angiogênese no TAM interescapular de camundongos obesos

Os resultados foram semelhantes, e as expressões gênicas de *Adam10* (Fig. 18A) e *Bmp8* (Fig. 18B) foram reduzidas em 50% no grupo HF em comparação com o grupo C, mas aumentaram no grupo HFC em comparação com o grupo HF (+200% e +180%, respectivamente).

As expressões gênicas de *Vegfa* (Fig. 18C) e *Hspg2* (Fig. 18D) não mostraram diferença comparando C vs. HF. Contudo, a cotadutida melhorou a ação de ambos os genes em CC vs. C (*Vegfa*, +70%; *Hspg2*, +100%) e HFC vs. HF (*Vegfa*, +150%; *Hspg2*, +260%).

Figura 18. Termogênese do TAM interescapular e marcadores de angiogênese



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

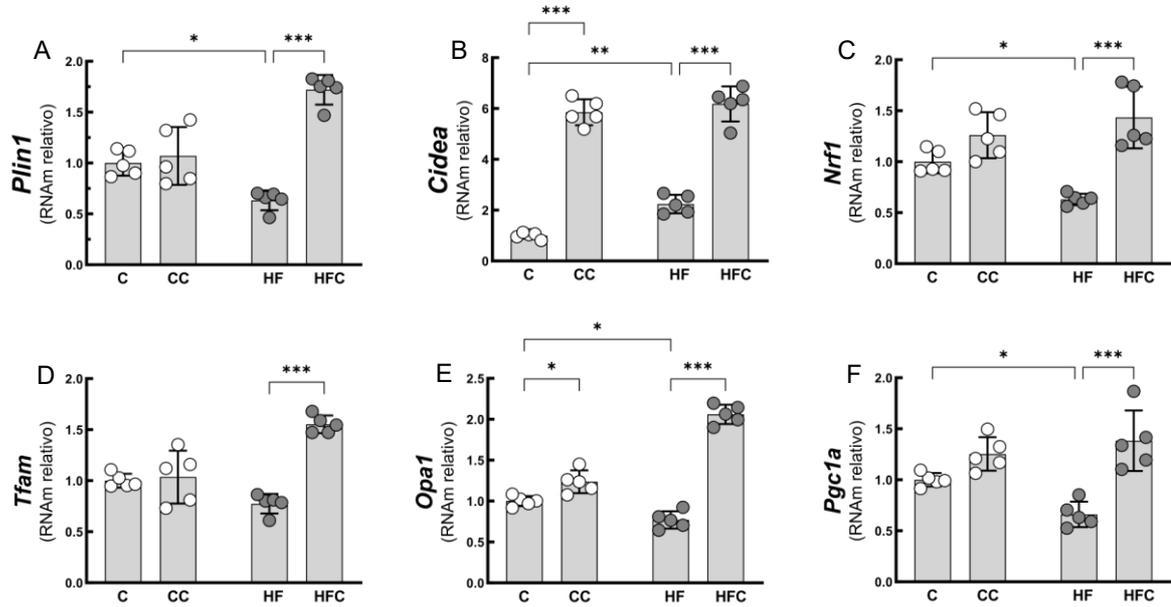
Nota: A, Desintegrina e domínio 10 da metalopeptidase; B, Proteína morfogenética 8a; C, Neuregulina 4; D, Fator de crescimento endotelial vascular A; E, Perlecan. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 5/grupo).

Fonte: A autora, 2024.

3.2.4 Cotadutida melhora lipólise e biogênese mitocondrial em TAM de camundongos obesos

A lipólise foi relacionada à *Plin1* e *Cidea*, enquanto a biogênese mitocondrial foi estudada através das expressões dos genes *Nrf1*, *Tfam*, *Opal* e *Pgcl1* (Fig. 19A-F). As expressões gênicas foram reduzidas no grupo HF em comparação ao grupo C e aumentadas no grupo HFC em comparação ao grupo HF, exceto para *Tfam*. *Tfam* não foi diferente em C vs. HF, mas aumentou em 100% HFC vs. HF (Fig. 5D). Além disso, a cotadutida também melhorou *Cidea* (Fig. 5B) e *Opal* (Fig. 5E) em CC vs. C.

Figura 19. Lipólise do TAM interescapular e marcadores de biogênese mitocondrial



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Nota: A, Perilipina 1; B, Fator alfa de fragmentação de DNA indutor de morte celular; C, Fator respiratório nuclear 1; D, Fator de transcrição A mitocondrial; E, GTPase mitocondrial tipo dinamina; F, Coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 5/grupo).

Fonte: A autora, 2024.

3.3 Hipotálamo

3.3.1 Efeitos da cotadutida nos neuropeptídeos hipotalâmicos anorexígenos e orexígenos

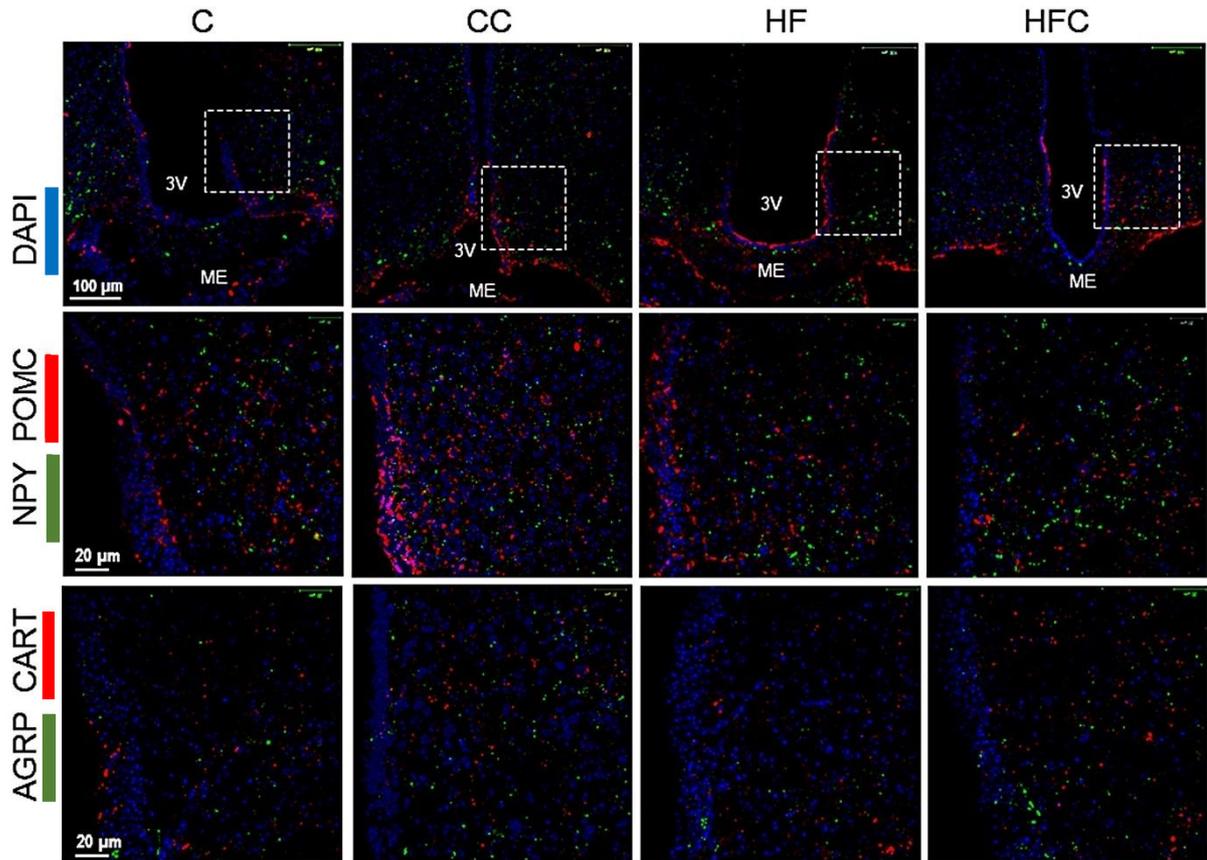
Os neurônios NPY/POMC e AGRP/CART foram duplamente marcados no ARC, ilustrando a expressão de neuropeptídeos no grupo HF e HFC (Fig. 20). Além disso, as análises de expressão gênica e proteica foram consistentes com o painel de imunofluorescência (Fig. 21).

Npy (Fig. 21A) foi menos expresso em HFC vs. HF (-42 %) e CC vs. C (-33 %). NPY e AGRP foram maiores em HF vs. C (NPY, +66 %; AGRP, +24 %) e menores em HFC vs. HF (NPY, -42 %; AGRP, -17 %) (Fig. 21B-C).

No entanto, o *Pomc* foi aumentado em CC vs. C (+88 %) e HFC vs. HF (+185 %) (Fig. 21D). A expressão da proteína POMC foi reduzida em HF vs. C (-34 %), enquanto POMC e CART aumentaram em HFC vs. HF (POMC, +47 %; CART, +77 %) (Fig. 21E-F). As bandas representativas estão ilustradas na Fig. 21G.

A dieta afetou as expressões das proteínas POMC e NPY; o tratamento afetou NPY e POMC. Dieta e tratamento interagiram, atuando sobre AGRP, NPY e CART. As expressões gênicas também foram afetadas pelo tratamento (*Npy*, *Pomc* e *Agrp*) (ANOVA de dois fatores, Tabela 4).

Figura 20. Imunofluorescência duplamente marcada de cortes coronais da região hipotalâmica

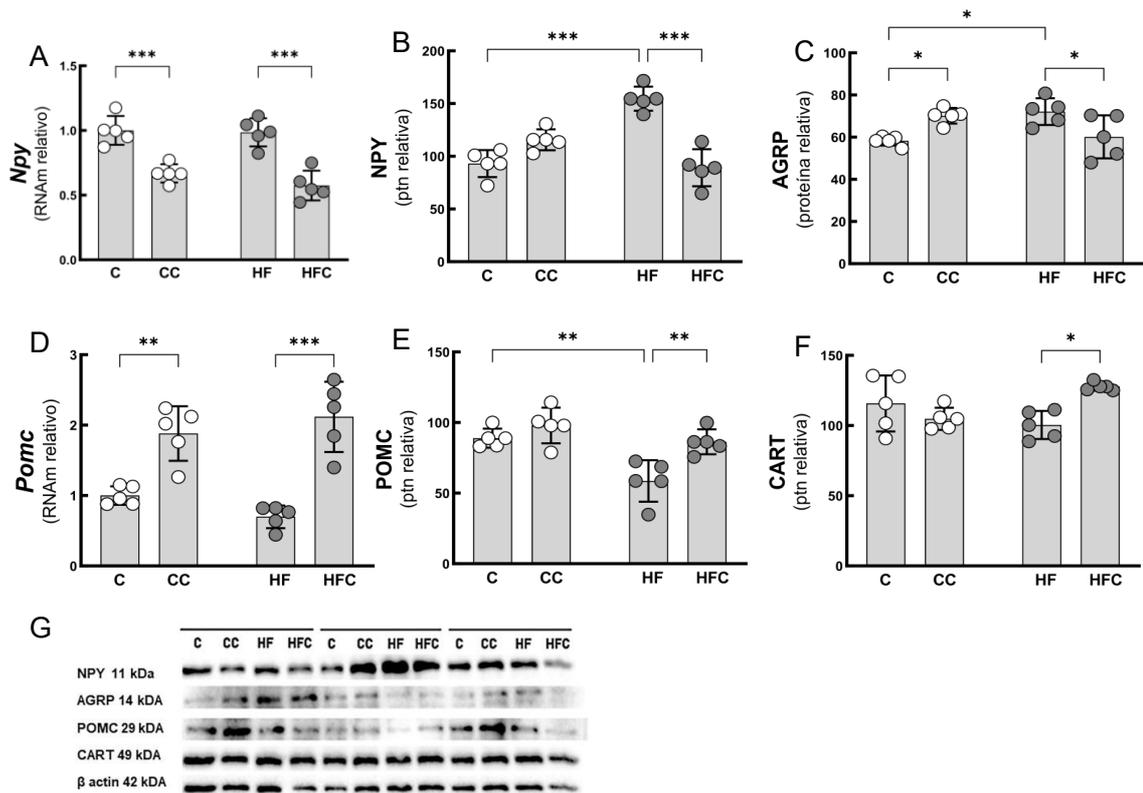


Legenda: AGRP, neuropeptídeo relacionado à agouti; CART, transcrição regulada por cocaína e anfetamina; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; NPY, neuropeptídeo Y; POMC, proopiomelanocortina. Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida.

Nota: Fileira superior: A visão panorâmica inclui o terceiro ventrículo (3v), a eminência mediana (ME) e a região do núcleo arqueado (a área delimitada é ampliada nas fileiras inferiores). Microscopia confocal de varredura a laser: verde NPY/AGRP (Alexa Fluor 488), vermelho POMC/CART (Alexa Fluor 546) e azul DAPI.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 21. Expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Nota: (gene e proteína) (média \pm DP, $n = 5$ /grupo). A, *Npy* (neuropeptídeo Y); B, NPY; C, AGRP (neuropeptídeo relacionado à agouti); D, *Pomc* (pró-opiomelanocortina); E, POMC; F, CART (transcrição regulada por cocaína e anfetamina); G - Bandas representativas.

Fonte: A autora, 2024.

3.3.2 A cotadutida altera o equilíbrio energético através dos hormônios e dos seus receptores

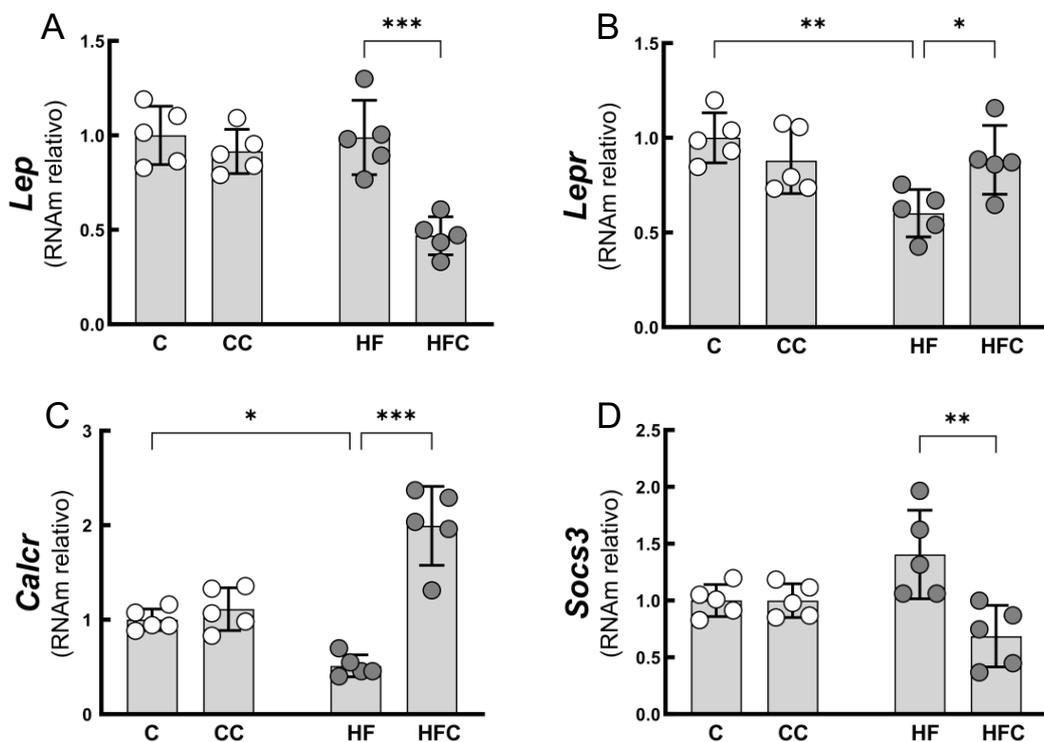
Lep foi menor em HFC vs. HF (-53 %, Fig. 22A), *Lepr* (-40 %) e *Calcr* (-49 %) foram diminuídos em HF vs. C), mas aumentou em HFC vs. HF (Fig. 22B-C). Além disso, o *Socs3* diminuiu em HFC vs. HF (-51 %, Fig. 22D).

A expressão do gene *Sst* foi maior em CC vs. C (+100 %) e HFC vs. HF (+96 %, Fig. 23A). *Tac1* e *Mc4r* foram menores em HF vs. C (*Tac1*, -49 %; *Mc4r*, -60 %), mas aumentaram em HFC vs. HF (*Tac1*, +100 %; *Mc4r*, +98 %, Fig. 23B-C).

As expressões dos genes *Glp1r* (+63 %) e *Gcgr* (+50 %) foram maiores em HFC vs. C. O *Glp1r* também foi aumentado em CC vs. C (Fig. 24A-C). Além disso, a expressão da proteína GLP1R aumentou em HFC vs. HF (+41 %), e o GCGR diminuiu em HF vs. C. No entanto, o

GCGR aumentou em HFC vs. HF (+96 %) e o CC foi discretamente menor que o C (-15 %) (Fig. 24B-D). As bandas representativas estão ilustradas na Fig. 24E. A dieta alterou a expressão da proteína GCGR. O tratamento afetou GCGR e GLP1R. Dieta e tratamento interagiram com GCGR e GLP1R. A dieta afetou as expressões gênicas de *Glp1r*, *Lep*, *Mc4r*, *Sst* e *Tac1*. O tratamento afetou as expressões gênicas de *Calcr*, *Glp1r*, *Lep*, *Sst*, *Tac1* e *Socs3*. Dieta e tratamento interagiram em relação às expressões gênicas (ANOVA de dois fatores, Tabela 4).

Figura 22. Expressão gênica hipotalâmica

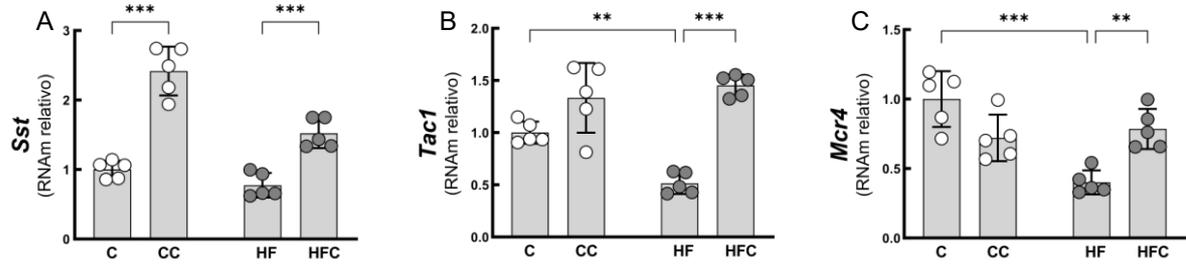


Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Nota: (média \pm DP, n = 5/grupo). A, *Lep* (leptina); B, *Lepr* (receptor de leptina); C, *Calcr* (receptor de calcitonina); D, *Socs33* (supressor da sinalização de citocinas 3).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 23. Expressão gênica hipotalâmica

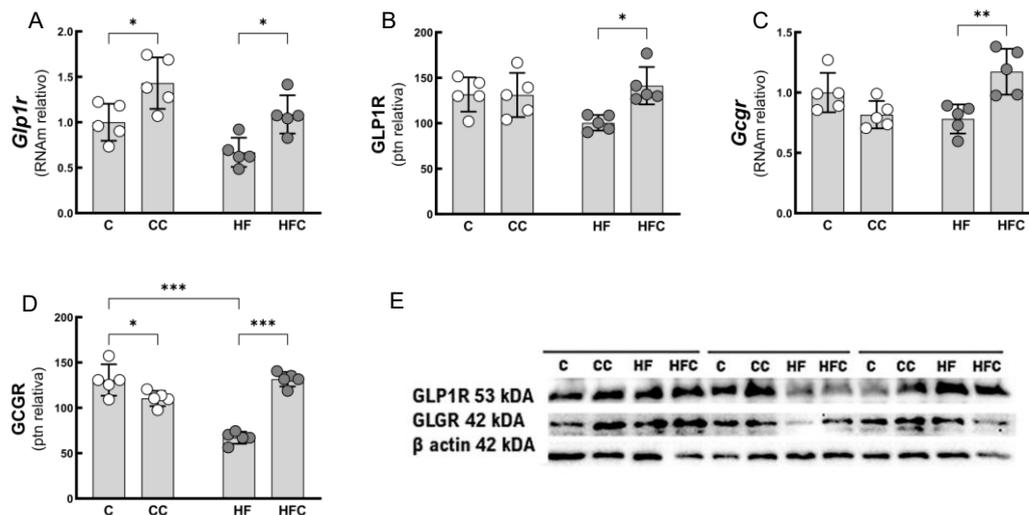


Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Nota: (média \pm DP, n = 5/grupo). A, *Sst* (somatostatina); B, *Tac1* (taquicinina 1); C, *Mc4r* (receptor de melanocortina-4).

Fonte: A autora, 2024.

Figura 24. Expressão de proteínas e genes hipotalâmicos



Legenda: Grupos: C, controle; CC, controle + cotadutida; HF, alto teor de gordura; HFC, alto teor de gordura + cotadutida. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Nota: (média \pm DP, n = 5/grupo). A, *Glp1r* (receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1); B, *GLP1R*; C, *Gcgr* (receptor de glucagon); D, *GCGR*; E, Bandas representativas.

Fonte: A autora, 2024.

Tabela 4. Análise de variância de dois fatores

Dados	% de variação e teste de significância					
	Dieta		Cotadutida		Dieta vs. Cotadutida	
	%	P-valor	%	P-valor	%	P-valor
Proteína						
AGPR	1,32	ns	0,001	ns	51,54	<0,001
CART	1,62	ns	7,40	ns	40,66	0,002
GCGR	14,43	<0,001	15,56	<0,001	57,68	<0,001
GLP1R	5,23	ns	19,32	0,030	20,38	0,030
NPY	9,36	0,009	14,07	0,002	59,34	<0,001
POMC	34,78	<0,001	26,68	0,002	6,98	ns
Gene						
<i>Agrp</i>	9,81	ns	37,14	0,003	3,90	ns
<i>Calcr</i>	2,86	ns	47,27	<0,001	34,82	<0,001
<i>Gcgr</i>	2,79	ns	6,35	ns	48,55	<0,001
<i>Glp1r</i>	25,51	0,003	40,25	<0,001	0,01	ns
<i>Lep</i>	20,08	0,003	35,19	<0,001	18,19	0,004
<i>Lepr</i>	23,78	0,010	3,96	ns	24,96	0,010
<i>Mc4r</i>	27,27	0,001	1,05	ns	42,15	<0,001
<i>Npy</i>	1,67	ns	78,68	<0,001	0,90	ns
<i>Pomc</i>	0,06	ns	75,63	<0,001	4,13	ns
<i>Socs3</i>	0,45	ns	27,32	0,007	27,23	0,007
<i>Sst</i>	17,79	<0,001	66,08	<0,001	6,35	0,005
<i>Tac1</i>	5,20	0,050	62,73	<0,001	14,21	0,003

Legenda: *Agrp*, neuropeptídeo relacionado a agouti; *Calcr*, receptor de calcitonina; *Gcgr*, receptor de glucagon; *Glp1r*, receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon; *Lep*, leptina; *Lepr*, receptor de leptina; *Mc4r*, receptor de melanocortina-4; *ns*, não significativo; *Npy*, neuropeptídeo Y; *Pomc*, pró-opiomelanocortina; *Socs3*, supressor da sinalização de citocinas 3; *Sst*, somatostatina; *Tac1*, taquiquinina 1.

Fonte: A autora, 2024.

4 DISCUSSÃO

A dose foi escolhida com base em estudo prévio que comparou as doses diárias subcutâneas de 10 nmol/kg e 30 nmol/kg de peso corporal. Os resultados desse estudo mostraram TOTG semelhantes para ambas as doses, enquanto o peso corporal foi reduzido em 30 % e 21 % com as doses de 30 nmol/kg e 10 nmol/kg de peso, respectivamente [88]. Portanto, usamos a dose de 30 nmol/kg de peso corporal durante quatro semanas para tratar nossos animais para maximizar as respostas metabólicas à cotadutida. Além disso, de acordo com o estudo citado, esta dose está dentro de um intervalo seguro em termos de tolerabilidade pelos animais.

No estudo, os animais ganharam peso e apresentaram alterações metabólicas ao consumir uma dieta com alto teor de gordura. Entretanto, perderam peso e controlaram seu metabolismo após o tratamento com cotadutida, mesmo mantendo a dieta hiperlipídica.

Concentrações elevadas de leptina circulante caracterizam obesidade em paralelo a baixos níveis de adiponectina, como encontrado em nosso modelo animal. A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória e o peptídeo mais abundante secretado pelos adipócitos, cuja depleção desempenha papel de destaque em doenças relacionadas à obesidade [98]. Além disso, a leptina é um potencial marcador de complicações relacionadas à obesidade, incluindo resistência à insulina/DM2 e doença cardiovascular [99]. A cotadutida aumentou os níveis de adiponectina e diminuiu os níveis de leptina, em concordância com a literatura [88].

A cotadutida atenuou os altos níveis de TNF-alfa e IL-6 em nossos camundongos obesos, um achado significativo, uma vez que o TNF-alfa está ligado à resistência à insulina na obesidade [100]. Além disso O IAPP está relacionado à disfunção das células beta e ao DM2 devido à sua capacidade de se agregar em espécimes amiloides através de receptores de amilina [101]. Nosso grupo HF apresentou aumento do IAPP e de seus receptores, e cotadutida reduziu a amilina plasmática e o gene do *Iapp*.

O aumento da secreção de incretinas melhorou a função das células beta e a ação da insulina, corroborando com relatos anteriores que mostram que terapias baseadas em incretinas levam à preservação a longo prazo das células beta melhorando sua função, os níveis de peptídeo C em jejum e diminuindo a resistência à insulina e glicemia de jejum [102]. Além disso, a cotadutida utiliza o eixo incretina e a secreção de insulina estimulada por glicose através da sinalização do AMPc para hormônios secretados pelas células enteroendócrinas intestinais em resposta à ingestão alimentar [64]. Ademais, o GLP-1 promove ações glicorregulatórias por

aumentar a secreção de insulina estimulada por glicose, levando à saciedade e perda de peso [103]. A cotadutida aumentou o GLP-1 total e ativo e houve uma maior expressão gênica do *Glp1r*.

O GIP potencializa a secreção de insulina estimulada por glicose pelas células beta em indivíduos não diabéticos, mas esse efeito é diminuído no DM2 [104]. Além disso, o GIP estimula a secreção de glucagon de forma dose-dependente pelas células alfa pancreáticas sob concentrações basais de glicose [105]. Camundongos transgênicos com superexpressão de GIP melhoraram a função das células beta, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, protegendo os animais da obesidade induzida por dieta [106, 107]. Ademais, o GIP estimula a secreção de PPP, um hormônio das ilhotas que regula o apetite, a motilidade intestinal e a glicemia [108].

A limitação do volume de sangue (cerca de 1 mL) em camundongos C57BL/6 maduros e o tempo necessário para restaurar o volume sanguíneo após uma coleta de sangue ligeiramente maior (pelo menos 15 dias) impedem a repetição de exames de sangue de GLP-1, GIP e glucagon durante o experimento. Sabemos que os testes de jejum são insuficientes para avaliar o impacto da cotadutida sobre esses hormônios em resposta à ingestão alimentar. No entanto, incretinas medidas no sacrifício indicaram aumento do GIP, PPP e glucagon devido ao tratamento com cotadutida.

Normalmente, os níveis plasmáticos de grelina são mais baixos em indivíduos com obesidade do que em indivíduos magros [109]. No entanto, existem duas formas de grelina circulante, uma maior porcentagem de grelina inativa e uma menor porcentagem de grelina acilada ativa [110], o que limitou a interpretação dessa avaliação. No entanto, nossos animais HFC apresentaram níveis de grelina circulante aumentados em relação aos animais HF.

A função da célula beta pode ser prejudicada devido aos altos níveis de glicose e lipídios, levando à resistência à insulina [111]. Nossos animais HFC mostraram níveis reduzidos de TAG e CT, como relatado em humanos (ensaio clínico 2b com cotadutida) [76].

O peptídeo C é um marcador para detectar o nível de insulina endógena e função das células beta, pois o fígado não a degrada [112]. A sinalização de insulina via IRS-1/PI 3-quinase desempenha um papel na secreção de insulina pelas células beta [113]. Uma alteração de Gly→Arg no códon 972 na variante IRS-1 mais prevalente é comum entre pacientes com DM2, e os portadores da substituição Arg972 têm menos níveis de insulina de jejum e peptídeo C em comparação com indivíduos saudáveis [114]. Nossos animais HFC apresentaram menor peptídeo C, glicemia e resistência à insulina, consistente com um estudo pré-clínico de

cotadutida em roedores e primatas não-humanos [88] e um estudo randomizado, controlado e duplo-cego de fase 2a em indivíduos com obesidade e DM2 [78].

Além disso, cotadutida melhorou *Irs1* e *Glut2*. O *Glut2* (ou membro 2 da família transportadora de solutos ou *Slc2a2*) é altamente expresso em células beta e tem alta afinidade pela glicose. Além disso, o *Glut2* proporciona um rápido equilíbrio de glicose entre o meio extracelular e intracelular, controlando a taxa de metabolismo da glicose na etapa de fosforilação da glicose [115]. Observamos um aumento na expressão gênica de *Glut2* e *Irs1* tanto nos animais controle quanto nos obesos tratados com cotadutida.

A hipertrofia das ilhotas é um achado comum em camundongos DIO devido ao aumento da secreção de hormônios das células alfa e beta tentando manter a homeostase metabólica [116, 117]. A massa de células alfa e beta está diretamente relacionada à resistência e sensibilidade à insulina, pois *FIRi* aumenta e *QUICKi* diminui à medida que o DM2 se desenvolve e a secreção de insulina se torna deficiente [118]. O armazenamento de insulina é dado pelo equilíbrio entre a síntese e a secreção de insulina, que se correlaciona com o volume e o número de células beta [119].

Além disso, as incretinas desempenham um papel vital na função das ilhotas, incluindo a secreção de insulina e a manutenção da massa de células beta [120]. No presente estudo, o tratamento com cotadutida mostrou um papel na atenuação da alteração das ilhotas em camundongos HF, ligada à redução da resistência à insulina e aumento da sensibilidade à insulina, o que leva à redução da hipertrofia das ilhotas. Além disso, melhorias nos fatores de transcrição das ilhotas e nos marcadores de proliferação são esperadas quando a massa da célula beta é diminuída. A expressão gênica transcricional e dos marcadores de proliferação das ilhotas depende do equilíbrio de genes expressos e reprimidos, o que pode influenciar a função da célula beta [121].

A regeneração das células beta pode ser facilitada utilizando as próprias células intrínsecas do organismo, incluindo células acinares do tecido pancreático exócrino e células imaturas e pré-alfa. Essa abordagem busca controlar o DM2 ao promover a regeneração endógena das células beta no pâncreas [122, 123]. Dessa forma, *Arx* e *Pax4* afetam as células beta em ações opostas, uma vez que a superexpressão de *Pax4*, ou a supressão de *Arx*, promove a transdiferenciação de células alfa em beta [2]. Além disso, outros marcadores transcripcionais contribuem para a transdiferenciação, como *Mafa* e *Pdx1* [10]. A cotadutida melhorou *Pax4*, *Pax6*, *Mafa* e *Pdx1* e diminuiu *Arx*, consistente com os diferentes efeitos de *Pax4* e *Arx* na célula beta. Além disso, em concordância com nossos achados, *Pdx1* e *Mafa* participam da transcrição do gene da insulina em resposta à glicose [124].

Ngn3 ativa a expressão transcricional de Neurod1 e determina o destino das células endócrinas pancreáticas. Neurod1 é o alvo *downstream* de Ngn3, uma vez que os membros da família de neurogeninas são expressos antes de Neurod1 em domínios sobrepostos ou adjacentes [125, 126]. Além disso, a deleção Neurod1 prejudica a expressão de fatores transcricionais para diferenciação, proliferação, secreção de insulina e formação de ilhotas pancreáticas de células alfa e beta [127]. A cotadutida aumentou *Ngn3* e *Neurod1* em nossos animais obesos.

Pdx1 e Nkx6-1 são fatores transcricionais determinantes da geração funcional de células beta. Portanto, a desregulação de Nkx6-1 pode desempenhar um papel no DM2, uma vez que a deficiência de Nkx6-1 suprime Glut2 e Glp1r em ilhotas de camundongos, inibindo a proliferação de células beta [128]. Em concordância com os presentes achados, o Pdx1 ajuda a regular o ciclo celular, a proliferação e a função das células beta [129]. Além disso, a via BAX/BCL2/CASPASE3 está ligada à apoptose, e cotadutida aumenta *Bcl2* (antiapoptótico) e diminui *Caspase3* (proapoptótico) em nossos camundongos obesos.

Os fatores de transcrição ativadores (ATFs) constituem uma subclasse de proteínas pertencentes à família da proteína de ligação ao elemento de resposta ATF/AMPC. Exemplos incluem ATF4 e ATF5, cuja regulação positiva tem sido associada ao aumento do estresse do RE em ilhotas pancreáticas de camundongos obesos e diabéticos [130]. Além disso, é reconhecido que o estresse do RE pode precipitar a senescência das células beta, o que contribui para a disfunção dessas células e resulta em desequilíbrios na homeostase da glicose [5, 131]. Nossos resultados evidenciam os efeitos favoráveis da cotadutida sobre os marcadores de estresse do RE, tais como *Atf4*, *Chop* e *Gadd45*, indicando uma redução do estresse do RE nas ilhotas pancreáticas de nossos animais obesos, em consonância com achados anteriores na literatura [10].

O tecido adiposo visceral é conhecido por ser um órgão endócrino ativo que contribui fortemente para a resistência à insulina. Por outro lado, o TAM tem potencial para mitigar a resistência à insulina e distúrbios na glicose [132]. O acúmulo de gordura na obesidade leva ao clareamento do TAM, acompanhado de intolerância à glicose e resistência à insulina [133, 134].

O clareamento leva à regulação negativa das funções metabólicas do TAM, enquanto o escurecimento (do inglês, *browning*) leva ao aumento do gasto energético e da composição lipídica, aumento da sensibilidade à insulina e perda de peso [135, 136]. Henderson et al. (2016) anteriormente relataram os efeitos da calorimetria indireta (Oxylet) em um estudo experimental, demonstrando um aumento no gasto energético em camundongos DIO [88]. Um estudo recente

mostra o protocolo de termografia como método de escolha por ser um método não ionizante, não invasivo, repetível, seguro e mais sensível para o estudo da termogênese [137], já testado em animais [138], justificando seu uso como método de escolha para estudar os efeitos da cotadutida em nosso modelo experimental. Assim, observamos os efeitos termográficos no modelo de camundongos obesos, demonstrando conforme a literatura que o análogo de receptor GCG/GLP1, a cotadutida, melhora a capacidade de gerar termogênese adaptativa quando combinado em uma única molécula [139].

O sinergismo de PPARg e PPARa *in vivo* leva ao escurecimento da gordura branca [140]. Além disso, os efeitos dos análogos do receptor GLP1 são mediados pelo aumento da secreção de IL6 em camundongos, e a sinalização de IL6 em adipócitos ativa a termogênese no TAM [141]. Nossos dados mostraram um aumento da transcrição e tradução de IL6 relacionada ao tratamento com cotadutida. Além disso, observamos um aumento da ADAM10, que ativa a IL6 no tecido adiposo via sinalização trans. Este achado indica que a cotadutida estimula a ADAM10 a ativar o receptor IL6 no TAM interescapular de animais tratados com duplo agonista do receptor GLP1/GCG, resultando em um aumento na transcrição e tradução de IL6, bem como na promoção da termogênese.

UCP1 é um canal de prótons que descarrega a energia produzida pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranar das mitocôndrias durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs [41]. A ativação da UCP1 inicia-se no TAM interescapular, induzindo o desacoplamento mitocondrial que leva à produção de calor. Essa ativação aumenta significativamente a utilização de glicose e ácidos graxos, combatendo efetivamente os efeitos metabólicos ligados à obesidade [136, 141]. No camundongo obeso tratado com cotadutida, houve elevação nos níveis de IL6, BMP8, ADAM10 e UCP1.

Camundongos obesos tratados apresentaram altos níveis de marcadores termogênicos nos níveis gênico, proteico e tecidual para PPARa, β 3AR, IL6 e UCP1. Abordagens farmacológicas como a cotadutida induzem o escurecimento ativando o PPARa, que controla os níveis de UCP1 no TAM interescapular maduro [142]. O β 3AR induz a expressão ectópica de UCP1 devido à estimulação adrenérgica essencial para desencadear a termogênese [143]. Com a adição de β 3AR, IL6, ADAM10 e BMP8, ganhamos uma compreensão mais ampla da via termogênica e dos mecanismos que a desencadeiam.

A hiperplasia/hipertrofia de adipócitos na obesidade induz uma neoformação compensatória de vasos sanguíneos no tecido adiposo, embora isso seja considerado insuficiente para prevenir a hipóxia [144]. Esse ambiente pobre em oxigênio regula várias alterações metabólicas, incluindo resistência à insulina, modulação fenotípica dos adipócitos e

respostas inflamatórias derivadas do tecido adiposo [145, 146]. Camundongos transgênicos superexpressando o fator angiogênico VEGF não desenvolvem obesidade, mesmo quando alimentados com uma dieta HF, têm melhor sensibilidade à insulina/tolerância à glicose e têm menos células inflamatórias no TAB. Notadamente, o TAM nesses animais mostra aumento da vascularização, fluxo sanguíneo e aumento da termogênese, e a dieta de HF não afeta seu peso [147]. Esses achados são, portanto, consistentes com nossos resultados, uma vez que a cotadutida aumentou a expressão gênica de VEGF e HSPG2 (perlecan) em camundongos DIO. A liraglutida, um agonista do receptor GLP1, promove maior expressão de VEGF nas células endoteliais via JAK2/STAT3 (Janus quinase 2/transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) [148]. Perlecan é um proteoglicano da membrana basal [149], e sua expressão é paralela à angiogênese [150]. As expressões aumentadas de VEGF e perlecan em animais tratados são, portanto, fortes, embora indiretas, evidências de angiogênese aumentada em TAM. Assim, essas alterações induzidas por cotadutida devem contribuir para as melhorias metabólicas globais no TAM, incluindo a termogênese.

BMP8 regula ADAM10 no TAM, que atua centralmente para aumentar a sinalização adrenérgica, iniciando o escurecimento do TAM e a termogênese. No entanto, juntamente com IL6, BMP8 é um fator crítico para a termogênese, onde ambos regulam positivamente ADAM10 [142, 151]. Observamos que nossos camundongos DIO que receberam cotadutida tiveram uma expressão aumentada de *Il6*, *Bmp8* e *Adam10*, provando que a cotadutida é um agente termogênico que desencadeia a ativação de diferentes iniciadores da via termogênica.

É conhecido que camundongos com níveis reduzidos de BMP8 apresentam maior suscetibilidade à obesidade induzida por dieta [152], um fenômeno que observamos em nosso grupo HF, mas não nos outros grupos. A elevação dos níveis do gene BMP8 está associada ao aumento de PPAR α , e o incremento de BMP8 está correlacionado com o aumento de β 3AR e UCP1 [142, 153]. Observamos um aumento em todos esses marcadores em animais do grupo HFC, sugerindo que a cotadutida atua por múltiplas vias para ativar a UCP1, resultando na termogênese como consequência final.

A conversão de TAM em TAB que ocorre durante a obesidade, tanto em humanos quanto em roedores, está associada à diminuição da sinalização beta-adrenérgica, perda mitocondrial, maiores gotículas lipídicas citoplasmáticas nos adipócitos e vascularização deficiente associada à menor expressão de VEGF [134].

O aumento da termogênese auxilia na perda de peso, aumentando o estímulo metabólico para a termorregulação e o recrutamento de genes indutores da biogênese mitocondrial, como PGC1 α e TFAM [41, 154]. A biogênese mitocondrial ocorre juntamente com o aumento de

substratos energéticos devido à maior demanda energética, de modo que as mitocôndrias podem aumentar em tamanho ou número de acordo com a necessidade, promovendo maior produção de energia, como ocorre no processo de lipólise para geração de energia [41, 155]. A cotadutida aumentou a expressão de *Pgc1a* e *Tfam* no grupo HFC em nosso estudo.

No processo de perda de peso, há uma mobilização de gordura mais significativa, com sinalização CIDEA, e da influência da adipocina PLIN1 que regula a lipólise [156]. Quando há um impacto na homeostase energética com um aumento da quantidade de ácidos graxos livres para beta-oxidação e produção de energia, mitocôndrias funcionais são necessárias para explicar a produção de energia a partir da alta demanda de substratos [157]. A expressão dos genes *Cidea* e *Plin1* mostrou que a cotadutida aumentou a mobilização de ácidos graxos e a lipólise.

As incretinas têm um papel complexo na regulação do apetite e adiposidade [158]. O efeito de equilíbrio da cotadutida é devido a presença de GLP1R e GCGR no eixo intestino-cérebro [159]. Consistente com essa afirmação, estudos recentes demonstraram células positivas para GLP1R e GCGR no hipotálamo de roedores [160, 161]. O GLP1R é expresso no hipotálamo dorsomedial, PVN e ARC [162], enquanto o GCGR é encontrado no ARC e no hipotálamo ventromedial [161]. A cotadutida pode modular esses receptores, conforme sugerido em nosso estudo. Uma pesquisa de curto prazo com camundongos DIO investigou como os agonistas do GLP1R afetam a ingestão alimentar através de vias hedônicas e homeostáticas através de substratos neurais, demonstrando o acesso a áreas cerebrais quando administrados periféricamente [163]. No entanto, o impacto a longo prazo do tratamento nas vias neuronais deve ser comprovado.

Há evidências de que a ação da OXM no SNC reduz o peso corporal por aumentar o gasto energético [53]. Isso pode envolver a ativação do metabolismo do TAM, uma vez que a administração intracerebroventricular (ICV) de OXM reduz o peso do TAM interescapular e aumenta a temperatura corporal em roedores [164]. A contribuição relativa do GLP-1R e do GCGR para esse processo nunca foi investigada; entretanto, um estudo mostrou que a estimulação central do GLP-1R por injeção de liraglutida no núcleo ventromedial hipotalâmico (VMH) levou ao aumento da perda de peso corporal independente da redução na ingestão de alimentos, mostrando que a perda de peso foi causada pela estimulação da atividade termogênica no TAM via AMPK no VMH [52]. Adicionalmente, sabe-se que o GCG regula a atividade do TAM e esta pode ser, pelo menos em parte, mediada centralmente [165].

Os componentes peptídicos regulam as principais vias neuronais relacionadas com o balanço energético. Nosso estudo demonstrou que a cotadutida diminuiu os neuropeptídeos

orexígenos e aumentou os neuropeptídeos anorexígenos no ARC dos camundongos DIO. Os neurônios PVN recebem projeções aferentes do ARC neurônios através de MC4R, e a sinalização PVN-MC4R é bem conhecida por regular a ingestão alimentar e o peso corporal [166]. Entre outros núcleos hipotalâmicos, o PVN tem a maior expressão de MC4R. Em consonância com o papel fundamental do MC4R no balanço energético, nossos animais HFC mostraram expressão aumentada de *Mc4r*.

O ARC abriga corpos celulares neuronais contendo moléculas efetoras orexígenas (NPY/AGRP) e anorexígenas (POMC/CART) que desempenham um papel na homeostase energética [167, 168]. A sensibilidade à insulina aumenta com a ativação do receptor do hormônio de crescimento (GHR) no ARC, indicando a população neuronal que expressa GHR no ARC como regulador da glicólise e da sensibilidade muscular à insulina *in vivo* [169]. Em contrapartida, neurônios que expressam prepronociceptina (PNO) podem ser considerados uma nova população GABAérgica de neurônios no ARC ativada após o consumo de alimentos palatáveis para promover hiperfagia. Os neurônios PNO^{ARC} exibem uma densa ramificação no ARC e oferecem uma entrada sináptica de natureza inibitória para neurônios POMC anorexígenos próximos [170].

A leptina modula a ingestão alimentar de forma diferente nos neurônios POMC/CART e NPY/AgRP [171]. Nossos resultados mostraram que a cotadutida pode atenuar a resistência à leptina em camundongos DIO. Portanto, nossos animais tratados com cotadutida apresentaram aumento da expressão do receptor de leptina. Os receptores de leptina (LepR) são altamente expressos no hipotálamo, especialmente no ARC [172], e a transdução reduzida do sinal LepR é uma causa potencial de resistência à leptina [173]. Assim, nossos dados sugerem que a cotadutida pode estimular a saciedade através da leptina com um efeito sobre os neurônios POMC/CART através de seu receptor, inibindo a grelina.

Como outros receptores de citocinas, a ativação do LepR induz uma ação do SOCS-3, que inibe a transdução do sinal da leptina [167]. Consequentemente, a superexpressão de SOCS3 no ARC pode causar resistência à leptina [174]. Nossos achados mostraram que a cotadutida reduziu a expressão gênica de *Socs3*.

A leptina também atua através do receptor de calcitonina (CALCR) nos neurônios hipotalâmicos para controlar a alimentação e o balanço energético. Em camundongos C57BL/6, os neurônios LepR^{Calcr} desempenham um papel no balanço energético mediado pela leptina [175], consistente com o aumento da expressão de *LepR* e *Calcr* em nossos animais tratados com cotadutida.

A somatostatina (SST) tem sido relatada como potencialmente inibidora da grelina, um dos principais hormônios que controlam a ingestão alimentar e o balanço energético, destacando a importância da SST na regulação do apetite [176]. Além disso, os receptores SST em neurônios contendo RNAm POMC em ARC são uma ligação entre os neurônios SST do hipotálamo e POMC [177]. Consistente com os achados do POMC, a expressão de *Sst* melhorou em nossos animais tratados com cotadutida.

Em roedores, a grelina contribui para o aumento da massa gorda quando a expressão de taquicinina 1 (TAC1) é reduzida [178]. Nossos achados mostraram uma diminuição significativa na expressão gênica de *Tac1* no grupo HF, mas a cotadutida melhorou essa expressão no HFC. Além disso, considerando que o TAC1 é regulado negativamente pela grelina, o TAC1 promove um balanço energético negativo no hipotálamo, inibindo os neurônios AGRP/NPY.

O entendimento do controle hipotalâmico na ingestão alimentar é fundamental para o manejo da obesidade como uma doença crônica. Esse controle envolve a interação entre sinais do tecido adiposo e do sistema gastrointestinal, transmitindo informações sobre a massa gorda e a ingestão de nutrientes ao SNC [179]. Os núcleos hipotalâmicos integram esses sinais e se conectam a circuitos neurais que regulam a atividade simpática, o gasto de energia e os comportamentos alimentares [167]. Compreender esse circuito neurobiológico permite explicar os comportamentos de hiperfagia em pacientes com obesidade [180], além de fornecer insights sobre os mecanismos de ação de medicamentos antiobesidade [179].

CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo revelam os efeitos significativamente benéficos da cotadutida em camundongos DIO, incluindo a indução da perda de peso, o controle do metabolismo de glicose e melhora da resistência à insulina. Além disso, observou-se que a cotadutida exerce um efeito neutralizador sobre os rearranjos celulares adaptativos patológicos na ilhota pancreática de camundongos obesos, resultando em melhorias nos marcadores relacionados à transdiferenciação celular, proliferação, apoptose e estresse do RE.

Adicionalmente, foi constatado que a cotadutida promoveu a termogênese e elevou a temperatura corporal, enquanto reduziu marcadores pró-inflamatórios e aumentou a expressão de fatores como o VEGF e o perlecan no TAM interescapular, sugerindo uma melhora na angiogênese. Além disso, a cotadutida demonstrou capacidade de aprimorar a biogênese mitocondrial.

Essas descobertas, foram complementadas pela evidência dos efeitos da cotadutida sobre os neuropeptídeos hipotalâmicos e os receptores hormonais, destacando seu papel na modulação do equilíbrio energético através do eixo intestino-cérebro e suas vias de sinalização associadas. Especificamente, a cotadutida demonstrou aumentar os neuropeptídeos POMC e CART, enquanto diminuiu os neuropeptídeos NPY e AGRP. Este estudo contribui significativamente para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos antiobesidade da cotadutida, sugerindo que uma investigação mais aprofundada desses mecanismos pode levar ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes e direcionadas para o manejo da obesidade e do DM2.

REFERÊNCIAS

1. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* 2022; 55: 31-55 (doi:10.1016/j.immuni.2021.12.013).
2. van der Meulen T, Huisin MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol* 2015; 54: R103-117 (doi:10.1530/JME-14-0290).
3. Kang T, Boland BB, Jensen P, Alarcon C, Nawrocki A, Grimsby JS *et al.* Characterization of Signaling Pathways Associated with Pancreatic beta-cell Adaptive Flexibility in Compensation of Obesity-linked Diabetes in db/db Mice. *Mol Cell Proteomics* 2020; 19: 971-993 (doi:10.1074/mcp.RA119.001882).
4. Moon S, Jung HS. Endoplasmic Reticulum Stress and Dysregulated Autophagy in Human Pancreatic Beta Cells. *Diabetes Metab J* 2022; 46: 533-542 (doi:10.4093/dmj.2022.0070).
5. Chen CW, Guan BJ, Alzahrani MR, Gao Z, Gao L, Bracey S *et al.* Adaptation to chronic ER stress enforces pancreatic beta-cell plasticity. *Nat Commun* 2022; 13: 4621 (doi:10.1038/s41467-022-32425-7).
6. Bohuslavova R, Fabriciova V, Lebron-Mora L, Malfatti J, Smolik O, Valihrach L *et al.* ISL1 controls pancreatic alpha cell fate and beta cell maturation. *Cell Biosci* 2023; 13: 53 (doi:10.1186/s13578-023-01003-9).
7. Guney MA, Lorberbaum DS, Sussel L. Pancreatic beta cell regeneration: To beta or not to beta. *Curr Opin Physiol* 2020; 14: 13-20 (doi:10.1016/j.cophys.2019.10.019).
8. Tritschler S, Theis FJ, Lickert H, Bottcher A. Systematic single-cell analysis provides new insights into heterogeneity and plasticity of the pancreas. *Mol Metab* 2017; 6: 974-990 (doi:10.1016/j.molmet.2017.06.021).
9. Moin ASM, Butler AE. Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2019; 19: 83 (doi:10.1007/s11892-019-1194-6).
10. Wang W, Zhang C. Targeting beta-cell dedifferentiation and transdifferentiation: opportunities and challenges. *Endocr Connect* 2021; 10: R213-R228 (doi:10.1530/EC-21-0260).
11. Piran R, Lee SH, Li CR, Charbono A, Bradley LM, Levine F. Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1357 (doi:10.1038/cddis.2014.311).
12. Xiao X, Guo P, Shiota C, Zhang T, Coudriet GM, Fischbach S *et al.* Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes. *Cell Stem Cell* 2018; 22: 78-90 e74 (doi:10.1016/j.stem.2017.11.020).
13. Ackermann AM, Wang Z, Schug J, Naji A, Kaestner KH. Integration of ATAC-seq and RNA-seq identifies human alpha cell and beta cell signature genes. *Mol Metab* 2016; 5: 233-244 (doi:10.1016/j.molmet.2016.01.002).

14. van der Meulen T, Mawla AM, DiGruccio MR, Adams MW, Nies V, Dolleman S *et al.* Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metab* 2017; 25: 911-926 e916 (doi:10.1016/j.cmet.2017.03.017).
15. Tran R, Moraes C, Hoesli CA. Controlled clustering enhances PDX1 and NKX6.1 expression in pancreatic endoderm cells derived from pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2020; 10: 1190 (doi:10.1038/s41598-020-57787-0).
16. Riedel MJ, Asadi A, Wang R, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. *Diabetologia* 2012; 55: 372-381 (doi:10.1007/s00125-011-2344-9).
17. Tang X, Uhl S, Zhang T, Xue D, Li B, Vandana JJ *et al.* SARS-CoV-2 infection induces beta cell transdifferentiation. *Cell Metab* 2021; 33: 1577-1591 e1577 (doi:10.1016/j.cmet.2021.05.015).
18. Lee K, Chan JY, Liang C, Ip CK, Shi YC, Herzog H *et al.* XBP1 maintains beta cell identity, represses beta-to-alpha cell transdifferentiation and protects against diabetic beta cell failure during metabolic stress in mice. *Diabetologia* 2022; 65: 984-996 (doi:10.1007/s00125-022-05669-7).
19. Tanday N, Flatt PR, Irwin N, Moffett RC. Liraglutide and sitagliptin counter beta- to alpha-cell transdifferentiation in diabetes. *J Endocrinol* 2020; 245: 53-64 (doi:10.1530/JOE-19-0451).
20. Sarnobat D, Moffett CR, Tanday N, Reimann F, Gribble FM, Flatt PR *et al.* Antidiabetic drug therapy alleviates type 1 diabetes in mice by promoting pancreatic alpha-cell transdifferentiation. *Biochem Pharmacol* 2020; 182: 114216 (doi:10.1016/j.bcp.2020.114216).
21. Deng H, Yang F, Ma X, Wang Y, Chen Q, Yuan L. Long-Term Liraglutide Administration Induces Pancreas Neogenesis in Adult T2DM Mice. *Cell Transplant* 2020; 29: 963689720927392 (doi:10.1177/0963689720927392).
22. Eizirik DL, Gurzov EN. Can GABA turn pancreatic alpha-cells into beta-cells? *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 629-630 (doi:10.1038/s41574-018-0101-6).
23. Sarnobat D, Charlotte Moffett R, Flatt PR, Irwin N, Tarasov AI. GABA and insulin but not nicotinamide augment alpha- to beta-cell transdifferentiation in insulin-deficient diabetic mice. *Biochem Pharmacol* 2022; 199: 115019 (doi:10.1016/j.bcp.2022.115019).
24. Marinho TS, Martins FF, Cardoso LEM, 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).
25. Marinho TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. *Int J Morphol* 2019; 37: 1331-1334 (doi:10.4067/s0717-95022019000401331).
26. Sachs S, Bastidas-Ponce A, Tritschler S, Bakhti M, Bottcher A, Sanchez-Garrido MA *et al.* Targeted pharmacological therapy restores beta-cell function for diabetes remission. *Nat Metab* 2020; 2: 192-209 (doi:10.1038/s42255-020-0171-3).

27. Beamish CA, Lee YK, Gaber AO, Chanana P, Graviss EA, Kloc M *et al.* Osteocalcin protects islet identity in LDL receptor knockout mice on high fat diet. *J Endocrinol* 2024; (doi:10.1530/JOE-23-0352).
28. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 2014; 63: 1021-1031 (doi:10.2337/db13-0887).
29. Turbitt J, Moffett RC, Brennan L, Johnson PRV, Flatt PR, McClenaghan NH *et al.* Molecular determinants and intracellular targets of taurine signalling in pancreatic islet beta-cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2024; e14101 (doi:10.1111/apha.14101).
30. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-452 (doi:10.1152/ajpendo.00691.2006).
31. Ornellas F, Karise I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2020. Pancreatic Islets of Langerhans: Adapting Cell and Molecular Biology to Changes of Metabolism. In: Faintuch J, Faintuch S, editors. *Obesity and Diabetes: Scientific Advances and Best Practice*. Cham: Springer International Publishing. p 175-190 (doi:10.1007/978-3-030-53370-0_13).
32. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 2009; 23: 3113-3120 (doi:10.1096/fj.09-133546).
33. Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 2010; 11: 268-272 (doi:10.1016/j.cmet.2010.03.007).
34. Abbasi F, Brown BW, Jr., Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 937-943 (doi:10.1016/s0735-1097(02)02051-x).
35. Trayhurn P. Brown Adipose Tissue: A Short Historical Perspective. *Methods Mol Biol* 2022; 2448: 1-18 (doi:10.1007/978-1-0716-2087-8_1).
36. Kooijman S, Wang Y, Parlevliet ET, Boon MR, Edelschaap D, Snaterse G *et al.* Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. *Diabetologia* 2015; 58: 2637-2646 (doi:10.1007/s00125-015-3727-0).
37. Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M *et al.* Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* 2015; 156: 2461-2469 (doi:10.1210/en.2014-1598).
38. Bargut TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. *Tissue Cell* 2016; 48: 452-460 (doi:10.1016/j.tice.2016.08.001).
39. Cinti S. 2018. Murine Brown Adipose Tissue. In: Cinti S, editor. *Obesity, Type 2 Diabetes and the Adipose Organ: A Pictorial Atlas from Research to Clinical Applications*. Cham: Springer International Publishing. p 13-79 (doi:10.1007/978-3-319-40522-3_2).

40. Bertholet AM, Kirichok Y. Mitochondrial H(+) Leak and Thermogenesis. *Annu Rev Physiol* 2022; 84: 381-407 (doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034405).
41. Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22: 393-409 (doi:10.1038/s41580-021-00350-0).
42. Suchacki KJ, Stimson RH. Nutritional Regulation of Human Brown Adipose Tissue. *Nutrients* 2021; 13: (doi:10.3390/nu13061748).
43. Gonzalez-Hurtado E, Lee J, Choi J, Wolfgang MJ. Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Mol Metab* 2018; 7: 45-56 (doi:10.1016/j.molmet.2017.11.004).
44. Seo S, Ju S, Chung H, Lee D, Park S. Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* 2008; 55: 867-874 (doi:10.1507/endocrj.k08e-091).
45. Skibicka KP, Alhadeff AL, Grill HJ. Hindbrain cocaine- and amphetamine-regulated transcript induces hypothermia mediated by GLP-1 receptors. *J Neurosci* 2009; 29: 6973-6981 (doi:10.1523/JNEUROSCI.6144-08.2009).
46. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, Delbes AS, Castel J, Martinez S *et al.* The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014; 28: 725-737 (doi:10.1016/j.beem.2014.03.003).
47. Bake T, Baron J, Duncan JS, Morgan DGA, Mercer JG. Arcuate nucleus homeostatic systems reflect blood leptin concentration but not feeding behaviour during scheduled feeding on a high-fat diet in mice. *J Neuroendocrinol* 2017; 29: (doi:10.1111/jne.12498).
48. Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. *Physiol Behav* 2016; 153: 47-55 (doi:10.1016/j.physbeh.2015.10.019).
49. He Z, Gao Y, Lieu L, Afrin S, Cao J, Michael NJ *et al.* Direct and indirect effects of liraglutide on hypothalamic POMC and NPY/AgRP neurons - Implications for energy balance and glucose control. *Mol Metab* 2019; 28: 120-134 (doi:10.1016/j.molmet.2019.07.008).
50. 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).
51. Friedrichsen M, Breitschaft A, Tadayon S, Wizert A, Skovgaard D. The effect of semaglutide 2.4 mg once weekly on energy intake, appetite, control of eating, and gastric emptying in adults with obesity. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23: 754-762 (doi:10.1111/dom.14280).
52. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F *et al.* GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 2014; 63: 3346-3358 (doi:10.2337/db14-0302).

53. Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C *et al.* Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 2012; 61: 2753-2762 (doi:10.2337/db11-1556).
54. An IB, Byun MS, Yang SI, Choi Y, Woo JW, Jang HC *et al.* A glycosylated Fc-fused glucagon-like peptide-1 receptor agonist exhibits equivalent glucose lowering to but fewer gastrointestinal side effects than dulaglutide. *Diabetes Obes Metab* 2020; 22: 1455-1468 (doi:10.1111/dom.14058).
55. Tsapas A, Karagiannis T, Kakotrichi P, Avgerinos I, Mantsiou C, Tousinas G *et al.* Comparative efficacy of glucose-lowering medications on body weight and blood pressure in patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23: 2116-2124 (doi:10.1111/dom.14451).
56. 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).
57. 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).
58. 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).
59. 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).
60. 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).
61. 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).
62. Golubic R, Kennet J, Parker V, Robertson D, Luo D, Hansen L *et al.* Dual glucagon-like peptide-1 and glucagon receptor agonism reduces energy intake in type 2 diabetes with obesity. *Diabetes Obes Metab* 2024: (doi:10.1111/dom.15579).
63. 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).
64. 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).

65. 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).
66. 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).
67. 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).
68. 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).
69. 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).
70. 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. *Bioconj Chem* 2020; 31: 1167-1176 (doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00093).
71. 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/eurev_202012_24038).
72. 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).
73. Garvey WT, Birkenfeld AL, Dicker D, Mingrone G, Pedersen SD, Satylganova 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).
74. Andreasen CR, Andersen A, Knop FK, Vilsboll T. Understanding the place for GLP-1RA therapy: Translating guidelines for treatment of type 2 diabetes into everyday clinical practice and patient selection. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23 Suppl 3: 40-52 (doi:10.1111/dom.14500).
75. 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).
76. 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).
77. Thomas L, Martel E, Rist W, Uphues I, Hamprecht D, Neubauer H *et al.* The dual GCGR/GLP-1R agonist survodutide: Biomarkers and pharmacological profiling for clinical candidate selection. *Diabetes Obes Metab* 2024; 26: 2368-2378 (doi:10.1111/dom.15551).
 78. 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).
 79. Guan Y, Ly N, Li J, Arends RH. Population Pharmacokinetics of Cotadutide in Subjects with Type 2 Diabetes. *Clin Pharmacokinet* 2022; 61: 833-845 (doi:10.1007/s40262-021-01094-y).
 80. 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).
 81. 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).
 82. 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).
 83. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012; Chapter 5: Unit5 61 (doi:10.1002/0471141755.ph0561s58).
 84. Mandarin-de-Lacerda CA, Del Sol M, Vasquez 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).
 85. Fraulob JC, Diamantino RO, Santos CF, Aguila MB, Mandarin-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/jcbtn.09-83).
 86. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 136: 17-24 (doi:10.1016/s0021-9150(97)00165-2).
 87. 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).

88. 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).
89. 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).
90. 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).
91. Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nat Protoc* 2009; 4: 1649-1652 (doi:10.1038/nprot.2009.150).
92. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* 2012: (doi:10.3791/3564).
93. Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. London, San Diego: Academic Press, 2013: 360 p.
94. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486 (doi:10.1590/s0001-37652003000400006).
95. Mandarim-de-Lacerda CA, Santos CF, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611: 211-225 (doi:10.1007/978-1-60327-345-9_17).
96. 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).
97. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene* 1994; 147: 157-160 (doi:10.1016/0378-1119(94)90060-4).
98. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2017; 18: (doi:10.3390/ijms18061321).
99. Ahima RS. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J Clin Invest* 2008; 118: 2380-2383 (doi:10.1172/JCI36284).
100. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91 (doi:10.1126/science.7678183).
101. Servizi S, Corrigan RR, Casadesus G. The Importance of Understanding Amylin Signaling Mechanisms for Therapeutic Development in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des* 2020; 26: 1345-1355 (doi:10.2174/1381612826666200318151146).
102. Wu S, Gao L, Cipriani A, Huang Y, Yang Z, Yang J *et al.* The effects of incretin-based therapies on beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes: A systematic review

- and network meta-analysis combining 360 trials. *Diabetes Obes Metab* 2019; 21: 975-983 (doi:10.1111/dom.13613).
- 103.** Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131-2157 (doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054).
- 104.** Mathiesen DS, Bagger JI, Bergmann NC, Lund A, Christensen MB, Vilsboll T *et al.* The Effects of Dual GLP-1/GIP Receptor Agonism on Glucagon Secretion-A Review. *Int J Mol Sci* 2019; 20: (doi:10.3390/ijms20174092).
- 105.** Nauck MA, Baller B, Meier JJ. Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S190-196 (doi:10.2337/diabetes.53.suppl_3.s190).
- 106.** Kim SJ, Nian C, Karunakaran S, Clee SM, Isales CM, McIntosh CH. GIP-overexpressing mice demonstrate reduced diet-induced obesity and steatosis, and improved glucose homeostasis. *PLoS One* 2012; 7: e40156 (doi:10.1371/journal.pone.0040156).
- 107.** Hammoud R, Drucker DJ. Beyond the pancreas: contrasting cardiometabolic actions of GIP and GLP1. *Nat Rev Endocrinol* 2023; 19: 201-216 (doi:10.1038/s41574-022-00783-3).
- 108.** Veedfald S, Vedtofte L, Skov-Jepesen K, Deacon CF, Hartmann B, Vilsboll T *et al.* Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is a Pancreatic Polypeptide Secretagogue in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: (doi:10.1210/clinem/dgz097).
- 109.** Gupta D, Ogden SB, Shankar K, Varshney S, Zigman JM. "A LEAP 2 conclusions? Targeting the ghrelin system to treat obesity and diabetes". *Mol Metab* 2021; 46: 101128 (doi:10.1016/j.molmet.2020.101128).
- 110.** Quinino RME. Ghrelin and Its Role as a Marker of Obesity Severity. *Obes Surg* 2023: (doi:10.1007/s11695-023-06483-9).
- 111.** Athyros VG, Doumas M, Imprialos KP, Stavropoulos K, Georgiou E, Katsimardou A *et al.* Diabetes and lipid metabolism. *Hormones (Athens)* 2018; 17: 61-67 (doi:10.1007/s42000-018-0014-8).
- 112.** Wei Y, Quan L, Zhou T, Du G, Jiang S. The relationship between different C-peptide level and insulin dose of insulin pump. *Nutr Diabetes* 2021; 11: 7 (doi:10.1038/s41387-020-00148-7).
- 113.** Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D *et al.* Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest* 1999; 104: R69-75 (doi:10.1172/JCI8339).
- 114.** Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R *et al.* The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 357-364 (doi:10.1172/JCI5870).
- 115.** Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E141-145 (doi:10.1152/ajpendo.00712.2009).

116. Ornellas F, Karise I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2020. Pancreatic Islets of Langerhans: Adapting Cell and Molecular Biology to Changes of Metabolism. In: Faintuch J, Faintuch S, editors. *Obesity and Diabetes*. Cham: Springer Inter Pu. p 175-190 (doi:10.1007/978-3-030-53370-0_13).
117. 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).
118. Vazquez Arreola E, Hanson RL, Bogardus C, Knowler WC. Relationship Between Insulin Secretion and Insulin Sensitivity and its Role in Development of Type 2 Diabetes Mellitus: Beyond the Disposition Index. *Diabetes* 2021: (doi:10.2337/db21-0416).
119. Courtney CM, Shyr ZA, Yan Z, Onufer EJ, Steinberger AE, Tecos ME *et al*. Alterations in pancreatic islet cell function in response to small bowel resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2020; 319: G36-G42 (doi:10.1152/ajpgi.00282.2019).
120. Jessen L, D'Alessio D. The incretins and beta-cell health: contrasting glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 as a path to understand islet function in diabetes. *Gastroenterology* 2009; 137: 1891-1894 (doi:10.1053/j.gastro.2009.10.013).
121. Balakrishnan S, Dhavamani S, Prahalathan C. beta-Cell specific transcription factors in the context of diabetes mellitus and beta-cell regeneration. *Mech Dev* 2020; 163: 103634 (doi:10.1016/j.mod.2020.103634).
122. Lemper M, Leuckx G, Heremans Y, German MS, Heimberg H, Bouwens L *et al*. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to beta-like cells. *Cell Death Differ* 2015; 22: 1117-1130 (doi:10.1038/cdd.2014.193).
123. Lee YS, Lee C, Choung JS, Jung HS, Jun HS. Glucagon-Like Peptide 1 Increases beta-Cell Regeneration by Promoting alpha- to beta-Cell Transdifferentiation. *Diabetes* 2018; 67: 2601-2614 (doi:10.2337/db18-0155).
124. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 240 (doi:10.1186/s13287-017-0694-z).
125. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1607-1611 (doi:10.1073/pnas.97.4.1607).
126. Sznurkowska MK, Hannezo E, Azzarelli R, Chatzeli L, Ikeda T, Yoshida S *et al*. Tracing the cellular basis of islet specification in mouse pancreas. *Nat Commun* 2020; 11: 5037 (doi:10.1038/s41467-020-18837-3).
127. Bohuslavova R, Smolik O, Malfatti J, Berkova Z, Novakova Z, Saudek F *et al*. NEUROD1 Is Required for the Early alpha and beta Endocrine Differentiation in the Pancreas. *Int J Mol Sci* 2021; 22: (doi:10.3390/ijms22136713).

128. Aigha, II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic beta cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11: 459 (doi:10.1186/s13287-020-01977-0).
129. Zhu X, Oguh A, Gingerich MA, Soleimanpour SA, Stoffers DA, Gannon M. Cell Cycle Regulation of the Pdx1 Transcription Factor in Developing Pancreas and Insulin-Producing beta-Cells. *Diabetes* 2021; 70: 903-916 (doi:10.2337/db20-0599).
130. Ma J, Liu Y, Valladolid-Acebes I, Recio-Lopez P, Peng G, Li J *et al.* ATF5 is a regulator of ER stress and beta-cell apoptosis in different mouse models of genetic- and diet-induced obesity and diabetes mellitus. *Cell Signal* 2023; 102: 110535 (doi:10.1016/j.cellsig.2022.110535).
131. Lee JH, Lee J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic beta-Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 2022; 23: (doi:10.3390/ijms23094843).
132. Maliszewska K, Kretowski A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021; 22: (doi:10.3390/ijms22041530).
133. Rangel-Azevedo C, Santana-Oliveira DA, Miranda CS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. *J Nutr Biochem* 2022; 105: 109002 (doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109002).
134. Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Curr Obes Rep* 2015; 4: 224-229 (doi:10.1007/s13679-015-0157-8).
135. Saito M, Matsushita M, Yoneshiro T, Okamatsu-Ogura Y. Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 222 (doi:10.3389/fendo.2020.00222).
136. Xu T, Wang J, Shi H, Wei X, Zhang H, Ji Y *et al.* CCE and EODF as two distinct non-shivering thermogenesis models inducing weight loss. *Pflugers Arch* 2023; 475: 961-974 (doi:10.1007/s00424-023-02827-7).
137. Crane JD, Mottillo EP, Farncombe TH, Morrison KM, Steinberg GR. A standardized infrared imaging technique that specifically detects UCP1-mediated thermogenesis in vivo. *Mol Metab* 2014; 3: 490-494 (doi:10.1016/j.molmet.2014.04.007).
138. Brasil S, Renck AC, de Meneck F, Brioschi ML, Costa EF, Teixeira MJ. A systematic review on the role of infrared thermography in the Brown adipose tissue assessment. *Rev Endocr Metab Disord* 2020; 21: 37-44 (doi:10.1007/s11154-020-09539-8).
139. Gonzalez-Garcia I, Milbank E, Dieguez C, Lopez M, Contreras C. Glucagon, GLP-1 and Thermogenesis. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3445 (doi:10.3390/ijms20143445).
140. Kroon T, Harms M, Maurer S, Bonnet L, Alexandersson I, Lindblom A *et al.* PPARgamma and PPARalpha synergize to induce robust browning of white fat in vivo. *Mol Metab* 2020; 36: 100964 (doi:10.1016/j.molmet.2020.02.007).

141. Gutierrez AD, Gao Z, Hamidi V, Zhu L, Saint Andre KB, Riggs K *et al.* Anti-diabetic effects of GLP1 analogs are mediated by thermogenic interleukin-6 signaling in adipocytes. *Cell Rep Med* 2022; 3: 100813 (doi:10.1016/j.xcrm.2022.100813).
142. Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017; 31: 20160051 (doi:10.1515/hmbci-2016-0051).
143. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404: 652-660 (doi:10.1038/35007527).
144. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 451-463 (doi:10.1038/sj.ijo.0803744).
145. Trayhurn P. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2022; 127: 161-164 (doi:10.1017/S0007114521003962).
146. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 267-276 (doi:10.1080/13813450802306602).
147. Elias I, Franckhauser S, Ferre T, Vila L, Tafuro S, Munoz S *et al.* Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2012; 61: 1801-1813 (doi:10.2337/db11-0832).
148. Di Y, He J, Ma P, Shen N, Niu C, Liu X *et al.* Liraglutide promotes the angiogenic ability of human umbilical vein endothelial cells through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 523: 666-671 (doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.004).
149. Gubbiotti MA, Neill T, Iozzo RV. A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. *Matrix Biol* 2017; 57-58: 285-298 (doi:10.1016/j.matbio.2016.09.003).
150. Cardoso LEM, Marinho TS, Martins FF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treatment with semaglutide, a GLP-1 receptor agonist, improves extracellular matrix remodeling in the pancreatic islet of diet-induced obese mice. *Life Sci* 2023; 319: 121502 (doi:10.1016/j.lfs.2023.121502).
151. Pellegrinelli V, Peirce VJ, Howard L, Virtue S, Turei D, Senzacqua M *et al.* Adipocyte-secreted BMP8b mediates adrenergic-induced remodeling of the neuro-vascular network in adipose tissue. *Nat Commun* 2018; 9: 4974 (doi:10.1038/s41467-018-07453-x).
152. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149: 871-885 (doi:10.1016/j.cell.2012.02.066).
153. Martins FF, Bargut TCL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. *Ann Anat* 2017; 210: 44-51 (doi:10.1016/j.aanat.2016.11.013).

154. Lemecha M, Morino K, Imamura T, Iwasaki H, Ohashi N, Ida S *et al.* MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1-alpha signalling in beige adipocytes. *Sci Rep* 2018; 8: 15096 (doi:10.1038/s41598-018-33438-3).
155. Horbay R, Bilyy R. Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis* 2016; 21: 1327-1335 (doi:10.1007/s10495-016-1295-5).
156. Cui L, Liu P. Two Types of Contact Between Lipid Droplets and Mitochondria. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 618322 (doi:10.3389/fcell.2020.618322).
157. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab* 2017; 25: 1027-1036 (doi:10.1016/j.cmet.2017.04.015).
158. Krieger JP, Langhans W, Lee SJ. Novel role of GLP-1 receptor signaling in energy expenditure during chronic high fat diet feeding in rats. *Physiol Behav* 2018; 192: 194-199 (doi:10.1016/j.physbeh.2018.03.037).
159. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sorensen J, Cowley MA, Dalboge LS *et al.* The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest* 2014; 124: 4473-4488 (doi:10.1172/JCI75276).
160. Adriaenssens AE, Biggs EK, Darwish T, Tadross J, Sukthankar T, Girish M *et al.* Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor-Expressing Cells in the Hypothalamus Regulate Food Intake. *Cell Metab* 2019; 30: 987-996 e986 (doi:10.1016/j.cmet.2019.07.013).
161. Quinones M, Al-Massadi O, Gallego R, Ferno J, Dieguez C, Lopez M *et al.* Hypothalamic CaMKKbeta mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab* 2015; 4: 961-970 (doi:10.1016/j.molmet.2015.09.014).
162. Huang Z, Liu L, Zhang J, Conde K, Phansalkar J, Li Z *et al.* Glucose-sensing glucagon-like peptide-1 receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate glucose metabolism. *Sci Adv* 2022; 8: eabn5345 (doi:10.1126/sciadv.abn5345).
163. Gabery S, Salinas CG, Paulsen SJ, Ahnfelt-Ronne J, Alanentalo T, Baquero AF *et al.* Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways. *JCI Insight* 2020; 5: (doi:10.1172/jci.insight.133429).
164. Dakin CL, Small CJ, Park AJ, Seth A, Ghatgei MA, Bloom SR. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E1173-1177 (doi:10.1152/ajpendo.00233.2002).
165. Al-Massadi O, Ferno J, Dieguez C, Nogueiras R, Quinones M. Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance. *Int J Mol Sci* 2019; 20: (doi:10.3390/ijms20163905).
166. Singh U, Jiang J, Saito K, Toth BA, Dickey JE, Rodeghiero SR *et al.* Neuroanatomical organization and functional roles of PVN MC4R pathways in physiological and behavioral regulations. *Mol Metab* 2022; 55: 101401 (doi:10.1016/j.molmet.2021.101401).
167. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671 (doi:10.1038/35007534).

168. Spezani R, Silva RR, Martins FF, Marinho TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. *J Nutr Biochem* 2020; 83: 108419 (doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108419).
169. de Lima JBM, Debarba LK, Rupp AC, Qi N, Ubah C, Khan M *et al.* ARC(GHR) Neurons Regulate Muscle Glucose Uptake. *Cells* 2021; 10: (doi:10.3390/cells10051093).
170. Jais A, Paeger L, Sotelo-Hitschfeld T, Bremser S, Prinzensteiner M, Klemm P *et al.* PNOc(ARC) Neurons Promote Hyperphagia and Obesity upon High-Fat-Diet Feeding. *Neuron* 2020; 106: 1009-1025 e1010 (doi:10.1016/j.neuron.2020.03.022).
171. Qin C, Li J, Tang K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 2018; 159: 3458-3472 (doi:10.1210/en.2018-00453).
172. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996; 98: 1101-1106 (doi:10.1172/JCI118891).
173. Friedman JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab* 2019; 1: 754-764 (doi:10.1038/s42255-019-0095-y).
174. Hurley MM, Anderson EM, Chen C, Maunze B, Hess EM, Block ME *et al.* Acute Blockade of PACAP-Dependent Activity in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Disrupts Leptin-Induced Behavioral and Molecular Changes in Rats. *Neuroendocrinology* 2020; 110: 271-281 (doi:10.1159/000501337).
175. Pan W, Adams JM, Allison MB, Patterson C, Flak JN, Jones J *et al.* Essential Role for Hypothalamic Calcitonin Receptor-Expressing Neurons in the Control of Food Intake by Leptin. *Endocrinology* 2018; 159: 1860-1872 (doi:10.1210/en.2017-03259).
176. Zou S, Somvanshi RK, Paik S, Kumar U. Colocalization of cannabinoid receptor 1 with somatostatin and neuronal nitric oxide synthase in rat brain hypothalamus. *J Mol Neurosci* 2015; 55: 480-491 (doi:10.1007/s12031-014-0369-5).
177. Fodor M, Csaba Z, Epelbaum J, Vaudry H, Jegou S. Interrelations between hypothalamic somatostatin and proopiomelanocortin neurons. *J Neuroendocrinol* 1998; 10: 75-78 (doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00629.x).
178. Trivedi C, Shan X, Tung YC, Kabra D, Holland J, Amburgy S *et al.* Tachykinin-1 in the central nervous system regulates adiposity in rodents. *Endocrinology* 2015; 156: 1714-1723 (doi:10.1210/en.2014-1781).
179. Purnell JQ, le Roux CW. Hypothalamic control of body fat mass by food intake: The key to understanding why obesity should be treated as a disease. *Diabetes Obes Metab* 2024; 26 Suppl 2: 3-12 (doi:10.1111/dom.15478).
180. Challet E. The circadian regulation of food intake. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15: 393-405 (doi:10.1038/s41574-019-0210-x).

ANEXO A – 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. Patrícia C. Lisboa
 Professora Associada
 Matr. 34765-8
 Vice-Coordenadora
 CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Artigo de revisão publicado em 2024

Life Sciences 346 (2024) 122645



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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

Update on the transdifferentiation of pancreatic cells into functional beta cells for treating diabetes

Renata Spezani, Pedro H. Reis-Barbosa, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda*

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

ARTICLE INFO

Keywords

Alpha- to beta cell
Islet cell plasticity
Insulin secretion
Cell transdifferentiation
Transcription factors

ABSTRACT

The increasing global prevalence and associated comorbidities need innovative approaches for type 2 diabetes mellitus (T2DM) prevention and treatment. Genetics contributes significantly to T2DM susceptibility, and genetic counseling is significant in detecting and informing people about the diabetic risk. T2DM is also intricately linked to overnutrition and obesity, and nutritional advising is beneficial to mitigate diabetic evolution. However, manipulating pancreatic cell plasticity and transdifferentiation could help beta cell regeneration and glucose homeostasis, effectively contributing to the antidiabetic fight. Targeted modulation of transcription factors is highlighted for their roles in various aspects of pancreatic cell differentiation and function, inducing non-beta cells' conversion into functional beta cells (responsive to glucose). In addition, pharmacological interventions targeting specific receptors and pathways might facilitate cell transdifferentiation aiming to maintain or increase beta cell mass and function. However, the mechanisms underlying cellular reprogramming are not yet well understood. The present review highlights the primary transcriptional factors in the endocrine pancreas, focusing on transdifferentiation as a primary mechanism. Therefore, islet cell reprogramming, converting one cell type to another and transforming non-beta cells into insulin-producing cells, depends, among others, on transcription factors. It is a promising fact that new transcription factors are discovered every day, and their actions on pancreatic islet cells are revealed. Exploring these pathways associated with pancreatic development and islet endocrine cell differentiation could unravel the molecular intricacies underlying transdifferentiation processes, exploring novel therapeutic strategies to treat diabetes. The medical use of this biotechnology is expected to be achievable within a short time.

1. Background

It is expected that type 2 diabetes mellitus (T2DM) continue to increase worldwide to 9.9 % of the population in 2045 [1]. Genetics contributes significantly to T2DM susceptibility, and genetic counseling is significant in detecting and informing people about the diabetic risk. T2DM is also intricately linked to overnutrition and obesity, and nutritional advising is beneficial to mitigate diabetic evolution.

Relative or absolute insulin insufficiency in pancreatic beta cells

causes T2DM, making these cells a critical target for treating T2DM [2]. Due to the growing number of T2DM patients who are unresponsive to traditional therapies and have hypoglycemic episodes when taking insulin, pancreatic islet transplantation has emerged as a recognized method of beta cell replacement therapy for the treatment of insulin-deficient patients [3]. Nevertheless, pancreatic islet transplantation cannot be used as the primary therapy due to the restricted number of donors and the requirement for immunosuppression [4]. Thus, research on the potential for transdifferentiating pancreatic islet cells has turned

Abbreviations: Arx, aristaless-related homeobox; Elf5, Eukaryotic translation initiation factor-5; ER, endoplasmic reticulum; GABA, gamma-aminobutyric acid; GLP-1, glucagon-like peptide type 1; Insm1, insulinoma-associated gene 1; Isl1, Isl-1 or ISLET1 homeobox 1; MafA, MAF bZIP transcription factor A; MafB, MAF bZIP transcription factor B; NeuroD1, neuronal differentiation 1; Ngn3, neurogenin 3; Nkx2.2, NK2 homeobox 2; Nkx6.1, NK6 homeobox 1; Pax4, paired box 4; Pax6, paired box 6; Pdx1, pancreatic and duodenal homeobox 1; PP, pancreatic polypeptide cells; Rfx6, regulatory factor X 6; T2DM, type 2 diabetes mellitus; Upf1, Upframeshift protein 1; Xbp1, factor X-box binding protein 1.

* Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Instituto de Biologia, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, PO Box 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

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

URL: <http://www.lmmc.uerj.br> (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122645>

Received 16 February 2024; Received in revised form 19 March 2024; Accepted 10 April 2024

Available online 16 April 2024

0024-3205/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO C – Artigo de revisão publicado em 2022

Life Sciences 288 (2022) 120188



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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

The current significance and prospects for the use of dual receptor agonism GLP-1/Glucagon

Renata Spezani, 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

ARTICLE INFO

Keywords:
Type 1 glucagon-like peptide
Type 2 diabetes mellitus
Overweight
Obesity
Oxytomodulin

ABSTRACT

The therapeutic arsenal for treating type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been enriched recently with the inclusion of type 1 glucagon-like peptide (GLP-1). GLP-1 receptor agonists (RA) secondarily reduce appetite, decrease gastric emptying, and reduce body weight. This effect has been used to treat overweight/obesity, especially with comorbidities associated with T2DM. However, the first formulations and adverse effects gradually gave way to new formulations with fewer unpleasant effects and a more extended period of action (weekly subcutaneous administration and even oral administration), which improved the acceptance and adherence to the treatment. Therefore, titration of GLP-1RA should be done gradually. Furthermore, when side effects are consistent and intolerable after weeks/months of titration, a lower dose or a combination of antidiabetic therapies should be implemented, avoiding treatment interruption. The effort to produce increasingly powerful molecules with fewer side effects is the driving force behind the pharmaceutical industry. The unimolecular dual agonism GLP-1RA plus glucagon receptor agonism (GRA) represents an updated pharmacological indication for controlling blood glucose levels in treating T2DM and its comorbidities, showing better effects with less adverse impact than mono GLP-1RA. There are currently different proposals in this way by different laboratories. Nevertheless, the experimental results are promising and show that soon, we will have the contribution of new drugs for the treatment of T2DM.

1. Background

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) requires long-term maintenance of blood glucose control to reduce the risk of micro and macrovascular complications [1]. Therefore, reducing glycated hemoglobin (HbA1c) remains a central focus as the benchmark used by the FDA to approve pharmaceutical products that reduce plasma glucose concentrations. Weight gain, cardiovascular safety, and the potential risk of hypoglycemia are factors of concern in an attempt to safely lower plasma glucose concentrations in T2DM patients [2]. In addition, obesity goes hand in hand with the increasing prevalence of T2DM [3], having profound consequences on population health and life expectancy. Thus, the word "diabesity" was coined to refer to the current obesity-diabetes epidemic

[4].

In contrast to older antidiabetic agents, large-scale studies focusing on cardiovascular safety, combined with the lack of potentially fatal adverse effects such as hypoglycemia [5], have established treatments based on the use of glucagon-like peptide type 1 receptor agonists (GLP-1RA) as a cornerstone in the treatment of T2DM. Weight loss promoted by GLP-1RA is associated with reduced mortality in T2DM patients, improving related comorbidities, and reducing the need for medications for hyperglycemia, hypertension, and hyperlipidemia [6]. However, weight loss alone does not explain the benefits of using GLP-1RA in metabolism, especially in non-alcoholic fatty liver disease [7].

An updated clinical indication is to use more than one regulatory pathway to treat metabolic diseases due to synergistic drug effects.

Abbreviations: DPP4, dipeptidyl-peptidase 4 enzyme; EMA, European Medicines Agency; ER, extended-release; FDA, Food and Drug Administration; G, glucagon; GIP, gastric inhibitory peptide; GLP-1, type 1 glucagon-like peptide; GPCR, G protein-coupled receptor; HbA1c, glycated hemoglobin; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; OXM, oxytomodulin; RA, receptor agonists; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

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

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

URL: <http://www.lmmc.uerj.br> (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120188>

Received 20 September 2021; Received in revised form 17 November 2021; Accepted 25 November 2021

Available online 30 November 2021

0024-3205/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO D – Artigo de pesquisa publicado em 2023

Biochemical Pharmacology 217 (2023) 115852



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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

Cotadutide improves brown adipose tissue thermogenesis in obese mice

Renata Spezani ^a, Ilitch A. Marcondes-de-Castro ^a, Thatiany S. Marinho ^b,
 Pedro H. Reis-Barbosa ^b, Luiz E.M. Cardoso ^c, Marcia B. Aguila ^d, Carlos A. Mandarim-de-
 Lacerda ^{a, d, *}

^a Pharmacology Section, 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

^b Metabolism Section, 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

^c Extracellular Matrix Section, 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

^d Nutrition Section, 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

ARTICLE INFO

Keywords:

Obesity
 Brown adipose tissue
 Thermogenesis
 Mitochondria
 Molecular biology

ABSTRACT

We studied the effect of cotadutide, a dual agonist glucagon-like peptide 1 (GLP1)/Glucagon, on interscapular brown adipose tissue (IBAT) remodeling and thermogenesis of obese mice. Twelve-week-old male C57BL/6 mice were fed a control diet (C group, n = 20) or a high-fat diet (HF group, n = 20) for ten weeks. Then, animals were redivided, adding cotadutide treatment: C, CC, HF, and HFC for four additional weeks. The multilocular brown adipocyte structure showed fat conversion (whitening), hypertrophy, and structural disarray in the HF group, which was reverted in cotadutide-treated animals. Cotadutide enhances the body temperature, thermogenesis, and sympathetic innervation (peroxisome proliferator-activated receptor- α , β 3 adrenergic receptor, interleukin 6, and uncoupled protein 1), reduces pro-inflammatory markers (disintegrin and metalloproteinase domain, morphogenetic protein 8a, and neuregulin 4), and improves angiogenesis (vascular endothelial growth factor A, and perlecan). In addition, cotadutide enhances lipolysis (perilipin and cell death-inducing DNA fragmentation factor α), mitochondrial biogenesis (nuclear respiratory factor 1, transcription factor A mitochondrial, mitochondrial dynamin-like GTPase, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α), and mitochondrial fusion/fission (dynamin-related protein 1, mitochondrial fission protein 1, and parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase). Cotadutide reduces endoplasmic reticulum stress (activating transcription factor 4, C/EBP homologous protein, and growth arrest and DNA-damage inducible), and extracellular matrix markers (lysyl oxidase, collagen type VI α 1, collagen type VI α 3, matrix metalloproteinases 2 and 9, and hyaluronan synthases 1 and 2). In conclusion, the experimental evidence is compelling in demonstrating cotadutide's thermogenic effect on obese mice's IBAT, contributing to unraveling its action mechanisms and the possible translational benefits.

Abbreviations: ADAM10, metalloproteinase domain 10; AIN, American Institute of Nutrition; ATF4, activating transcription factor 4; BAT, brown adipose tissue; BETA3AR, beta-3 adrenergic receptor; BMP8, bone morphogenetic protein 8; C, control group + vehicle; CC, control group + cotadutide; CHOP, C/EBP homologous protein; CIDEA, cell death activator; COL1a1, collagen type 1 alpha 1; COL6a3, collagen type 6 alpha 3; DIO, diet-induced obesity; DRP1, dynamin-related protein 1; ECM, extracellular matrix; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; ER, endoplasmic reticulum; FIRI, fasting insulin resistance index; FIS1, fission mitochondrial 1; Gadd, growth arrest and DNA-damage-inducible protein; GLP1, glucagon-like peptide type 1 HAS, hyaluronan synthase; HCL, Hydrochloric Acid; HF, high-fat group + vehicle; HFC, high-fat group + cotadutide; HSPG2, heparan sulfate proteoglycan 2; IBAT, interscapular brown adipose tissue; I6, interleukin 6; JAK, Janus kinase; LOX, lysyl oxidase; MMP, matrix metalloproteinase; NaCl, sodium chloride; Naf, sodium fluoride; NP-40, Nonidet P-40; NRF1, nuclear respiratory factor 1; NRG4, neuregulin 4; OPA1, optic atrophy 1; PARKIN, cytosolic E3 ubiquitin ligase; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha; PLIN1, perilipin 1; PMSF, Phenylmethanesulfonyl fluoride; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; QUICKI, quantitative insulin sensitivity index; SDS, Sodium dodecyl sulfate; STAT, signal transducer and activator of transcription; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TBP, TATA-box binding protein; TFAM, mitochondrial transcription factor; UCP1, uncoupling protein 1; VEGFa, vascular endothelial growth factor A; WAT, white adipose tissue.

* Corresponding author at: Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro, 87 fds. P.O.Box 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

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

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115852>

Received 28 August 2023; Received in revised form 9 October 2023; Accepted 10 October 2023

Available online 11 October 2023

0006-2952/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO E – Artigo de pesquisa publicado em 2024

Peptides 173 (2024) 171138



Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

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

Cotadutide (GLP-1/Glucagon dual receptor agonist) modulates hypothalamic orexigenic and anorexigenic neuropeptides in obese mice

Renata Spezani^{1,2}, Thatiany Souza Marinho^{1,3}, Thiago Santos Reis⁴, Marcia Barbosa Aguiar⁵, Carlos A. Mandarin-de-Lacerda^{*,6}

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Neuropeptide Y
Proopiomelanocortin
Agouti-related protein
Cocaine- and amphetamine-regulated transcript
Gut-brain axis

ABSTRACT

The hypothalamic neuropeptides linked to appetite and satiety were investigated in obese mice treated with cotadutide (a dual receptor agonist of glucagon-like peptide 1 (GLP-1R)/Glucagon (GGR)). Twelve-week-old male C57BL/6 mice were fed a control diet (C group, n = 20) or a high-fat diet (HF group, n = 20) for ten weeks. Each group was further divided, adding cotadutide treatment and forming groups C, CC, HF, and HFC for four additional weeks. The hypothalamic arcuate neurons were labeled by immunofluorescence, and protein expressions (Western blotting) for neuropeptide Y (NPY), proopiomelanocortin (POMC), agouti-related protein (AgRP), and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). Cotadutide enhanced POMC and CART neuropeptides and depressed NPY and AgRP neuropeptides. In addition, gene expressions (RT-qPCR) determined that *Lpr* (leptin receptor) and *Calcrl* (calcitonin receptor) were diminished in HF compared to C but enhanced in CC compared to C and HFC compared to HF. Besides, *Socs3* (suppressor of cytokine signaling 3) was decreased in HFC compared to HF, while *Sst* (somatostatin) was higher in HFC compared to HF; *Tac1* (tachykinin 1) and *Mcr4* (melanocortin-4-receptor) were lower in HF compared to C but increased in HFC compared to HF. Also, *Gip1r* and *Gcyr* were higher in HFC compared to HF. In conclusion, the findings are compelling, demonstrating the effects of cotadutide on hypothalamic neuropeptides and hormone receptors of obese mice. Cotadutide modulates energy balance through the gut-brain axis and its associated signaling pathways. The study provides insights into the mechanisms underlying cotadutide's anti-obesity effects and its possible implications for obesity treatment.

1. Introduction

The next-generation anti-obesity drug capable of safely achieving significant and sustained body weight loss is the primary research target to face the obesity pandemic, driven by the recent understanding of gut-

brain communication [1,2]. Therefore, new medicines under consideration include peptide hormone receptor agonists, such as glucagon-like peptide type 1 (GLP-1), peptide YY, glucagon, ghrelin, and GIP (gastric inhibitory peptide or glucose-dependent insulintropic polypeptide) [1, 3], hormones that have peripheral and central receptors and act in the

Abbreviations: AgRP, agouti-related peptide; ARC, hypothalamic arcuate nucleus; BSA, bovine serum albumin; C, control diet; CALCR, calcitonin receptor; CART, cocaine- and amphetamine-regulated transcript; CC, control group plus cotadutide; DIO, diet-induced obesity; GGR, glucagon receptor; GHR, growth hormone receptor; GIP, gastric inhibitory peptide or glucose-dependent insulintropic polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide type 1; GLP1R, glucagon-like peptide 1 receptor; HF, high-fat diet; HFC, high-fat group plus cotadutide; LEP, Leptin; LEPR, leptin receptor; MC4R, melanocortin-4-receptor; NPY, neuropeptide Y; POMC, proopiomelanocortin; PVN, paraventricular nucleus; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; SST, somatostatin; TAC1, tachykinin 1.

* Correspondence to: Instituto de Biologia, Centro Biomedico, 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, mandarim.ca@gmail.com (C.A. Mandarin-de-Lacerda).

¹ These authors share the authorship of the manuscript.

² Orcid: 0000-0002-6144-8525

³ Orcid: 0000-0001-9976-9466

⁴ Orcid: 0000-0001-9468-755X

⁵ Orcid: 0000-0003-3994-4589

⁶ Orcid: 0000-0003-4134-7978

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171138>

Received 19 September 2023; Received in revised form 15 November 2023; Accepted 18 December 2023

Available online 24 December 2023

0196-9781/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO F – Artigo de pesquisa publicado em 2023

Life Sciences 327 (2023) 121858



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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

Pancreatic islet remodeling in cotadutide-treated obese mice

Renata Spezani, Thatiany Souza Marinho, Luiz E. Macedo Cardoso, Marcia Barbosa Aguilã, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda*

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:
Beta-cell
Obesity
Apoptosis
Cell proliferation
GLP-1/glucagon

ABSTRACT

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) cause morphofunctional alterations in pancreatic islet alpha and beta cells. Therefore, we hypothesize that the new GLP-1/Glucagon receptor dual agonist cotadutide may benefit islet cell arrangement and function. Twelve-week-old C57BL/6 male mice were fed a control diet (C, 10 % kJ fat) or a high-fat diet (HF, 50 % kJ fat) for ten weeks. Then, the animals were divided into four groups for an additional 30 days and daily treated with subcutaneous cotadutide (30 nmol/kg) or vehicle: C, CC (control + cotadutide), HF, and HFC (high-fat + cotadutide). Cotadutide led to weight loss and reduced insulin resistance in the HFC group, increasing insulin receptor substrate 1 and solute carrier family 2 gene expressions in isolated islets. Also, cotadutide enhanced transcriptional factors related to islet cell transdifferentiation, decreasing aristaless-related homeobox and increasing the paired box 4 and 6, pancreatic and duodenal homeobox 1, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A, neurogenin 3, and neurogenic differentiation 1. In addition, cotadutide improved the proliferating cell nuclear antigen, NK6 homeobox 1, B cell leukemia/lymphoma 2, but lessening caspase 3. Furthermore, cotadutide mitigated the endoplasmic reticulum (ER) stress-responsive genes, reducing transcription factor 4, DNA-damage-inducible transcript 3, and growth arrest and DNA-damage-inducible 45. In conclusion, our data demonstrated significant beneficial actions of cotadutide in DIO mice, such as weight loss, glycemic control, and insulin resistance improvement. In addition, cotadutide counteracted the pathological adaptive cellular arrangement of the pancreatic islet in obese mice, improving the markers of the transdifferentiating pathway, proliferation, apoptosis, and ER stress.

1. Introduction

Obesity contributes to the dysfunction of the pancreatic islets through chronic tissue inflammation and excess available nutrients that cause compensatory beta-cell hypertrophy, then beta-cell insufficiency

and insulin resistance [1,2]. This insult might progress to relative or absolute damage to beta-cell function and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [3], and molecular mechanisms related to the adaptive flexibility of beta-cell function provide improved insight into the disease pathogenesis of T2DM [4].

Abbreviations: Adipoq, adiponectin; Arx, aristaless related homeobox; Atf4, activating transcription factor 4; Bcl2, B cell leukemia/lymphoma 2; BW, body weight; C, control group; Casp3, caspase 3; CC, control + cotadutide group; Chop, DNA-damage inducible transcript 3; Cr, calcitonin receptor; DIO, diet-induced obesity; Ddit3, DNA damage-inducible transcript 3; EI, energy intake; ER, endoplasmic reticulum; FI, food intake; FIRI, fasting insulin resistance index; *Gadd45*, growth arrest and DNA-damage-inducible 45; GIP, gastric inhibitory polypeptide; *Gip1r*, glucagon-like peptide 1 receptor; *Gcg*, glucagon; *Glut2*, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2; HF, high-fat group; HFC, high-fat + cotadutide group; KO, Knockout; *Iapp*, islet amyloid polypeptide; *Il6*, interleukin 6; *Irs1*, insulin receptor substrate 1; *Lep*, leptin; *Mafa*, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A; *Neurod1*, neurogenic differentiation 1; *Ngn3*, neurogenin 3; *Nkx6*, NK6 homeobox 1; OGTT, oral glucose tolerance test; *Oxm*, oxyntomodulin; *Pax4*, paired box 4; *Pax6*, paired box 6; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pdx1*, pancreatic and duodenal homeobox 1; PI3-Kinase, Phosphoinositide 3-kinase; PPP, pancreatic polypeptide; PYY, peptide YY; *Quicr1*, and quantitative insulin sensitivity index; *Ramp3*, receptor (calcitonin) activity modifying protein 3; *slc2a2*, Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2; T2DM, type 2 diabetes; TAG, triacylglycerol; *Tbp*, TATA-box binding protein; TC, total cholesterol; *Tnf α* , tumor necrosis factor alpha; *Vv*, volume density.

* 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: mbaguila@uerj.br (M.B. Aguilã), mandarim@uerj.br (C.A. Mandarim-de-Lacerda).

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

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121858>

Received 9 May 2023; Received in revised form 6 June 2023; Accepted 9 June 2023

Available online 12 June 2023

0024-3205/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

AUTHOR COPY ONLY

Journal of Molecular
EndocrinologyI A Marcondes-de-Castro
et al.

70:3

e220168

RESEARCH

Cotadutide effect in liver and adipose tissue in obese miceIltich Aquino Marcondes-de-Castro¹, Thamiris Ferreira Oliveira¹, Renata Spezani¹, Thatiany Souza Marinho¹, Luiz Eduardo Macedo Cardoso¹, Marcia Barbosa Aguilã¹ and Carlos Alberto Mandarin-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 Mandarin-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

Introduction

The white adipose tissue (WAT) and liver are significant targets in obesity-associated diseases such as dyslipidemia, insulin resistance, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), beyond what obesity is directly associated with inflammation in WAT (Garcia-Macia *et al.* 2021).

WAT is stored in various places as subcutaneous and visceral fat cushions. In rodents, the visceral fat is divided into mesenteric, mediastinal, retroperitoneal, perirenal, and gonadal cushions. Epididymal WAT (eWAT) is located in the lower abdomen, connected to



OBESIDADE E DOENÇA PANCREÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (ESTEATOSE PANCREÁTICA)

por

Spezani R., Marinho T.S., Fabiano M.M, Sales T.A., Reis-Barbosa P. H., Nagagata B.A., Osorio C.I.T.N.,
Aguila M.B., Mandarim-de-Lacerda C.A.¹

¹Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Autor correspondente: Acadêmico Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda,
Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av 28 de Setembro, 87 fds. 20551-010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
e-mail: mandarim@uerj.br
<http://www.lmmc.uerj.br>

RESUMO

Indivíduos com obesidade e acúmulo de gordura no corpo, podem ter inflamação crônica do tecido adiposo com risco aumentado de resistência à insulina e diabetes mellitus do tipo 2. Os adipócitos servem para armazenar o excesso de energia na forma de triacilglicerol e secretam adipocinas (adiponectina e leptina). Com isso, o tecido adiposo regula outros tecidos e modula o metabolismo energético. O pâncreas, estrutural e funcionalmente, possui partes exócrina e endócrina, sendo

que as ilhotas pancreáticas representam a parte endócrina. O aumento da adiposidade no pâncreas leva a infiltração gordurosa no parênquima pancreático, associada à obesidade e resistência à insulina. O resultado é a doença pancreática gordurosa não alcoólica (DPGNA). A DPGNA pode advir da infiltração de gordura no parênquima pancreático (que é reversível até um certo grau) ou da morte de células acinares e sua substituição por adipócitos (que é irreversível). A inflamação associada à obesidade contribui para a deposição de gordura no pâncreas, exacerbando a expressão de citocinas e o recrutamento de macrófagos.



TERMOGÊNESE (ADAPTAÇÃO AO FRIO E PRODUÇÃO DE CALOR) NO ADIPÓCITO MARROM

por

**Thatiany Souza Marinho, Pedro Henrique Reis-Barbosa, Renata Spezani, Ilitch Aquino
Marcondes-de-Castro, Thiago Santos-Reis, Tamiris Ingrid Petito, Julie de Oliveira Alves Bittencourt,
Marcia Barbosa Aguila & Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda**

Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de
Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Correspondência: Acadêmico Carlos A. Mandarin-de-Lacerda, 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. Tel.: (+55.21) 2868.8316. Fax: 2868.8033.
e-mail: mandarim@uerj.br, website: www.lmmc.uerj.br

RESUMO

A prevalência global de obesidade e suas comorbidades aumentam o interesse nas funções do tecido adiposo, sobretudo o tecido adiposo marrom (TAM). Assim, o TAM torna-se um alvo para o futuro manejo da obesidade. O TAM pode ser considerado um órgão endócrino capaz de regular diversas vias metabólicas. As “batocinas” (do acróstico em inglês “bat” ou brown adipose tissue + citocinas) representa produto de secreção do TAM. O adipócito marrom tem aspecto multilocular

em relação ao adipócito branco, pois contém uma concentração considerável de mitocôndrias no citoplasma. Além disso, o adipócito marrom apresenta termogenina ou proteína desacopladora 1 (UCP-1) na membrana mitocondrial interna. Este canal de prótons fornece a função termogênica do adipócito marrom, bloqueando a formação de ATP, despejando H(+) do ciclo de Krebs na cavidade da membrana mitocondrial e produzindo calor. Para aumentar a produção de calor o tecido lança mão de fazer biogênese mitocondrial, multiplicando o número de mitocôndrias ativas. O contrário, a mitofagia, serve