

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline Fernandes da Silva

Agonista duo PPAR alfa/gama: plasticidade e longevidade das ilhotas pancreáticas num modelo experimental de obesidade

Rio de Janeiro 2025 Aline Fernandes da Silva

Agonista duo PPAR alfa/gama: plasticidade e longevidade das ilhotas pancreáticas num modelo experimental de obesidade

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Vanessa de Souza Mello

Rio de Janeiro 2025

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

F363 Fernandes-da-Silva, Aline Agonista duo PPAR alfa/gama: plasticidade e longevidade das ilhotas pancreáticas num modelo experimental de obesidade / Aline Fernandes da Silva. – 2025. 103 f.
Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.
1. Ilhotas Pancreáticas – Fisiopatologia. 2. Síndrome Metabólica – Prevenção & Controle – Teses. 3. PPAR alfa. 4. PPAR gama. I. Souza-Mello, Vanessa. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

Bibliotecário: Hugo da Costa Maia Bernardo - CRB-7/7426

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

Aline Fernandes da Silva

Agonista duo PPAR alfa/gama: plasticidade e longevidade das ilhotas pancreáticas num modelo experimental de obesidade

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

Aprovada em 18 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisbôa da Silva Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Marcia Regina Simas Torres Klein Instituto de Nutrição – UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Zancan Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Eliete Dalla Corte Frantz Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2025

DEDICATÓRIA

A minha família e amigos por todo amor dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha fortaleza. Ao meu pai, Alexandre, que é para mim um grande exemplo de garra e que sempre me estimulou a estudar e me incentivou a ir além. À minha mãe, Ivone, que me acolhe diante de todos os dilemas e dores da vida. Aos meus irmãos, por me ensinarem a partilhar. Às minhas tias e tios, que sempre foram como pais para mim. Aos meus primos e primas, por toda a irmandade. À Eva, minha afilhada, por sua doçura e alegria.

Ao Mike, meu companheiro, por me ensinar que o melhor lugar do mundo é o "agora" e que tudo é exatamente como deve ser.

A todos os meus amigos, pelas alegrias compartilhadas e por me permitirem saber que não estou só, em especial à Hediane, Bruna, Marcus, Camilla, Maria Paula e Anna.

À Vanessa, minha querida orientadora, o maior exemplo de liderança que já tive. Se não fosse por toda a sua benevolência, eu certamente não teria chegado até aqui.

Aos Vanessetes Flávinha, Rique, Carol e Isa, mais que amigos com quem dividi não só o trabalho, mas também o peso dos dias difíceis, em especial à Daiana, uma irmã que a jornada acadêmica me deu, por toda a cumplicidade e generosidade.

Aos integrantes do LMMC, em especial à Aline e à Thaty, por terem sido essenciais para a realização das técnicas desenvolvidas neste trabalho e por todas as risadas.

A todos os meus professores ao longo da vida, que muito de si deixaram em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, à Profa. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda e a todos os professores e professoras do programa de pósgraduação, além dos funcionários do LMMC.

Aos técnicos e funcionários da UERJ.

À CAPES e demais agências de fomento à pesquisa científica.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para este trabalho.

"Que o hoje seja hoje. Sem o peso de ontem ou a ansiedade pelo amanhã. Apenas hoje". (Isabela Freitas)

RESUMO

FERNANDES-DA-SILVA, Aline. Agonista duo PPAR alfa/gama: plasticidade e longevidade das ilhotas pancreáticas num modelo experimental de obesidade. 2025. 103 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.

O pâncreas é um órgão essencial para a regulação metabólica, mas também altamente vulnerável à lipotoxicidade, condição associada ao excesso de gordura e comum em estados de obesidade. Essa lipotoxicidade compromete a estrutura e a função das ilhotas pancreáticas, impactando a secreção de insulina e agravando o desequilíbrio glicêmico. Estratégias terapêuticas que preservem a funcionalidade das células beta e restaurem a homeostase metabólica são essenciais para prevenir ou controlar o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Neste contexto, a ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)a/g, conhecidos por sua atuação na regulação do metabolismo lipídico e na inflamação, tem emergido como uma abordagem promissora. Este estudo investigou os efeitos da ativação isolada e combinada dos receptores PPARa e PPARg na remodelação das ilhotas pancreáticas, proliferação, identidade e manutenção das células beta em um modelo experimental de obesidade induzida por dieta. Camundongos foram alimentados com dieta rica em gordura (HF) por dez semanas, seguidas de tratamento por quatro semanas com agonistas dos receptores PPARa, PPARg ou ambos. Os animais alimentados com a dieta HF apresentaram intolerância à glicose, perfil pró-inflamatório de adipocinas, aumento na massa das células beta e alfa, e expressão gênica indicativa de desdiferenciação e proliferação prejudicada das células beta. Os resultados mostraram que todos os tratamentos com agonistas PPAR atenuaram a intolerância à glicose, reduziram o peso corporal e promoveram um perfil anti-inflamatório de adipocinas. No entanto, o grupo tratado com a combinação PPARa/g apresentou maior eficácia na restauração da citoarquitetura das ilhotas pancreáticas e na regulação positiva de genes relacionados à identidade e manutenção das células beta, como Pdx1, Mafa e Nkx6.1. Estes achados indicam que a ativação combinada de PPARa/g pode interromper o espectro de complicações metabólicas associadas à obesidade, preservando a funcionalidade das células beta pancreáticas e oferecendo um potencial terapêutico para o tratamento do DM2.

Palavras-chave: pâncreas; ilhotas pancreáticas; PPAR; obesidade; diabetes tipo 2.

ABSTRACT

FERNANDES-DA-SILVA, Aline. *PPAR alpha/gamma duo agonist*: plasticity and longevity of pancreatic islets in an experimental model of obesity. 2025. 103 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.

The pancreas is an essential organ for metabolic regulation but is also highly vulnerable to lipotoxicity, a condition associated with excess fat and common in obesity states. This lipotoxicity compromises the structure and function of pancreatic islets, impacting insulin secretion and worsening glycemic imbalance. Therapeutic strategies that preserve beta-cell functionality and restore metabolic homeostasis are essential to prevent or manage type 2 diabetes mellitus (T2DM). In this context, activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)a/g, known for their role in regulating lipid metabolism and inflammation, has emerged as a promising approach. This study investigated the effects of isolated and combined activation of PPARa and PPARg receptors on pancreatic islet remodeling, beta-cell proliferation, identity, and maintenance in a diet-induced obesity experimental model. Mice were fed a high-fat diet (HF) for ten weeks, followed by four weeks of treatment with PPARa, PPARg, or dual PPARa/g receptor agonists. The HF-fed animals exhibited glucose intolerance, a pro-inflammatory adipokine profile, increased beta- and alpha-cell mass, and gene expression indicative of beta-cell dedifferentiation and impaired proliferation. The results showed that all PPAR agonist treatments alleviated glucose intolerance, reduced body weight, and promoted an anti-inflammatory profile. However, the group treated with the combined PPARa/g agonist exhibited the greatest efficacy in restoring islet cytoarchitecture and positively regulating beta-cell identity and maintenance genes, such as Pdx1, Mafa, and Nkx6.1. These findings suggest that combined PPARa/g activation can interrupt the spectrum of metabolic complications associated with obesity, preserving beta-cell functionality and offering therapeutic potential for T2DM treatment.

Keywords: pancreas, pancreatic islets, PPAR, obesity, type 2 diabetes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Anatomia macroscópica do pancreas humano e do camundongo.	19
Figura 2 –	Sistema portal insulo-acinar	22
Figura 3 –	Anatomia microscópica do pâncreas humano e do	
	camundongo	27
Figura 4 –	Citoarquitetura do pâncreas e o processamento da insulina na	
	célula beta	30
Figura 5 –	Mecanismos moleculares da morte de células beta induzida por	
	lipo e glucolipotoxicidade	33
Figura 6 –	Mecanismo de ativação de PPAR e principais efeitos fisiológicos	
	da ativação das diferentes isoformas	43
Figura 7 –	Desenho experimental	54
Figura 8 –	Canulação do pâncreas	57
Figura 9 –	Massa corporal (A), massa do pâncreas (B), ingestão de energia	
	(C), teste de tolerância oral à glicose (D) e área sob a curva para	
	o TOTG (E)	63
Figura 10 –	Concentrações de glicemia em jejum (A), insulina plasmática (B),	
	leptina plasmática (C), adiponectina plasmática (D), GLP-1	
	plasmático (E), GIP plasmático (F), teste de resistência à insulina	
	em jejum (G) e índice HOMA-beta (H)	64
Figura 11 –	Seções pancreáticas coradas com hematoxilina e eosina (A),	
	massa das ilhotas (B) massa de células beta (C), massa de	
	células alfa (D) e razão de células alfa para beta (E)	66
Figura 12 –	Expressão relativa de mRNA nas ilhotas pancreáticas para Ppara	
	(A), Pparg (B), Fgf21 (C), Glp1r (D), Glut2 (E), Neurog3 (F), Mafa	
	(G), Pdx1 (H) e Neurod1 (I)	68
Figura 13 –	Expressão relativa de mRNA nas ilhotas pancreáticas de Bax (A),	
	Bcl2 (B), razão Bax/Bcl2 (C), Pax4 (D) e Nkx6.1 (E)	69
Figura 14 –	Imunohistoquímica para Ki67, PAX4 e ARX	70
Figura 15 –	Mapa de calor da análise de componentes principais (PCA) (A) e	
	proporção de variância dos componentes principais (B)	71

Figura 16 –	Gráfico biplot PCA (A) e escores de componentes principais (B)	72
Figura 17 –	Resumo dos principais resultados	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional das dietas experimentais	55
Tabela 2 –	Detalhamento dos primers utilizados	60

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

A1C	Hemoglobina glicada
ADA	Associação americana de diabetes
ADP	Adenosina Difosfato
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
AGNE	Ácidos graxos não estereficados
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	"Activator Protein 1"
ARX	"Aristaless related homeobox"
ARC	"Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD"
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BAX	"Bcl-2-associated X protein"
BCL2	"B-cell lymphoma 2"
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DBD	"DNA Binding Domain"
DHGM	Doença hepatica gordurosa metabólica
DIO	"Diet Induced Obesity"
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP4	Dipeptidil peptidase-4
FGF21	Fator de crescimento de fibroblasto 21
FIRI	Índice de resistência à insulina em jejum
FOXO1	"Forkhead box O1"
GIP	Polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose
GLP1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GLUT	Transportador de glicose
GSIS	Secreção de insulina estimulada por glicose

HF	"High-Fat"
IL6	Interleucina-6
IP3	Inositol trifosfato
LBD	"Ligand Binding Domain"
MAFA	"MAF bZIP transcription factor A"
MAP4K	"Mitogen-Activated Protein 4 Kinase"
MC	Massa corporal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NGN3	Neurogenina 3
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NKX6.1	"NK6 Homeobox 1"
OCT4	"POU domain, class 5, transcription factor 1"
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX4	"Paired box gene 4"
PBA	Ácido 4-fenilbutírico
PC	Proconvertase
PCA	Análise dos componentes principais
PDX1	"Pancreatic and duodenal homeobox"
PP	Polipeptideo pancreático
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPREs	Elementos de resposta ao receptor PPAR
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RN	Receptor nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor retinoide X
SERCA	"Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase"
ТА	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TBP	Proteina de ligação TATA box
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TUDCA	Ácido tauroursodesoxicólico

- UCP Proteína desacopladora 1
- UPR Resposta a proteínas mal dobradas

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Pâncreas: uma visão comparativa entre humanos e camundongos	17
1.1.1	Anatomia	17
1.1.2	Desenvolvimento embrionário e diferenciação celular	19
1.1.3	Vascularização e inervação	21
1.1.4	Porções exócrina e endócrina	23
1.1.5	Funções das células endócrinas	25
1.2	Controle glicêmico ideal	28
1.3	Dieta hiperlipídica, balanço energético positivo e obesidade	30
1.4	Expansão adiposa, condições metabólicas adversas e diabetes	
	mellitus	31
1.5	Plasticidade celular e respostas adaptativas do pâncreas	34
1.5.1	Desdiferenciação das células beta	34
1.5.2	Transdiferenciação e adaptação celular	35
1.5.3	Perda progressiva da função e identidade celular	36
1.5.4	Perspectivas terapêuticas e reversão da plasticidade patológica	37
1.6	Estratégias de preservação e reparo das células beta pancreáticas	
	no contexto do eixo adipoinsular	38
1.6.1	Redução da carga metabólica através do estilo de vida e controle	
	glicêmico	38
1.6.2	Abordagens terapêuticas para proteção e regeneração de células beta	39
1.8	PPARS (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos)	41
1.8.1	Estrutura dos PPARS	42
1.8.2	Mecanismo de ação dos PPARs	43
1.8.3	Subtipos de PPARs e suas funções	44
1.8.4	Agonistas PPARs como agentes terapêuticos	45
1.9	Modelo experimental de obesidade	50
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo geral	52
2.2	Objetivos específicos	52

3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	Desenho experimental	53
3.2	Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal	55
3.3	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	55
3.4	Isolamento das ilhotas pancreáticas	56
3.5	Análises bioquímicas, FIRI e Homa-beta	58
3.6	Imunohistoquímica	58
3.7	Estereologia	59
3.8	RT-qPCR	59
3.9	Análise estatística	60
4	RESULTADOS	62
4.1	Comportamento alimentar, massa corporal	62
4.2	Metabolismo de carboidratos	63
4.3	Histologia e estereologia do pâncreas	65
4.4	RT-qPCR	66
4.5	Análise de componentes principais	70
5	DISCUSSÃO	73
	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética	90
	ANEXO B – Publicações de artigos científicos resultantes da tese	91
	ANEXO C – Publicação de artigo científico em primeira autoria durante o	
	doutorado	93
	ANEXO D – Publicações de artigos científicos em colaboração durante o	
	doutorado	94
	ANEXO E - Participação em capítulos de livros publicados durante o	
	doutorado	101

INTRODUÇÃO

A ingestão elevada de gordura saturada tem sido associada à expansão excessiva do tecido adiposo e ao desenvolvimento de uma série de alterações metabólicas (Miranda *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2023). Esse cenário promove a hiperleptinemia, uma condição resultante da hipertrofia dos adipócitos brancos, que desencadeia a hiperinsulinemia. Esse processo ocorre pela redução da capacidade da leptina em modular a secreção de insulina pós-prandial, afetando negativamente a funcionalidade das ilhotas pancreáticas, conhecido como eixo adipoinsular (Kieffer e Habener, 2000a; Hudish *et al.*, 2019). Como um dos principais órgãos impactados pela lipotoxicidade, o pâncreas é particularmente vulnerável aos efeitos persistentes dessa condição, levando a danos significativos em suas estruturas (Inaishi e Saisho, 2020a; Ahmed *et al.*, 2021).

Além do comprometimento da função adiposa e da sinalização da insulina, fatores como o estresse do retículo endoplasmático, hipóxia e estresse oxidativo agravam ainda mais o quadro metabólico, estando intimamente ligados ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e suas complicações (Wondmkun, 2020). Dentro das ilhotas pancreáticas, a resistência à insulina interfere diretamente na secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS, do inglês "*glucose-stimulated insulin secretion*"), levando à liberação de pró-insulina – uma forma incompleta de insulina – relacionada ao aumento do estresse do retículo endoplasmático no pâncreas endócrino (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2021). A lipotoxicidade persistente, comumente associada à obesidade, compromete não apenas as células beta, mas também as células alfa pancreáticas, promovendo uma liberação excessiva de glucagon e insulina. Esse quadro prejudica o metabolismo, a estrutura e a função das ilhotas pancreáticas (Souza-Mello *et al.*, 2011), acentuando o desequilíbrio glicêmico e esgotando progressivamente a funcionalidade dessas células (Cerf, 2007).

Em resposta à sobrecarga metabólica, as células alfa pancreáticas podem, em algumas condições, transdiferenciar-se em células beta para tentar manter o controle glicêmico. Por outro lado, as células beta, quando submetidas a estresse crônico, podem sofrer desdiferenciação e perder suas características funcionais (Cerf, 2020). Esses processos de plasticidade celular abrem novas possibilidades de investigação,

especialmente dada a crescente prevalência do DM2, que atualmente afeta 16^{°°}% da população adulta mundial, 5,5 pontos percentuais a mais quando comparado com os 10,5% da projeção publicada na edição anterior do Atlas de diabetes da Federação internacional de diabetes (2023) (Atlas, 2019; Magliano *et al.*, 2021).

Diante do impacto do DM2 e da necessidade de intervenções que previnam sua progressão, além de promover a perda de peso e restabelecer a homeostase no eixo adipoinsular, estratégias terapêuticas direcionadas à preservação da funcionalidade das células pancreáticas são essenciais. Nesse contexto, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) surgem como reguladores-chave no metabolismo lipídico. O PPAR-a desempenha um papel essencial na homeostase energética, regulando enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo da glicose em estados de jejum, além de estimular as células beta pancreáticas, aumentando a GSIS e promovendo a oxidação de ácidos graxos (Souza-Tavares et al., 2023). Por sua vez, o PPAR-g induz a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) nos adipócitos, aumentando a sensibilidade à insulina e facilitando a captação de ácidos graxos pelos adipócitos, o que reduz os danos lipotóxicos aos tecidos sensíveis à insulina (Kanda et al., 2010). Assim, a ativação conjunta dos receptores PPAR-a e PPAR-g emerge como uma abordagem terapêutica promissora para prevenir ou controlar o espectro de complicações metabólicas associadas ao DM2.

A hipótese central deste estudo é que a ativação combinada dos receptores PPAR-a/g pode atenuar a lipotoxicidade e a resistência à insulina, resultando em uma remodelação benéfica das ilhotas pancreáticas e preservação da função das células beta, num modelo experimental de obesidade induzida por dieta.

1 **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1. Pâncreas: uma visão comparativa entre humanos e camundongos

Os camundongos representam o modelo animal mais amplamente utilizado nos estudos sobre o pâncreas devido à sua conveniência experimental e ao fato de compartilharem características fisiológicas fundamentais com humanos. Contudo, para que os resultados obtidos nesses modelos possam ser adequadamente extrapolados para a espécie humana, é imprescindível considerar tanto as similaridades quanto as diferenças que caracterizam o pâncreas em cada espécie. Além das distinções evidentes no tamanho e na organização macroscópica do órgão, há diferenças mais sutis, como na vascularização e inervação, na disposição do tecido exócrino acinar e ductal, composição, distribuição e arquitetura das ilhotas endócrinas.

1.1.1. <u>Anatomia</u>

O pâncreas é um órgão vital multifuncional que desempenha funções exócrinas e endócrinas essenciais na digestão e regulação de substratos energéticos. Estruturalmente, consiste em duas porções glandulares distintas que se originam do intestino primitivo durante o desenvolvimento embrionário, organizando-se de forma integrada para garantir a execução de processos metabólicos essenciais.

Em humanos saudáveis, o pâncreas é uma glândula bem definida e lobulada, pesando entre 50 a 100g, com cerca de 14 a 18 cm de comprimento, 2 a 9 cm de largura e 2 a 3 cm de espessura. Ele está localizado retroperitonealmente, na parede abdominal posterior, e é dividido macroscopicamente em três regiões principais: cabeça, corpo e cauda (Skandalakis *et al.*, 1993) como ilustrado na Figura 1 A, com algumas classificações reconhecendo ainda o processo uncinado e o pescoço como subdivisões adicionais (Suda *et al.*, 2006).

A cabeça do pâncreas é caracterizada por sua forma em "C", alinhada com a curvatura do duodeno. O corpo plano e estreito estende-se horizontalmente no plano medial, cruzando estruturas vasculares importantes, como a artéria e a veia mesentérica superior, a aorta abdominal, a veia cava inferior e a veia porta. Já a cauda do pâncreas estende-se até o hilo do baço, completando sua estrutura anatômica. O órgão é envolto por uma cápsula fibrosa, com septos de tecido conjuntivo que separam seu parênquima em lobos e lóbulos menores. O mesênquima, que contém numerosas células de gordura, representa entre 15% e 25% do volume total do órgão (Leung, 2010a; Mahadevan, 2019).

Sua vascularização é provida por uma complexa rede arterial, que inclui a artéria pancreático-duodenal e ramificações da artéria esplênica, as quais nutrem o tecido pancreático e asseguram uma perfusão adequada para sustentar tanto as funções exócrinas quanto endócrinas do órgão, enquanto a drenagem venosa ocorre predominantemente pelo sistema porta e a inervação é mediada pelo plexo celíaco e pelo nervo vago (Leung, 2010b; Mahadevan, 2019).

O pâncreas de camundongos apresenta uma estrutura distinta, com formato difuso e dendrítico entre o mesentério e o intestino delgado proximal. Este órgão não é tão bem definido quanto nos humanos, mas pode ser dividido em três partes principais: o lobo duodenal, o lobo esplênico e o lobo gástrico (Molnár *et al.*, 2020) como ilustrado na Figura 1B. O lobo esplênico é o maior, correspondendo a mais da metade do volume pancreático total, e estende-se horizontalmente entre o duodeno e o baço, sendo homólogo ao corpo e à cauda do pâncreas humano. Já o lobo duodenal está embutido no mesentério ao redor do duodeno, correspondendo à cabeça do pâncreas humano. O menor lobo, o gástrico, surge como uma extensão do lobo esplênico durante a ontogenia e é considerado análogo ao processo piramidal humano, uma estrutura variável presente em aproximadamente metade dos humanos adultos (Hörnblad *et al.*, 2011; Molnár *et al.*, 2020).

Os lobos pancreáticos em camundongos são separados por áreas de tecido adiposo, conjuntivo e linfático, dificultando sua remoção completa e a determinação precisa de sua massa. Essa organização difusa, embora estruturalmente distinta da dos humanos, reflete uma adaptação a sua fisiologia compacta, mantendo as funções exócrinas e endócrinas altamente conservadas (Dolensek *et al.*, 2015).

Essa organização anatômica menos definida reflete a adaptação a uma fisiologia mais compacta. Apesar dessas diferenças estruturais, as funções exócrinas

e endócrinas permanecem altamente conservadas entre as espécies, assegurando a regulação metabólica essencial.



Figura 1 – Anatomia macroscópica do pâncreas humano e do camundongo

Legenda: (A) O pâncreas humano consiste na cabeça, no corpo e na cauda. (B) O pâncreas de camundongo tem 3 lobos menos definidos: o duodenal, o gástrico e o esplênico. Observe a diferença de 10 vezes na dimensão linear (que explica a diferença de 1000 vezes no tamanho do órgão e do organismo). O código de cores indica peças homólogas. Fonte: Adaptada de (Dolensek *et al.*, 2015)

1.1.2. Desenvolvimento embrionário e diferenciação celular

O desenvolvimento do pâncreas é um processo que demonstra alto grau de conservação entre humanos e camundongos. Contudo, variações temporais e estruturais refletem diferenças adaptativas relacionadas às demandas metabólicas específicas de cada espécie.

Durante a organogênese, tanto em humanos quanto em camundongos, o pâncreas se origina de brotos endodérmicos dorsais e ventrais a partir do duodeno primitivo, visíveis em torno do 29º ao 31º dia pós-concepção em humanos e entre os dias embrionários e8 e e9 em camundongos (Mahadevan, 2019). O processo de diferenciação celular é mediado pela ativação de fatores de

transcrição cruciais, como Pdx1 ("*pancreatic and duodenal homeobox*"), um marcador essencial para a linhagem pancreática e Ngn3 ("*neurogenin 3*"), um fator de transcrição necessário para a diferenciação em células alfa, que são indispensáveis para a formação das linhagens celulares endócrinas (Kieffer e Habener, 2000b) (Henry *et al.*, 2019). Nos estágios finais da transição primária (e8.5-e12.5) e durante a fase de proliferação secundária (e11.5-e14.5) em camundongos, ocorre uma expansão significativa das linhagens celulares. O desenvolvimento das células alfa e beta é regulado por fatores como Pax4 ("paired box gene 4") e Arx ("aristaless related homeobox"), que promovem a diferenciação em células beta e alfa, respectivamente (Rukstalis e Habener, 2009).

Em humanos, as células produtoras de insulina surgem ainda no primeiro trimestre de gestação, seguidas por aquelas que produzem glucagon e somatostatina. Posteriormente, aparecem células produtoras de polipeptídeo pancreático (PP) e grelina, consolidando a diversidade celular das ilhotas pancreáticas (Henry *et al.*, 2019).

Ao longo do desenvolvimento, tanto humanos quanto camundongos apresentam plasticidade celular nas ilhotas de Langerhans. Estudos demonstram que células alfa podem se diferenciar em células beta em resposta a demandas metabólicas ou lesões celulares, evidenciando o potencial regenerativo do pâncreas (Habener e Stanojevic, 2012; Saleh *et al.*, 2021; Hædersdal *et al.*, 2023).

Em humanos, a arquitetura adulta das ilhotas é alcançada aproximadamente dois anos após o nascimento, acompanhada por um aumento na área e massa das células beta, bem como na proporção de células beta para alfa. Em contrapartida, em camundongos, a estabilidade das ilhotas é observada após as primeiras 3-4 semanas de vida, com predomínio da organização do tipo manto durante toda a vida adulta (Hörnblad *et al.*, 2011; Saleh *et al.*, 2021).

Em humanos, as ilhotas de Langerhans são formadas no primeiro trimestre de gestação, enquanto em camundongos esse processo ocorre entre os dias embrionários e10 e e11(Mahadevan, 2019). Além disso, as proporções celulares diferem significativamente, com os camundongos apresentando uma maior densidade de células beta (50-80%) em comparação aos humanos (50-70%), refletindo suas diferentes necessidades metabólicas.

1.1.3. Vascularização e inervação

A vascularização do pâncreas desempenha um papel essencial na regulação funcional do órgão, facilitando o fornecimento de nutrientes e hormônios. Esse sistema se desenvolve inicialmente por meio de processos de vasculogênese e angiogênese. As ilhotas de Langerhans recebem cerca de 10 vezes mais sangue por unidade de massa do que o tecido exócrino, tanto em humanos quanto em camundongos, refletindo sua alta demanda metabólica (Mastracci *et al.*, 2023).

O pâncreas humano recebe cerca de 1% do débito cardíaco, com sangue arterial proveniente das artérias celíaca e mesentérica superior. A cabeça do pâncreas é suprida por duas arcadas arteriais (anterior e posterior), formadas por ramos das artérias pancreaticoduodenais superiores e inferiores, que se anastomosam amplamente. O corpo e a cauda são irrigados por ramos da artéria esplência, incluindo a artéria pancreática dorsal e a artéria pancreática magna (Leung, 2010a; Mahadevan, 2019). A rede de capilares distribuídos ao longo das ilhotas de Langerhans é fundamental para o fornecimento rápido de glicose e outros nutrientes, sendo este fator de extrema importância para a função endócrina das ilhotas. Estudos indicam que o padrão de distribuição vascular no pâncreas pode facilitar a exposição simultânea das células endócrinas a alterações nos níveis de glicose e hormônios circulantes, criando um ambiente propício à detecção e resposta imediata a variações glicêmicas (Mastracci et al., 2023). A drenagem venosa segue um padrão semelhante ao suprimento arterial, com veias pancreaticoduodenais drenando para a veia porta e suas tributárias. A microvasculatura das ilhotas humanas é organizada no sistema portal insulo-acinar, como ilustrado na Figura 2, permitindo que o sangue das ilhotas atinja os acinos, influenciando diretamente a secreção exócrina (Mastracci et al., 2023).

A organização vascular em camundongos é amplamente homóloga à dos humanos, com diferenças no fato de que nos camundongos as ilhotas possuem capilares localizados predominantemente entre os lobos, formando o sistema insulo-venoso, que coleta sangue em veias interlobulares. Essa organização reflete as adaptações anatômicas às menores dimensões do órgão (Dolensek *et al.*, 2015; Molnár *et al.*, 2020).

Com relação à inervação, o pâncreas humano é ricamente inervado por fibras simpáticas, parassimpáticas e aferentes, que entram no órgão como pedúnculos neurovasculares, seguindo vasos sanguíneos e interagindo com capilares e células endócrinas. Essa inervação contribui para a regulação da secreção de insulina durante a fase cefálica da alimentação e modula a resposta ao glucagon durante a estimulação simpática. Estudos sugerem que, em humanos, as fibras nervosas se concentram nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos, promovendo efeitos indiretos na função endócrina (Mastracci *et al.*, 2023).

Em camundongos, a inervação é amplamente homóloga à dos humanos, embora com distribuições mais uniformes entre os lobos pancreáticos. As fibras simpáticas são responsáveis por interagir diretamente com as células alfa nas ilhotas, enquanto as fibras parassimpáticas têm contato com todos os tipos celulares. A estimulação nervosa em camundongos mostrou influenciar a liberação de insulina e glucagon, refletindo um controle neural mais direto em relação aos humanos (Dolensek *et al.*, 2015).





Legenda: Nesse sistema, as células das ilhotas e as células acinares estão dispostas de forma tão próxima que ficam em contato direto por meio dos hormônios peptídicos das ilhotas, permitindo que a interação entre as funções exócrinas e endócrinas influencie a função das células acinares. Fonte: Adaptada de (Po Sing Leung, 2010).

1.1.4. Porções exócrina e endócrina

A estrutura funcional do pâncreas é organizada em duas porções principais: a exócrina e a endócrina, cada uma desempenhando papéis específicos e vitais para a digestão e a regulação metabólica.

Em humanos, a porção exócrina constitui cerca de 80% da massa pancreática, enquanto em camundongos essa proporção é ainda maior devido ao menor número de células endócrinas em relação à massa total do pâncreas. Essa porção é composta majoritariamente por ácinos pancreáticos, formados por células serosas e ductais especializadas na produção do suco pancreático (~1200-1500 ml/dia em humanos), o qual é composto por bicarbonato e enzimas digestivas, como tripsinogênio, quimotripsinogênio, amilase e lipase. Essas enzimas são essenciais para a digestão eficiente de proteínas, carboidratos e lipídios no intestino delgado (Leung, 2010a; Henry et al., 2019; Dumasia e Pethe, 2020). A estimulação da secreção de enzimas é predominantemente controlada pela presença de nutrientes e pela sinalização hormonal (colecistoquinina e secretina) e neural (inervação autonômica), garantindo às necessidades digestivas uma resposta coordenada (Leung, 2010a).

Nos camundongos, os ácinos e o sistema ductal são organizados de forma semelhante aos humanos, mas o tamanho geral dos ácinos e a densidade do sistema ductal são menores, refletindo as diferenças na demanda metabólica entre as espécies (Dolensek *et al.*, 2015).

A porção endócrina do pâncreas, representada pelas ilhotas de Langerhans, desempenha um papel essencial na regulação metabólica. Essas ilhotas, que representam 1-4% da massa pancreática total em humanos e cerca de 1-2% em camundongos, são pequenas estruturas esféricas ou alongadas, variando de 50 a 500 µm de diâmetro. Além das ilhotas, células endócrinas únicas estão espalhadas pelo tecido acinar e ductal, especialmente em camundongos, onde representam uma reserva potencial para regeneração celular em resposta a danos ou demandas metabólicas elevadas (Leung, 2010a; Dolensek *et al.*, 2015; Dumasia e Pethe, 2020).

Nos humanos, as ilhotas estão distribuídas de maneira relativamente homogênea entre as regiões intralobulares e interlobulares, com maior densidade na cauda do pâncreas. Além disso, apresentam uma composição celular caracterizada por uma proporção de células beta que varia entre 50-70% e de células alfa entre 20-40%, com células delta representando 5-10% e células épsilon e gama contribuindo com menos de 1% e até 10%, respectivamente.

A arquitetura das ilhotas humanas é altamente heterogênea. Além do padrão manto-núcleo, onde células beta ocupam o centro e células alfa e delta formam a periferia, foi descrita uma organização em placas trilaminares, com células alfa flanqueando uma camada central de células beta, como representado na Figura 3E. Esse arranjo estrutural favorece interações heterólogas mais frequentes entre os diferentes tipos celulares, promovendo maior sensibilidade à glicose e respostas metabólicas eficientes. Essa característica pode explicar, em parte, a maior plasticidade adaptativa das ilhotas humanas em condições de alta demanda por insulina, como obesidade e diabetes (Habener e Stanojevic, 2012; Saleh *et al.*, 2021; Hædersdal *et al.*, 2023).

Nos camundongos, as ilhotas estão predominantemente localizadas na periferia dos lóbulos pancreáticos, sendo principalmente interlobulares. Essa posição anatômica pode ser explicada por fatores de desenvolvimento embrionário e pela organização dos lóbulos pancreáticos nos modelos murinos. A composição celular das ilhotas em camundongos é marcada por uma proporção maior de células beta (60-80%) e uma proporção menor de células alfa (10-20%), em comparação aos humanos. Células delta, épsilon e gama são encontradas em proporções semelhantes às dos humanos, representando menos de 10% e 1% do total de células, respectivamente (Leung, 2010a; Mahadevan, 2019).

A organização estrutural das ilhotas murinas segue predominantemente o padrão manto-núcleo, com células beta concentradas no núcleo e células alfa formando a periferia, como representado na Figura 3F. Esse arranjo promove contatos homólogos entre células do mesmo tipo, limitando as interações entre diferentes tipos celulares. Embora funcionalmente eficaz para as demandas metabólicas dos camundongos, essa organização é menos complexa (Dolensek *et al.*, 2015).

1.1.5. Funções das Células Endócrinas

1. Células beta: São responsáveis pela produção e liberação de insulina, um hormônio anabólico que reduz os níveis de glicose no sangue, promovendo sua captação e armazenamento nos tecidos periféricos (especialmente músculo e tecido adiposo) e inibindo a gliconeogênese hepática. O processo de produção da insulina envolve uma sequência complexa de eventos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde a pré-pró-insulina, uma forma precursora, é primeiramente clivada em pró-insulina. A clivagem final, que gera a insulina madura, é mediada por pró-hormônio convertases no complexo de Golgi, com remoção do peptídeo C, e tanto a insulina quanto o peptídeo C são secretados em quantidades equivalentes. Clinicamente, a aferição do peptídeo C é usada como um marcador da produção de insulina, pois ele não é metabolizado pelo fígado, refletindo a secreção endógena de insulina (Nussey e Whitehead, 2001; Dolensek *et al.*, 2015).

2. Células alfa: Produzem e secretam glucagon, um hormônio com efeitos catabólicos que eleva a glicemia em resposta a níveis baixos de glicose, estimulando a glicogenólise e a gliconeogênese no fígado. A síntese de glucagon é realizada a partir da molécula precursora pré-glucagon, processada pela enzima pró-hormônio convertase PC2 nas células alfa. Interessantemente, no intestino, o pré-glucagon é clivado por uma enzima distinta, a PC1/3, gerando peptídeos como o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1), que regula a secreção de insulina e a função intestinal, evidenciando a diversidade funcional do gene do pré-glucagon em diferentes tecidos (Nussey e Whitehead, 2001; Dolensek *et al.*, 2015).

3. Células delta: Produzem e secretam somatostatina, um hormônio inibitório que suprime a liberação de insulina e glucagon e diminui a secreção ácida estomacal, desempenhando um papel regulatório essencial nas interações entre as células das ilhotas e na modulação do eixo digestivo e endócrino (Felig *et al.*, 1976; Dolensek *et al.*, 2015).

4. Células épsilon: Produzem e secretam grelina, um hormônio que estimula o apetite e influencia a secreção de insulina, além de desempenhar funções moduladoras na deposição de gordura. No contexto pancreático, a grelina exerce

ações complexas na modulação da secreção insulínica e na regulação do metabolismo energético (Zhang *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Dolensek *et al.*, 2015).

5. Células gama (ou PP): Produzem e secretam o polipeptídeo pancreático (PP), que exerce efeitos moduladores na função exócrina do pâncreas e na motilidade gastrointestinal. Estas células são mais comumente encontradas na cabeça do pâncreas, destacando-se por seu papel regulador nos processos digestivos e na interação entre as porções exócrina e endócrina (Tong *et al.*, 2007; Dolensek *et al.*, 2015).

A interação funcional entre esses tipos celulares dentro das ilhotas, bem como sua comunicação com o sistema exócrino, exemplifica a complexidade do eixo insularacinar. O controle neural e hormonal exerce influência decisiva sobre as atividades das células acinares, promovendo uma regulação integrada das funções digestivas e endócrinas através de vias neurócrinas, endócrinas e parácrinas (Mastracci *et al.*, 2023).

Em ambos as espécies, a combinação das funções exócrina e endócrina assegura uma comunicação precisa com o organismo, sustentando as necessidades metabólicas em diferentes contextos nutricionais, tanto em períodos de jejum quanto após a ingestão alimentar, o que é essencial para o controle glicêmico adequado.



Figura 3 – Anatomia microscópica do pâncreas humano e do camundongo

Legenda: Anatomia microscópica do pâncreas humano e do pâncreas de camundongo, respectivamente (A e B). Ao ampliar uma porção do pâncreas, observa-se lóbulos maiores em humanos em comparação aos camundongos, enquanto as ilhotas de Langerhans possuem tamanho relativamente comparável em humanos e camundongos (C e D). A composição celular e a localização das ilhotas de Langerhans dentro do pâncreas são marcadamente diferentes entre as duas espécies (E e F). As células endócrinas mais distribuídas de forma difusa em humanos (E) e o padrão de núcleo e manto em camundongos (F).

Fonte: Adaptada de (Dolensek et al., 2015).

1.2. Controle glicêmico ideal

A glicose é um substrato indispensável para a respiração celular, sendo o principal combustível para todas as células do organismo. Proveniente da digestão de carboidratos ingeridos através da alimentação, a glicose fornece energia essencial para as atividades celulares. Quando não utilizada imediatamente como fonte de energia, a glicose pode ser armazenada pelo fígado e músculos sob a forma de glicogênio ou convertida em triglicerídeos e acumulada no tecido adiposo (Nussey e Whitehead, 2001).

A regulação dos níveis sanguíneos de glicose é crucial para manter a homeostase metabólica e o funcionamento celular normal. Esse controle é exercido por um sistema de feedback hormonal complexo, com participação do sistema nervoso autônomo. Nele, células especializadas, particularmente as células beta e alfa do pâncreas, monitoram os níveis de glicose sanguínea e respondem liberando insulina ou glucagon, conforme necessário. Em indivíduos saudáveis, a faixa de glicemia ideal situa-se entre 70 mg/dL em jejum e 110 mg/dL duas horas após uma refeição. A glicose extracelular é detectada pelas células beta, que possuem transportadores de glicose 2 (GLUT2) nas microvilosidades dos canalículos que atravessam a superfície celular. Este transporte permite que a concentração de glicose dentro das células beta reflita rapidamente as alterações no ambiente extracelular (Leung, 2010c).

A resposta secretória de insulina das células beta é bifásica e diretamente proporcional à concentração de glicose. Esta secreção é conhecida como "secreção de insulina estimulada por glicose" (GSIS, do inglês "*glucose-stimulated insulin secretion*"). A primeira fase caracteriza-se por um pico rápido de liberação de insulina armazenada, seguido de uma fase sustentada, em que ocorre a síntese de insulina de novo para garantir um nível contínuo de resposta (Berger e Zdzieblo, 2020). Esse mecanismo de resposta ocorre através da glicose absorvida pelos transportadores GLUT2, fosforilada em glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase, que entra no ciclo de Krebs para produção de trifosfato de adenosina (ATP). O aumento de ATP promove o fechamento de canais de potássio dependentes de ATP, resultando na despolarização da membrana e ativação de canais de cálcio, o que culmina na

exocitose dos grânulos de insulina (Cerf, 2020). A Figura 4 detalha o processamento da insulina na célula beta.

Além da glicose, vias de sinalização como fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e adenosina monofosfato cíclico (AMPc) potencializam a GSIS, ativando cascatas de sinalização secundárias, como a do trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), que amplificam a liberação de insulina. Hormônios e neurotransmissores, como acetilcolina, também participam na modulação dessa secreção por meio da ativação de receptores muscarínicos, que acionam fosfolipase C e proteína quinase C, intensificando o efeito glicêmico na resposta secretória (Zhu *et al.*, 2020).

O controle glicêmico também depende de hormônios liberados durante a digestão, como o GLP1 e o GIP (peptídeo insulinotrópico dependente de glicose), ambos classificados como incretinas. Essas incretinas aumentam a resposta insulínica pós-prandial, potencializando a normalização da glicose sanguínea após a refeição. Entretanto, a ação das incretinas é transitória, pois são rapidamente degradadas pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) (Leung, 2010c).

Em contrapartida, o glucagon secretado pelas células alfa eleva a glicemia quando os níveis de glicose diminuem, como durante o jejum ou atividade física intensa. A ação do glucagon inclui a promoção da glicogenólise hepática e da gliconeogênese, além da lipólise, gerando ácidos graxos e glicerol para produção de energia (Leung, 2010c). Esse controle é modulado por "feedback" negativo, onde o aumento da glicose inibe a liberação de glucagon, estabilizando a glicemia.

Em resposta a um excedente energético prolongado, o corpo desenvolve adaptações que afetam o pâncreas e outros órgãos, promovendo a resistência à insulina. Esse estado leva a um esforço compensatório das células beta, que com o tempo resulta em sobrecarga e possível comprometimento da homeostase glicêmica.



Figura 4 – Citoarquitetura do pancreas e o processamento da insulina na célula beta

Legenda: Em condições de homeostase, quando os níveis de glicose no sangue estão normais, a prépró-insulina é traduzida, dobrada e modificada no retículo endoplasmático; posteriormente, é secretada como insulina madura (A). Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, as células beta respondem aumentando drasticamente a síntese e o depósito de pré-pró-insulina no retículo endoplasmático. Esse aumento na carga de proteínas no retículo resulta em um dobramento incorreto da pró-insulina, ativando o estresse do retículo e a via UPR (resposta a proteínas mal dobradas). Além disso, mudanças ultraestruturais aparecem no retículo, como dilatação e hipertrofia de suas cisternas (B).

Fonte: Adaptada de (Fernandes-da-Silva et al., 2021).

1.3. Dieta hiperlipídica, balanço energético positivo e obesidade

Nas últimas décadas, a transição nutricional observada em grande parte da população mundial caracterizou-se pelo aumento expressivo do consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em gorduras saturadas, ácidos graxos trans e carboidratos refinados, paralelamente à diminuição do consumo de fibras e nutrientes essenciais. Esses alimentos, amplamente reconhecidos por sua alta densidade energética e palatabilidade aumentada, são vetores de um desequilíbrio energético

significativo, levando a um aumento nos níveis de adiposidade e, consequentemente, na prevalência de obesidade (Mancini, 2016; Louzada *et al.*, 2023).

No Brasil, estudos mostram que a proporção de alimentos ultraprocessados no consumo total de energia representa cerca de 20%, sendo esse índice ainda mais expressivo entre adolescentes e indivíduos com maior renda e escolaridade. Dados recentes do Vigitel 2023 revelaram que 17,7% dos brasileiros consumiram cinco ou mais tipos de ultraprocessados no dia anterior à coleta de dados, o que reflete uma tendência preocupante (de Orçamentos Familiares, 2020; Migowski e da Costa, 2024). Esse comportamento alimentar é um importante contribuinte para o aumento da obesidade, que, conforme demonstram os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma condição que atinge quase 1 bilhão de pessoas globalmente (1 a cada oito pessoas em 2022). A obesidade, além de ser um importante fator de risco para o DM2, é reconhecida como uma condição multifatorial, resultado de uma interação predisposição entre genética, influências epigenéticas, complexa fatores psicossociais e ambientais, bem como mudanças comportamentais (Seidell e Halberstadt, 2015; Cuciureanu et al., 2023).

A relação entre o aumento da ingestão energética e a obesidade é particularmente grave em dietas hiperlipídicas, ricas em ácidos graxos saturados. Esses ácidos graxos promovem a resistência à insulina e estimulam o acúmulo de gordura nos tecidos adiposos e ectópicos, gerando um quadro inflamatório que intensifica a resistência à insulina e prejudica a homeostase glicêmica. O acúmulo de gordura nos adipócitos leva à hipertrofia e à expansão excessiva do tecido adiposo, que, por sua vez, atinge um limite de expansão (Teodoro *et al.*, 2014). Este limite resulta na liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que intensificam a resistência à insulina nos tecidos periféricos, inclusive no fígado e músculos, favorecendo um ambiente metabólico propício ao desenvolvimento de doenças como o DM2 e a doença hepática gordurosa metabólica (DHGM) (Tilg e Moschen, 2006).

1.4. Expansão Adiposa, Condições Metabólicas Adversas e Diabetes Mellitus

A expansão excessiva do tecido adiposo (TA) está no cerne das condições metabólicas adversas associadas à obesidade e ao DM2. Além de ser o maior

reservatório de energia do corpo, o TA desempenha importantes funções endócrinas, produzindo e liberando hormônios e adipocinas. A expansão exacerbada, especialmente no tecido adiposo visceral, gera inflamação crônica de baixo grau, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de macrófagos no TA. Este tecido libera AGNE e citocinas diretamente na circulação portal, impactando o fígado e contribuindo para a resistência hepática à insulina (Kirpich *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2023).

Essa resistência à insulina, agravada pela inflamação crônica, inicialmente é compensada por uma resposta adaptativa das células beta pancreáticas, que aumentam a produção de insulina, resultando em hiperinsulinemia. Entretanto, à medida que a demanda metabólica excede a capacidade funcional das células beta, estas entram em falência secretória, incapazes de controlar a glicose circulante. A deficiência no efeito incretina, mediado por hormônios como GLP1 e GIP, exacerba a hiperglicemia pós-prandial, adicionando mais carga ao pâncreas (Holst *et al.*, 2011; Nauck e Meier, 2016).

A glicotoxicidade e a lipotoxicidade desempenham papéis centrais nesse processo, como ilustrado na Figura 5. A glicotoxicidade resulta do acúmulo de glicose nas células beta, que ativa vias metabólicas como a glicólise e o ciclo de Krebs, levando à produção exacerbada de ATP. Este aumento de ATP despolariza a membrana celular, estimulando a secreção contínua de insulina. Em condições de hiperglicemia crônica, essa atividade gera estresse do retículo endoplasmático, acumulando proteínas mal dobradas e ativando a resposta à proteína desdobrada (UPR), como ilustrado na Figura 4. Em casos prolongados, a UPR induz apoptose celular (Teodoro *et al.*, 2014; Vilas-Boas *et al.*, 2021).

Por outro lado, a lipotoxicidade, causada pelo acúmulo excessivo de AGNE nas células beta, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) em níveis elevados durante a oxidação mitocondrial. Isso promove estresse oxidativo, danificando membranas celulares e prejudicando a viabilidade e função das células beta. Adicionalmente, o ambiente hiperlipídico e hiperglicêmico favorece a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que, ao se ligarem aos receptores nas células beta, ativam vias inflamatórias que contribuem para a disfunção e morte celular (Cerf, 2010; Wagner *et al.*, 2022).

A cronicidade desse ciclo de glicotoxicidade, lipotoxicidade e estresse metabólico leva à redução progressiva da massa de células beta e ao colapso

funcional do pâncreas, consolidando o quadro de DM2. De acordo com o mais recente guideline da "*American Diabetes Association*" (ADA), o DM2 é caracterizado pela perda progressiva da capacidade de secreção de insulina pelas células beta, geralmente no contexto de resistência à insulina e síndrome metabólica. O diagnóstico pode ser estabelecido pelos seguintes critérios: hemoglobina glicada (A1c) \geq 6,5%; glicemia de jejum \geq 126 mg/dL (após pelo menos 8 horas de jejum); glicemia \geq 200 mg/dL após 2 horas no teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com 75 g de glicose; ou glicemia plasmática aleatória \geq 200 mg/dL na presença de sintomas clássicos de hiperglicemia, como poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada (Committee, 2023).

Figura 5 – Mecanismos moleculares da morte de células β induzida por lipo e glucolipotoxicidade



Legenda: Um suprimento prolongado e aumentado de ácidos graxos livres (AGL) e/ou uma composição desequilibrada de AGL, isoladamente ou em combinação com altos níveis de glicose, desencadeia respostas de estresse nas células beta pancreáticas. Essas respostas incluem estresse do retículo endoplasmático (RE), estresse oxidativo com produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial, inflamação e fluxo autofágico comprometido. A interação entre essas vias pode gerar mecanismos de retroalimentação positiva, agravando o estresse glucolipotóxico. Coletivamente, esses fenômenos culminam em disfunção das células beta, apoptose e, possivelmente, desdiferenciação.

Fonte: Adaptada de (Lytrivi et al., 2020a)
1.5. Plasticidade Celular e Respostas Adaptativas do Pâncreas

A plasticidade das células endócrinas pancreáticas, especialmente das células beta e alfa, é central na tentativa do organismo de manter a homeostase glicêmica em condições adversas, como na resistência à insulina ou em um ambiente glicotóxico e lipotóxico. Essa plasticidade refere-se à capacidade dessas células de modificar suas funções ou identidades celulares em resposta a estresses metabólicos. No contexto da resistência à insulina, as células beta inicialmente aumentam sua capacidade de secreção de insulina para compensar a redução na sensibilidade dos tecidos periféricos, resultando em hiperinsulinemia compensatória. Entretanto, essa adaptação não é ilimitada: à medida que a sobrecarga metabólica persiste, as células beta entram em um estado de estresse crônico que desencadeia respostas celulares complexas, incluindo desdiferenciação, transdiferenciação e apoptose. Por outro lado, células alfa podem demonstrar uma plasticidade adaptativa, transdiferenciando-se em células beta em uma tentativa de suprir a demanda por insulina (Puri e Hebrok, 2010) (Baeyens e Bouwens, 2009).

Essa capacidade de adaptação é fundamental não apenas para a funcionalidade imediata do pâncreas, mas também para sua longevidade, definida neste trabalho pela manutenção de sua viabilidade e funcionalidade, sendo ao longo do tempo crucial para o bom funcionamento do órgão e, por extensão, para a regulação metabólica do organismo. Quando a plasticidade das células endócrinas é bem-sucedida em responder aos desafios metabólicos, há uma preservação da integridade funcional do pâncreas, retardando o desenvolvimento de falência celular e doenças metabólicas crônicas, como o diabetes mellitus tipo 2.

1.5.1. Desdiferenciação das Células beta

A desdiferenciação das células beta ocorre quando estas regridem de um estado altamente especializado de secreção de insulina para um estado mais indiferenciado, perdendo características funcionais importantes. Esse processo é desencadeado principalmente pelo estresse glicotóxico e lipotóxico contínuo, que

provoca um desequilíbrio nos fatores de transcrição essenciais para a manutenção da identidade beta. Genes como *Pdx1*, *Nkx6.1* ("*NK6 Homeobox 1*") e *MafA* ("*MAF bZIP transcription factor A*"), cruciais para a funcionalidade e sobrevivência das células beta, sofrem regulação negativa sob estresse crônico, resultando na perda de expressão de insulina e de outras proteínas envolvidas na secreção hormonal. Com a redução desses fatores, as células beta perdem progressivamente sua capacidade de responder a estímulos glicêmicos de forma eficiente, entrando em um estado de baixa funcionalidade (Bensellam *et al.*, 2018; Son e Accili, 2023).

Durante a desdiferenciação, as células beta podem reativar genes normalmente expressos apenas em fases embrionárias ou em outros tipos de células das ilhotas, como Ngn3 e Oct4 (conhecido também como Pou5f1: "POU domain, class 5, transcription factor 1") indicando uma reversão a um estado progenitor. Esse mecanismo inicial busca preservar a viabilidade celular ao reduzir as demandas metabólicas impostas pela secreção de insulina. No entanto, a persistência nesse estado limita a capacidade funcional do pâncreas, contribuindo para o declínio progressivo no controle glicêmico (Habener e Stanojevic, 2012).

1.5.2. Transdiferenciação e Adaptação Celular

Outro mecanismo adaptativo observado nas células das ilhotas pancreáticas é a transdiferenciação, onde células beta podem assumir características de outros tipos celulares das ilhotas, como células alfa ou delta, e vice-versa. Em condições extremas de estresse metabólico e perda significativa de células beta, células alfa podem se transdiferenciar em células beta como uma tentativa de compensar a demanda por insulina. Esse processo é mediado por alterações nos fatores de transcrição que mantêm a identidade celular, como *Pax4* e *Arx*. A superexpressão de *Pax4*, por exemplo, promove a reprogramação de células alfa para células beta, enquanto a deleção de *Arx*, essencial para a manutenção da identidade alfa, pode induzir a conversão (Thorel *et al.*, 2010; Courtney *et al.*, 2013).

Evidências experimentais demonstraram que, em camundongos submetidos à destruição seletiva de células beta, as células alfa foram capazes de se reprogramar para assumir características beta, contribuindo para a restauração parcial da secreção

de insulina e melhora da homeostase glicêmica (Thorel *et al.*, 2010). Esse fenômeno de transdiferenciação alfa para beta também foi observado em experimentos "*in vitro*", onde células alfa humanas foram induzidas a se transformar em células beta por meio de manipulação genética ou exposição a fatores de crescimento (Bramswig *et al.*, 2013; Courtney *et al.*, 2013). No entanto, embora promissor, esse mecanismo parece limitado em humanos e ocorre de maneira insuficiente para reverter o quadro de disfunção observado em diabetes avançado.

Por outro lado, a transdiferenciação beta para alfa pode ocorrer em condições de estresse extremo, levando à coexpressão transitória de insulina e glucagon em células multihormonais. Embora inicialmente adaptativa, essa conversão compromete a funcionalidade das ilhotas, pois a secreção aumentada de glucagon pelas células alfa exacerba a hiperglicemia e dificulta o controle glicêmico (Habener e Stanojevic, 2012; Son e Accili, 2023).

Embora os processos de desdiferenciação e transdiferenciação representem mecanismos adaptativos importantes, eles geralmente falham em compensar a disfunção progressiva imposta pela resistência à insulina e pelo estresse metabólico. A persistência da glicotoxicidade e lipotoxicidade, combinada com a inflamação crônica, promove a apoptose celular e reduz ainda mais a massa de células β , consolidando a falência funcional do pâncreas (Prentki e Nolan, 2006; Poitout e Robertson, 2008; Donath e Shoelson, 2011). Isso ressalta a complexidade e os limites das respostas adaptativas do pâncreas em um ambiente disfuncional imposto pelo DM2.

1.5.3. Perda Progressiva da Função e Identidade Celular

Com a persistência de um ambiente glicotóxico e lipotóxico, o pâncreas experimenta uma perda substancial da massa de células beta. Essa perda ocorre não apenas devido à apoptose, mas também por uma perda progressiva da identidade celular das células beta. A ausência de fatores de transcrição essenciais e o impacto do estresse oxidativo e do retículo endoplasmático induzem uma mudança no fenótipo celular que contribui para a incapacidade do pâncreas em sustentar uma resposta insulínica adequada.

Esse processo de "perda de identidade" está diretamente associado à inflamação crônica, que, ao ativar vias inflamatórias e de estresse celular, como o NFκB (fator nuclear kappa B) e o estresse do retículo endoplasmático, agrava a deterioração da função beta. As citocinas pró-inflamatórias e as ROS geradas pelo ambiente hiperglicêmico e hiperlipídico não apenas induzem a apoptose, mas também suprimem as vias de sinalização que sustentam a expressão dos genes necessários para a funcionalidade beta. A resposta prolongada a esses estímulos inflamatórios e ao estresse do retículo endoplasmático leva as células beta a uma "dormência" funcional, onde as células permanecem viáveis, mas metabolicamente inativas, exacerbando a insuficiência insulínica progressiva (Wagner *et al.*, 2022).

1.5.4. Perspectivas Terapêuticas e Reversão da Plasticidade Patológica

Estudos recentes têm investigado a possibilidade de reverter а desdiferenciação e a transdiferenciação das células beta através de intervenções terapêuticas que reativem a expressão dos fatores de transcrição que promovem a função e identidade beta, como Pdx1, Nkx6.1 e MafA. Essas intervenções incluem o uso de antioxidantes e moduladores de sinalização, que visam mitigar o impacto do estresse oxidativo e restaurar as vias de sinalização do retículo endoplasmático. Em modelos experimentais, essas abordagens têm mostrado resultados promissores na recuperação parcial da função das células beta e na preservação de sua viabilidade, representando um caminho para interromper o ciclo de falência funcional (Son e Accili, 2023).

Além disso, abordagens que visam à reprogramação de células acinares e ductais para um fenótipo beta têm sido exploradas como uma estratégia regenerativa, expandindo o "*pool*" de células capazes de secretar insulina em estados de falência beta. A superexpressão de genes como *Ngn3* e *MafA* induziu a expressão de insulina em células acinares em modelos murinos, enquanto a modulação da via *Foxo1* ("*forkhead box O1*") em células intestinais permite a sua conversão em células beta, o que abre novas possibilidades para intervenções regenerativas direcionadas a restaurar a massa de células beta em estados avançados de DM2(Son e Accili, 2023).

Esses estudos ressaltam que a plasticidade celular, embora inicialmente adaptativa, transforma-se em um mecanismo de falência progressiva no contexto do DM2. O entendimento profundo dos fatores moleculares e das vias de sinalização que sustentam essas mudanças celulares oferece uma base para o desenvolvimento de novas terapias, que buscam não só preservar, mas também restaurar a função beta, rompendo com o ciclo disfuncional que caracteriza o DM2.

1.6. Estratégias de Preservação e Reparo das Células beta Pancreáticas no Contexto do Eixo Adipoinsular

A regeneração das células beta pancreáticas em humanos é limitada, o que torna a preservação de sua função e massa essenciais no combate ao DM2. Dada essa limitação, estratégias que reduzem a sobrecarga das células beta e promovem um ambiente metabólico mais equilibrado têm sido centrais nas abordagens terapêuticas e preventivas para preservar a funcionalidade pancreática ao longo do tempo. A modificação do estilo de vida, o controle rigoroso da glicemia e intervenções farmacológicas e cirúrgicas surgem como métodos promissores para diminuir a lipotoxicidade e glicotoxicidade, dois fatores prejudiciais às células beta (Wondmkun, 2020; Son e Accili, 2023).

1.6.1. <u>Redução da Carga Metabólica Através do Estilo de Vida e Controle Glicêmico</u>

Uma das intervenções primárias e preventivas envolve o controle glicêmico intensivo durante as fases iniciais do DM2. Esse controle reduz a exposição das células beta a altos níveis de glicose, minimizando os efeitos glicotóxicos. A restrição da glicotoxicidade e lipotoxicidade evita o acúmulo de ROS e previne o estresse prolongado do retículo endoplasmático, aumentando a longevidade funcional das células beta (Lytrivi *et al.*, 2020b; Wondmkun, 2020).

Além disso, a diminuição da adiposidade visceral através de uma dieta equilibrada e exercícios regulares desempenha papel crucial, já que a gordura visceral

em excesso contribui para um ambiente inflamatório e lipotóxico. Este tipo de tecido adiposo libera citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-α, que agravam a resistência à insulina e dificultam a ação da insulina, exacerbando o DM2. A redução na adiposidade visceral, portanto, impacta diretamente a lipotoxicidade, contribuindo para a preservação da função das células beta (Cuciureanu *et al.*, 2023).

1.6.2. Abordagens terapêuticas para Proteção e Regeneração de Células beta

1. Dieta de Baixa Caloria e Exercício Físico: Em uma dieta com restrição energética significativa há redução de gordura ectópica no pâncreas, promovendo a recuperação da função das células beta. Em combinação com exercícios, essa abordagem pode diminuir a resistência à insulina e potencialmente reverter o DM2 em estágios iniciais. Exercícios regulares também mostram eficácia na redução da gordura pancreática, especialmente em pacientes com pré-diabetes ou DM2, melhorando a função das células beta e reduzindo a carga metabólica (Lytrivi *et al.*, 2020b).

2. Cirurgias Bariátricas: Intervenções como o "bypass" gástrico são eficazes na remissão do DM2 em pacientes obesos, devido à sua capacidade de reduzir drasticamente a gordura pancreática e promover um ambiente metabólico mais favorável. A queda acentuada na lipotoxicidade após o procedimento permite que as células beta recuperem sua capacidade secretora e melhorem a homeostase da glicose. No entanto, embora o efeito benéfico imediato seja evidente, a sustentabilidade a longo prazo desse benefício ainda é investigada (Inaishi e Saisho, 2020b).

3. **Metformina**: Tradicionalmente considerada a primeira linha de tratamento para o DM2, a metformina não apenas aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, mas também exerce efeitos protetores nas células beta sob condições de lipotoxicidade. Ao facilitar a utilização e oxidação da glicose, a metformina previne o comprometimento da secreção de insulina induzido por AGNE e hiperglicemia, reduzindo o estresse do retículo endoplásmático e minimizando sinais pró-apoptóticos, o que prolonga a vida funcional das células beta (Foretz *et al.*, 2014; Lytrivi *et al.*, 2020b).

4. **Agonistas de GLP1:** Agonistas do receptor de GLP1, como exendina-4, liraglutida, semaglutida e tirzepatida demonstram capacidade de promover a GSIS, mesmo em condições de resistência e disfunção. Esses agonistas oferecem uma proteção robusta contra a apoptose e a disfunção lipotóxica das células beta. Além disso, induzem proteínas chaperonas e antiapoptóticas que mantêm a homeostase lisossômica e promovem a autofagia, assegurando que os fatores de transcrição essenciais para a função das células beta, como *Pdx1* e *MafA*, sejam preservados. Essas vias sustentam a capacidade secretora das células beta, garantindo uma resposta mais eficaz às oscilações glicêmicas (Brunton e Wysham, 2020; Lytrivi *et al.*, 2020b).

5. **Tiazolidinedionas (TZDs**): Apesar do uso cauteloso devido aos efeitos adversos em longo prazo, as TZDs, como rosiglitazona e pioglitazona, têm papel protetor contra a glicolipotoxicidade. Esses agentes mantêm a expressão de PPAR-g, prevenindo a desregulação causada por AGNEs e atenuando o estresse oxidativo nas células beta. Eles atuam ao inibir a ativação do fator pró-inflamatório NF-κB e restaurar a função da bomba de cálcio SERCA (*"sarcoplasmic reticulum Ca++-ATPase"*), essencial para o manejo do estresse no retículo endoplasmático. Embora sua eficácia na proteção das células beta seja reconhecida, a aplicabilidade clínica ainda requer estudos adicionais para evitar efeitos colaterais (Gastaldelli *et al.*, 2007; Lytrivi *et al.*, 2020b).

6. Chaperonas Moleculares: Moléculas como o ácido 4-fenilbutírico (PBA) e o derivado de taurina do ácido ursodesoxicólico (TUDCA) estão sendo estudadas por seu potencial em reduzir o estresse do retículo endoplasmático e melhorar a funcionalidade das células beta. Essas chaperonas mitigam o impacto da lipotoxicidade ao promover a GSIS e proteger a integridade celular em condições de alta exposição ao palmitato e outros ácidos graxos saturados (Ozcan *et al.*, 2006; Lytrivi *et al.*, 2020b).

7. **Inibidores da MAP4K4**: Recentemente, inibidores da proteína MAP4K4 emergiram como opções potenciais para reverter a glicolipotoxicidade, promovendo a preservação da função celular ao diminuir a apoptose das células beta. Essa classe de inibidores previne a supressão da secreção de insulina causada por citocinas inflamatórias, como o TNF-α, sustentando a viabilidade das ilhotas pancreáticas. Embora promissora, a aplicação desses inibidores ainda exige maior exploração para determinar seu impacto a longo prazo e segurança clínica (Bouzakri *et al.*, 2009; Lytrivi *et al.*, 2020b).

Uma estratégia emergente envolve a transdiferenciação de células alfa para beta e a rediferenciação de células beta desdiferenciadas, abordagens que podem expandir a população de células produtoras de insulina. Em modelos experimentais, genes como *Pdx1* e *Ngn3* têm sido manipulados para reprogramar células não-beta em células beta funcionais. Ao reativar vias genéticas específicas, como aquelas associadas ao ciclo do retículo endoplasmático e ao equilíbrio redox, essas terapias genéticas buscam não apenas estabilizar a função das células beta remanescentes, mas também expandir o "*pool*" de células com potencial de secreção insulínica (Son e Accili, 2023).

Dada a complexidade do DM2 e os efeitos multifatoriais que afetam a viabilidade das células beta, as estratégias de preservação e regeneração ainda apresentam desafios significativos. Embora o entendimento sobre a plasticidade celular e a capacidade limitada de regeneração seja maior, é essencial desenvolver terapias que atuem diretamente na preservação da identidade e funcionalidade das células beta sob estresse crônico. Intervenções combinadas que associem mudanças no estilo de vida com farmacoterapias personalizadas, ou até abordagens genéticas, poderão oferecer um manejo mais sustentável para o DM2, retardando ou até impedindo a progressão da doença (Gillies *et al.*, 2007; Weir e Bonner-Weir, 2013; Rutter e Hodson, 2015).

O tratamento eficaz do DM2, portanto, requer uma abordagem multifatorial que preserve e recupere a função das células beta e minimize o impacto de condições glicotóxicas e lipotóxicas. Essas estratégias integram-se em um contexto mais amplo de medicina de precisão, onde a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares permite o desenvolvimento de intervenções mais seguras e efetivas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DM2.

1.8. **PPARs (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos)**

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) pertencem à superfamília de receptores nucleares (RNs) e desempenham um papel

central na regulação da expressão gênica em resposta a estímulos extracelulares, com implicações significativas na homeostase energética, na diferenciação celular e na modulação de processos inflamatórios. Os PPARs são moduladores essenciais da atividade metabólica e controlam processos biológicos que vão desde a oxidação de ácidos graxos até a síntese e liberação de insulina nas células beta pancreáticas (Grygiel-Górniak, 2014; Hong *et al.*, 2018).

1.8.1. Estrutura dos PPARS

Os PPARs compartilham uma organização estrutural comum, característica dos receptores nucleares, com cinco domínios funcionais principais:

 Domínio N-terminal (AF-1): Este domínio contém regiões responsáveis pela ativação independente de ligantes e interage com diversos coativadores e correpressores, que modulam a transcrição gênica.

2. Domínio de ligação ao DNA (DBD): Atua no reconhecimento dos elementos responsivos ao PPAR (PPREs) no DNA e possui alta conservação entre os receptores, garantindo a seletividade na regulação de genes específicos.

 Região de dobradiça (Hinge): Conecta o DBD ao domínio de ligação ao ligante e facilita mudanças conformacionais, necessárias para a interação com o DNA e a resposta a ligantes.

4. Domínio de ligação ao ligante (LBD): Esse domínio possibilita a ligação de moléculas lipofílicas, incluindo ácidos graxos e eicosanoides, que induzem uma mudança conformacional no receptor, essencial para a regulação da transcrição. O LBD também abriga o sítio AF-2, que modula a transcrição em resposta a ligantes.

5. Domínio C-terminal: Este domínio está envolvido em interações adicionais com coativadores e outros fatores regulatórios (McKenna e O'Malley, 2002; Laganà *et al.*, 2016).

Apesar das similaridades estruturais, cada isoforma dos PPARs-alfa (a), beta/delta (b/d) e gama (g) – apresenta variações em tamanho e especificidade funcional que impactam diretamente suas atividades biológicas, com efeitos que variam em diferentes tecidos e condições metabólicas, como ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Mecanismo de ativação de PPAR e principais efeitos fisiológicos da ativação das diferentes isoformas



Legenda: Uma vez ativado por ligantes endógenos ou sintéticos que interagem com seu domínio, PPAR se heterodimeriza com o Receptor X Retinóide (RXR) promovendo a dissociação de proteínas corepressoras e o ancoramento de proteínas co-ativadoras. Os PPRE correspondem a repetições de sequências consenso AGGTCA separadas por um nucleotídeo, responsáveis pelo início da transcrição de genes alvo e indução da sinalização de cascatas que medeiam os efeitos fisiológicos do receptor na regulação de processos metabólicos.

Fonte: (FERREIRA, 2018)

1.8.2. Mecanismo de ação dos PPARs

Os PPARs podem modular a transcrição gênica por meio de três mecanismos:

1. Transativação dependente de ligante: Quando ativados por ligantes, os PPARs formam complexos heterodiméricos com o receptor retinoide X (RXR) e se ligam diretamente aos PPREs nos genes-alvo, promovendo a transcrição.

2. Repressão independente de ligante: Na ausência de ligantes, os PPARs podem se ligar ao DNA e recrutar correpressores, mantendo a repressão de genesalvo.

3. Transrepressão dependente de ligante: Neste mecanismo, os PPARs, ao se ligarem a agonistas, podem interferir na atividade de outros fatores de transcrição, como o NF-κB e a proteína ativadora-1 (AP-1), inibindo a expressão de genes próinflamatórios e inflamatórios (Ricote e Glass, 2007; Straus e Glass, 2007). Esses mecanismos adaptativos conferem aos PPARs a capacidade de regular a expressão de genes que afetam diretamente a homeostase de glicose e lipídios, essenciais para o funcionamento de tecidos metabólicos e para a proteção contra disfunções inflamatórias.

1.8.3. Subtipos de PPARs e Suas Funções

Os três subtipos de PPARa, PPARb/d (designado como PPARb nesse trabalho) e PPARg exercem funções específicas em diversos tecidos, regulando aspectos distintos do metabolismo energético e da homeostase. No pâncreas, cada um desses subtipos possui atividades particulares que impactam diretamente a função das células beta, sendo cruciais para a proteção contra disfunções metabólicas.

PPARa: Regulação da Oxidação de Ácidos Graxos

O PPARa é predominantemente expresso em tecidos com alta taxa de oxidação de ácidos graxos, como fígado, músculo e pâncreas. Este receptor nuclear desempenha papel crucial na regulação da homeostase lipídica, promovendo a β-oxidação de ácidos graxos e limitando a lipotoxicidade nas células beta. No pâncreas, a ativação de PPARa contribui para a diminuição da acumulação de AGNEs, protegendo as células beta contra o estresse lipotóxico. Além disso, ao aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, o PPARa atua na redução de ROS, fundamentais para a preservação da integridade funcional e estrutural das células beta (Lefebvre *et al.*, 2006; Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

PPARb: Sensibilização à Insulina e Homeostase Energética

O PPARb é menos estudado, mas sua expressão é ampla e suas funções são importantes para o metabolismo energético e para a proliferação e sobrevivência celular. Esse receptor atua no catabolismo de ácidos graxos e promove a oxidação lipídica, reduzindo a sobrecarga lipídica no fígado e no pâncreas, e favorecendo a termogênese adaptativa. Em modelos de resistência à insulina, o PPARb mostrou potencial em melhorar a captação de glicose, favorecendo a sensibilidade à insulina e reduzindo a carga sobre as células beta pancreáticas. No pâncreas, a ativação desse receptor pode ajudar a restaurar a função gliconeogênica, promovendo um equilíbrio metabólico benéfico para as células beta e preservando a sua viabilidade em situações de estresse crônico (Jain *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2000; Michalik e Wahli, 2006).

PPARg: Adipogênese e Sensibilização à Insulina

O PPARg é predominante nos tecidos adiposos e está fortemente associado ao metabolismo lipídico e à regulação da sensibilidade à insulina. No pâncreas, a ativação de PPARg promove a secreção de adiponectina, uma adipocina que melhora a captação de glicose e reduz a resistência à insulina, promovendo um ambiente menos inflamatório e menos lipotóxico. Esse receptor também favorece a diferenciação de adipócitos, o que desvia a carga lipídica de órgãos periféricos e do pâncreas, aliviando o estresse sobre as células beta. Em modelos de DM2, a ativação de PPARg demonstrou efeitos anti-inflamatórios e a preservação das funções secretoras das células beta, sendo amplamente utilizado em terapias para melhora da sensibilidade insulínica e controle da glicemia (Rieusset *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004; Ye, 2008).

1.8.4. Agonistas PPARs como Agentes Terapêuticos

Dada a relevância dos PPARs para a regulação do metabolismo de lipídios e glicose, agonistas seletivos têm sido explorados como tratamentos para disfunções metabólicas, incluindo DM2. Diferentes classes de ligantes naturais e sintéticos demonstram ativação seletiva dos PPARs, com respostas que variam conforme o receptor-alvo:

1. **Agonistas PPARa (fibratos):** Ligantes sintéticos como o fenofibrato e o benzafibrato são amplamente utilizados no manejo de dislipidemias e diabetes, sendo

considerados seguros para terapia combinada com estatinas, outra classe comum de medicamentos para essas patologias. Esses fármacos têm demonstrado eficácia, especialmente em pacientes com dislipidemia aterogênica significativa (Wierzbicki, 2010).

Os fibratos são amplamente empregados na prática clínica global para o tratamento rotineiro de hiperlipidemias, devido à sua capacidade de reduzir as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TAG) e aumentar os níveis de HDL. Esses efeitos ocorrem principalmente pela indução de Apo-AI, Apo-AII e Apo-AV (Han *et al.*, 2017). Além disso, seu uso mostrou eficácia no manejo de retinopatia diabética (Kataoka *et al.*, 2023), oferecendo benefícios microvasculares e macrovasculares significativos, especialmente em pacientes com diabetes mellitus, síndrome metabólica e doença renal (Anabtawi *et al.*, 2017; Malur *et al.*, 2017).

Em pessoas com dislipidemia aterogênica, o uso de fibratos está associado a melhorias clínicas importantes, como a redução da progressão da aterosclerose, diminuição de eventos cardiovasculares e melhorias nas complicações diabéticas microvasculares. Adicionalmente, esses medicamentos apresentam outros benefícios clínicos e bioquímicos, incluindo o aumento da sensibilidade à insulina (Okopień *et al.*, 2018).

Apesar da sua eficácia, os fibratos estão associados a uma taxa de eventos adversos que podem levar a complicações ou mesmo à descontinuação do tratamento. 2-15% da população tratada com fibratos relatam efeitos indesejáveis durante o tratamento, levando a necessidade de interrupção do uso (Okopień *et al.*, 2018).

2. Agonistas PPARg (TZDs): As tiazolidinedionas (TZDs), uma classe de medicamentos antidiabéticos, atuam como sensibilizadoras de insulina, aumentando a eliminação de glicose dependente de insulina, reduzindo a produção hepática de glicose (Mirza *et al.*, 2019) e exercendo efeitos pleiotrópicos na redução dos fatores de risco vascular e aterosclerose. Esses efeitos contribuem para a preservação da viabilidade das células beta, mediada pela ativação do PPAR-g, gene crucial na adipogênese (Della-Morte *et al.*, 2014; Nanjan *et al.*, 2018).

Desde a descoberta das TZDs (Gale, 2001) diversos fármacos como troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona e balaglitazona foram desenvolvidos e aprovados para o tratamento da DM2. No entanto, muitos desses medicamentos foram retirados do mercado poucos anos após sua introdução devido à associação com efeitos adversos. (Della-Morte *et al.*, 2014). A rosiglitazona, por exemplo, inicialmente se destacou positivamente, mas em em 2001 surgiram relatos da sua associação com insuficiência cardíaca devido à retenção hídrica. Em 2007, após confirmação desses riscos, seu uso foi suspenso na Europa e, nos Estados Unidos, passou a ser indicado sob diversas restrições (Nissen e Wolski, 2010). Uma revisão sistemática e meta-análise de estudos observacionais relatou que, entre pacientes com diabetes do tipo 2, o uso de rosiglitazona está associado a um risco significativamente maior de insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e morte, em comparação com a pioglitazona (Loke *et al.*, 2011). Por outro lado, a pioglitazona destacou-se por seus efeitos cardioprotetores (Nanjan *et al.*, 2018), sua ação contra a lipotoxicidade e a inflamação crônica no pâncreas, além de preservar fatores de transcrição essenciais para as células beta e promover a captação de glicose (Michalik e Wahli, 2006; Ahmadian *et al.*, 2013).

Diretrizes atuais da Associação Americana de Endocrinologia Clínica recomendam a pioglitazona como primeira linha de tratamento para pacientes com DM2 e DHGM, considerando-a de "forte nível de evidência científica" (Cusi *et al.*, 2022). De forma semelhante, a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes sugere a pioglitazona como primeira escolha no manejo da DHGM em pessoas com DM2 associada a esteatose, esteatohepatite e/ou fibrose (Silva Júnior WS, (2024).) Apesar de suas vantagens, o uso de TZD é limitado devido a preocupações com questões de segurança e efeitos colaterais comuns dessa classe de medicamentos. Os efeitos adversos incluem retenção de sódio, edema periférico, ganho de peso, insuficiência cardíaca, fraturas ósseas e diminuição da glicosúria (de-Lima-Júnior *et al.*, 2019; Lebovitz, 2019).

Como alternativa, o uso de baixa dosagem da pioglitazona começou a ser considerado como estratégia para minimizar os efeitos adversos. Em estudos com ratos administrados com pioglitazona (3mg/kg) por 4 semanas, observou-se melhorar no perfil metabólico lipídico, maior resposta à insulina e redução de marcadores inflamatórios hepáticos, sem impacto na massa corporal (Collino *et al.*, 2010). Terapias com doses mais baixas de pioglitazona demonstram benefícios comparáveis aos de doses mais altas no metabolismo da glicose, dos lipídios, no manejo do fígado gorduroso, na resistência à insulina e nos níveis de adiponectina (Yanai e Adachi, 2017; Vasques-Monteiro *et al.*, 2024a). No entanto, ainda são necessários mais

estudos para avaliar o impacto metabólico de doses reduzidas de pioglitazona de forma abrangente.

3. Agonistas Duplos PPARa/g (glitazares): A classe de agonistas duplos PPAR, conhecida como "Glitazares", tem como objetivo melhorar simultaneamente o perfil lipídico e a sensibilidade à insulina, sendo uma alternativa promissora para pacientes com hiperglicemia e hiperlipidemia. Esses medicamentos apresentam menor risco de eventos adversos em comparação aos agonistas completos. Diversos Glitazares, como muraglitazar, tesaglitazar e aleglitazar, avançaram para ensaios clínicos de fase tardia. No entanto, esses estudos foram suspensos devido à ocorrência de efeitos adversos significativos, incluindo insuficiência cardíaca, insuficiência renal, ganho de peso e edema (Cheng *et al.*, 2019). A maioria desses efeitos foi atribuída à ativação suprafisiológica do receptor PPAR-g, resultante de sua alta potência de ativação em alguns tecidos e órgãos.

Com base nisso, novos agonistas duplos com ativação parcial do PPARg vêm desenvolvidos minimizar sendo para complicações. essas Um exemplo notável é o saroglitazar, um agonista duplo do PPAR-a/g com atividade predominante do PPAR-a, que tem se mostrado promissor no tratamento da dislipidemia diabética. Este composto demonstrou benefícios clínicos na redução da resistência insulínica, no manejo da esteatose hepática e na mitigação da sobrecarga metabólica das células beta pancreáticas (Berger et al., 2005; Sahebkar et al., 2014). O saroglitazar é o primeiro Glitazar aprovado comercialmente, embora sua liberação esteja restrita, por enquanto, à Índia, para o tratamento da DM2 e hiperlipidemia (Cheng et al., 2019). Ensaios cínicos de fase inicial em pacientes com DHGM monstraram eficácia na melhoria da esteatose hepática e de desfechos histológicos relacionados (Gawrieh et al., 2021), além de impacto positivo nos lipídios e lipoproteínas séricas desses pacientes (Siddiqui et al., 2023). Estudos in vitro também indicam que o saroglitazar apresenta efeitos superiores na regressão da NASH em comparação ao fenofibrato (agonista PPAR-a) e à pioglitazona (agonista PPAR-g) isolados (Jain et al., 2018).

Até o momento, não foram relatados efeitos adversos importantes associados ao saroglitazar, embora estudos adicionais sobre sua segurança a longo prazo sejam necessários. Esse contexto reforça o potencial dos agonistas duplos PPAR como uma estratégia promissora, ao combinar a ativação de duas isoformas que atuam

amplamente no metabolismo corporal. A possibilidade de ativação parcial de um ou ambos os receptores oferecem uma abordagem inovadora para reduzir efeitos adversos em comparação com a ativação total ou isolada.

4. Agonistas Naturais de PPAR: Compostos naturais, como catequinas de chá verde e extrato de gengibre, têm mostrado efeitos positivos na modulação dos PPARs com menos efeitos colaterais. Embora sejam agonistas de baixa potência, seu uso prolongado pode reduzir a inflamação e melhorar a sensibilidade à insulina, preservando a função das células beta (Manio et al., 2018; Lukitasari et al., 2020; López-Salazar et al., 2021; Marinovic et al., 2022). Há também trabalho que mostra que o tipo de gordura da dieta influencia na ativação dos PPARs, afirmando que o consumo de óleo de coco, uma fonte de gordura saturada, promoveu redução da βoxidação hepática, aumento de LPS plasmático e baixa sensibilidade insulínica, tendo PPARα efeitos na redução da ativação do (Manio al., 2018). et Por outro lado, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados ativa a expressão de PPARα hepático, resultando no aumento da β-oxidação e mitigação da esteatose hepática, além da redução de lipopolissacarídeos e melhora na sensibilidade à insulina (López-Salazar et al., 2021). Um estudo in vitro que usou o ácido oleico, presente no azeite de oliva, resultou na melhora da produção de insulina, além de efeito inibitório do TNF-α e aumento na translocação de PPARγ para o núcleo (Vassiliou *et al.*, 2009).

A ativação seletiva dos PPARs surge como uma estratégia terapêutica promissora, especialmente no contexto da preservação pancreática em DM2. Ao regular a homeostase lipídica e glicêmica, os PPARs contribuem para um ambiente menos tóxico e menos inflamatório no pâncreas, promovendo a viabilidade das células beta e prevenindo o avanço da disfunção metabólica. Agonistas seletivos e fontes naturais de PPARs mostram-se benéficos, com menor perfil de efeitos colaterais, proporcionando alternativas inovadoras e promissoras para o tratamento e o manejo de longo prazo do DM2, com impacto direto na preservação do pâncreas e no controle glicêmico.

1.9 Modelo experimental de obesidade

Os modelos animais desempenham um papel crucial no estudo da patogênese e no desenvolvimento de intervenções terapêuticas para doenças metabólicas, proporcionando insights que dificilmente seriam obtidos apenas com modelos celulares ou ensaios clínicos em humanos. Para que esses modelos sejam cientificamente relevantes e éticos, é essencial que eles não só apresentem fenótipo semelhante, mas também repliquem aspectos-chave da patogênese da doença humana em questão, o que garante que os achados sejam robustos e translacionais (Buettner *et al.*, 2007).

Entre os modelos de obesidade amplamente utilizados, destacam-se os camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos a uma dieta hiperenergética ou rica em gordura, conhecida como dieta de obesidade induzida (DIO, do inglês, "*diet-induced obesity*"). Esse modelo reproduz com alta fidelidade os efeitos de dietas ocidentais ricas em gorduras, levando ao desenvolvimento de características fisiopatológicas associadas à síndrome metabólica, como obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão – condições diretamente comparáveis às observadas em humanos (Surwit *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 2004; Siersbæk *et al.*, 2020). A similaridade fenotípica e patogenética torna os camundongos C57BL/6 expostos à DIO um excelente modelo experimental para o estudo de doenças metabólicas complexas.

Quando alimentados com uma dieta hiperlipídica, esses camundongos desenvolvem obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose e hipertensão – parâmetros que refletem diretamente a progressão clínica da síndrome metabólica em humanos. Embora alguns estudos sugiram que o ganho de peso nesses animais possa estar associado a um comportamento hiperfágico e níveis reduzidos de atividade física, o principal fator subjacente é sua alta eficiência alimentar, que leva a uma rápida deposição de gordura central. Notavelmente, essa adiposidade central desenvolvida em resposta à DIO é acompanhada por alterações metabólicas precoces, como hiperglicemia em apenas quatro semanas de dieta rica em gordura, além de uma progressão acelerada para um estado de inflamação e resistência à insulina. Com 16 semanas de DIO, esses animais apresentam um remodelamento completo do tecido adiposo branco (TAB), incluindo hiperplasia e hipertrofia dos

adipócitos, aumento da apoptose celular e subsequente inflamação, fatores que exacerbam a resistência à insulina (Collins *et al.*, 2004; Strissel *et al.*, 2007).

Além das mudanças no TAB, os camundongos C57BL/6 obesos expostos à DIO desenvolvem uma adaptação compensatória à resistência à insulina através do aumento da secreção de insulina – um mecanismo semelhante ao observado em humanos em estados de resistência inicial à insulina, que posteriormente evolui para exaustão das células beta e disfunção pancreática. Esse aumento compensatório, no entanto, é limitado e, com o acúmulo ectópico de gordura em órgãos como o fígado e o próprio pâncreas, a glicolipotoxicidade se torna evidente, com o aumento dos níveis de glicose no sangue e disfunção metabólica progressiva (Mota *et al.*, 2016; Veiga *et al.*, 2017). A lipotoxicidade, que é central na patogênese do DM2, prejudica a função das células beta e agrava a resistência à insulina nos tecidos periféricos, contribuindo para um ciclo vicioso de inflamação e disfunção metabólica.

O modelo DIO com camundongos C57BL/6 também é particularmente relevante para estudos sobre a função e preservação das células beta pancreáticas, tema central deste trabalho. Ao desenvolver resistência à insulina e uma resposta compensatória na secreção de insulina, esses camundongos mimetizam a resposta inicial do pâncreas em humanos ao balanço energético positivo prolongado e ao ambiente de lipotoxicidade. A sobrecarga lipídica e glicêmica não só leva à hipertrofia do TAB, como também ao comprometimento da função pancreática, revelando-se um modelo valioso para investigar a plasticidade das células beta, os mecanismos adaptativos e os efeitos terapêuticos de diferentes intervenções no pâncreas.

Dessa forma, o uso de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas hiperlipídicas constitui uma plataforma robusta e relevante para a investigação das alterações fisiopatológicas associadas à obesidade e ao DM2, apesar de suas limitações ao extrapolar os resultados para humanos. Esse modelo fornece uma base confiável para explorar o impacto das intervenções terapêuticas em um ambiente metabólico disfuncional, permitindo avaliar o potencial de estratégias de preservação e regeneração de células beta, além de mecanismos moleculares ligados ao eixo adipoinsular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do agonismo duplo PPARa/g no remodelamento, plasticidade e preservação das ilhotas pancreáticas em camundongos alimentados com excesso de gordura saturada na dieta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da dieta rica em gordura saturada e dos agonistas PPARa (WY14643) e PPARg (pioglitazona), isolados ou em associação sobre:

- Massa corporal, comportamento alimentar, tolerância oral à glicose e concentração plasmática de insulina, leptina e adiponectina;
- Remodelação e estereologia do pâncreas endócrino;
- Expressão gênica de marcadores relacionados à função, identidade, apoptose e plasticidade das células beta;

2 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA, UERJ 020/2022) e conduzido sob o guia convencional para experimentação animal (publicação NIH n.º 85-23, revisada em 1996).

3.1. Desenho experimental

Cinquenta camundongos C57BL/6 machos de três meses de idade foram alojados sob condicões controladas de temperatura (21±2°C qq), umidade (60±10%) e luz (ciclos claro-escuro de 12/12 h), com livre acesso a água e comida, em racks ventilados com gaiolas microisoladoras (NexGen Mouse 500, Allentown, PA, EUA). Os camundongos foram inicialmente divididos aleatoriamente em dois grupos nutricionalmente diferentes por dez semanas: grupo controle (C), que recebeu dieta AIN-93M (76% de energia sob a forma de carboidratos, 14% de proteína e 10% de lipídios, ou seja, óleo de soja, n=10), ou grupo dieta hiperlipídica (HF, do inglês "high-fat"), que recebeu uma dieta HF modificada a partir da AIN-93M (50% de energia sob a forma de lipídios (10% de óleo de soja e 40% de banha de porco), 14% de proteína e 36% de carboidratos, n=40), como ilustrado na Figura 7.

Posteriormente, os animais nos grupos C e HF foram aleatoriamente designados para os seguintes grupos para um tratamento de 4 semanas (n=10 por grupo):

a) C: continuou a receber a dieta AIN-93M;

b) HF: continuou a receber a dieta HF;

c) HF-a: recebeu a dieta HF acrescida do agonista PPAR-a WY-14643 (3,5 mg/kg de massa corporal, Sigma/Merck, Darmstadt, Alemanha);

 d) HF-g: recebeu a dieta HF acrescida do agonista PPAR-g pioglitazona (4,5 mg/kg de massa corporal, Sigma/Merck, Darmstadt, Alemanha) e) HF-d: recebeu a dieta HF acrescida do tratamento duplo (PPAR-a/g) com WY-14643 + pioglitazona nas mesmas doses das monoterapias.

Inicialmente, este estudo foi conduzido com oito grupos experimentais, incluindo os grupos alimentados com dieta controle e tratados com monoterapias ou terapia combinada, com o objetivo de avaliar a possível toxicidade das doses empregadas. No entanto, não foram observados efeitos adversos nem benefícios nesses animais. Por isso, o trabalho foi direcionado para os cinco grupos principais: Controle, HF e HF tratados.

O tratamento utilizado seguiu estudos prévios quanto à via de administração e às doses de WY-14643 e pioglitazona (Miranda *et al.*, 2020; Vasques-Monteiro *et al.*, 2024b). As dietas experimentais foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil) seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) (Reeves *et al.*, 1993).





Legenda: Esquema representativo dos grupos experimentais. Abreviações: Controle (C); *High fat* (HF); *Hight fat* tratado com WY-14643 (HFa); *Hight fat* tratado com pioglitazona (HFg); *Hight fat* tratado com WY-14643 + pioglitazona (HFd). Fonte: A autora, 2025.

É importante ressaltar que o conteúdo de vitaminas e minerais de ambas as dietas eram idênticos e estavam de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, sendo ministrada a dieta AIN 93M (Reeves *et al.*, 1993) para o período de manutenção dos animais a partir dos três meses de idade. A composição detalhada das dietas experimentais encontra-se na Tabela 1.

Nutriontoo	Dietas	
Nutrentes	Controle	HF
Caseína (g)	140,0	175,0
Amido de milho (g)	620,7	347,7
Sacarose (g)	100,0	100,0
Banha de porco (g)		238,0
Óleo de soja (g)	40,0	40,0
Fibra (g)	50,0	50,0
Mix de vitaminas (g)	10,0	10,0
Mix de minerais (g)	35,0	35,0
Cistina (g)	1,8	1,8
Colina (g)	2,5	2,5
Antioxidante (g)	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	5000
Carboidrato (%,	76	36
energia)	10	
Proteína (%,	14	14
energia)	17	
Lipídios (%, energia)	10	50

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas experimentais (por kg)

Fonte: (Reeves et al., 1993).

3.2. Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal

O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). O cálculo da ingestão energética foi feito através da multiplicação da ingestão alimentar pela energia ofertada por cada grama de dieta (em KJ). A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente em balança digital (precisão 0,01g).

3.3. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Uma semana antes da eutanásia foi realizado o TOTG. Após jejum alimentar de seis horas, foi administrada solução glicosada (25%), via gavagem orogástrica, na

dose de 2g de glicose por kg de massa corporal de cada animal. Foram aferidas as glicemias no tempo 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga através de glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil), em amostras de sangue coletadas da veia caudal.

3.4. Isolamento das ilhotas pancreáticas

Camundongos heparinizados foram mantidos em jejum por seis horas e profundamente anestesiados em uma câmara de gás de CO₂. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e o plasma foi obtido após centrifugação (712 xg por 15 minutos) e armazenado em um freezer de -80°C. O pâncreas foi dissecado, pesado e fixado em formalina de Milonig (10% tamponada, pH 7,2-7,4, para análise histológica) ou congelado a -80°C (para análise molecular).

Ilhotas pancreáticas viáveis foram isoladas por canulação do ducto biliar e insuflação do pâncreas através do ducto pancreático com 5 mL de solução de Hanks (suplementada com albumina sérica bovina (BSA) 1,0 mg/mL) contendo 0,8 mg/mL de colagenase tipo V (C9263, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), seguida de digestão do tecido exócrino conforme detalhado na Figura 8 extraída da publicação realizada como parte desse projeto (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2024).

Figura 8 – Canulação do pâncreas



Legenda: Representação dos passos para canular o pâncreas do camundongo com a solução de colagenase. Certifique-se de expor a cavidade abdominal para acessar facilmente o pâncreas (a). Ao identificar o ducto (b), posicione a agulha e garanta que não haja bolhas (c), utilizando o baço como referência para assegurar que todo o pâncreas será inflado (d–f). Após isso, recomendamos remover o pâncreas junto com o baço, que pode ser descartado posteriormente (g–i). Fonte: (Fernandes-da-Silva *et al.*, 2024)

3.5. Análises bioquímicas, FIRI e Homa-beta

As concentrações plasmáticas de insulina (#EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA), leptina (#EZRMI-13K, Millipore), adiponectina (#EZMADP-60K, Millipore), GLP-1 (#EZGLP1T-36K, Millipore) e GIP (#EZRMGIP-55K, Millipore) foram determinadas usando o equipamento Fluostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Otenberg, Alemanha). Dados de glicemia de jejum e insulina foram usados para calcular o índice de resistência à insulina em jejum (FIRi) por meio da seguinte fórmula: insulina em jejum (μ /L) × glicemia de jejum (mmol/L)/25 (Duncan, et al. 1995). O índice Homabeta, um marcador da secreção basal de insulina pelas células beta pancreáticas, foi calculado por meio da seguinte fórmula: 20 × nível de insulina em jejum ((mIU/L)/glicemia de jejum (mmol/L) - 3,5 (Matthews *et al.*, 1985).

3.6. Imunohistoquímica

As seções pancreáticas foram desparafinadas seguindo o protocolo de imunohistoquímica. As seções foram submetidas à recuperação de antígeno (solução de recuperação de epítopo a 60 °C por 15 min), bloqueio de peroxidase e bloqueio de proteína não específica. As amostras foram então incubadas com anticorpos primários anti-insulina (PAA448MU01, Cusabio, Houston, TX, EUA, diluição 1:100), antiglucagon (CSBPA002654, Cusabio; 1:100), anti-PAX4 (CSBPA017490ESR1, Cusabio; 1:100), anti-ARX (CSB-PA850418LA01HU, Cusabio, 1:100) ou anti-KI-67 (NBP222112, Novus; 1:100) por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as seções foram incubadas com Prime Powder (Leica Biosystems) por 30 minutos, seguido por incubação com Novolink Polymer (Leica Biosystems) por 30 minutos. As reações foram reveladas com exposição ao tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 4 minutos (insulina e glucagon), 3 minutos e 20 segundos para KI-67 e 5 minutos para PAX4 e ARX. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.7. Estereologia

Para a estereologia do pâncreas, uma lâmina foi imunocorada para insulina, e a lâmina subsequente foi corada para glucagon; o processo foi repetido a cada 19 cortes, cobrindo todo o pâncreas. Imagens histológicas aleatórias (câmera LC Evolution, microscópio Olympus BX51) foram usadas para determinar a massa das ilhotas (M [ilhota]) multiplicando a densidade de volume das ilhotas pela massa do pâncreas. Para massas de células alfa e beta, a imunodensidade (% de imunomarcação para glucagon ou insulina) foi calculada por meio da ferramenta de limite no software Image-Pro Plus (versão 7.1 para Windows, Media Cybernetics, Maryland, EUA) e multiplicada pela massa das ilhotas, conforme detalhado anteriormente (Marinho *et al.*, 2019) (Souza-Mello *et al.*, 2011).

3.8. **RT- qPCR**

O RNA total de ilhotas isoladas foi extraído usando reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA), e a concentração de RNA foi determinada usando equipamento Nanovue (GE Life Sciences). O cDNA foi sintetizado usando primers Oligo (dT) para mRNA e transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). A PCR em tempo real foi realizada usando um termociclador Bio-Rad CFX96 e SYBR Green mix (Invitrogen, CA, EUA). Os primers foram gerados usando o software online Primer3. O *Tbp* foi usado como um controle endógeno. As condições da reação de amplificação dependeram do gene amplificado. As sequências de primers forward e reverse são detalhadas na Tabela 2.

Primers	Forward	Reverse
Bax	TGTTTGCTGATGGCAACTTC	GATCAGCTCGGGCACTTTAG
Bcl2	ATAACCGGGAGATCGTGATG	CAGGCTGGAAGGAGAAGATG
Fgf21	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	TGTTCCATCCTCCCTGATCT
Glp1r	CACTTTCTTCTCCGCCTTG	GGATGCAAACAGGTTCAGGT
Glut2	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCA	GCACTTCTCGCTCTCCAGAA
Mafa	TTCTCGCTCTCCAGAATGTG	TTCAGCAAGGAGGAGGTCAT
Neurod1	CTTGACCCCTTTGCTGGTAG	GCTAGAAAGGCCACACCAAG
Neurog3	GTGTCCCCAGAGACACAACA	GGTATGAGAGTGGGGCTAGG
Nkx6.1	GCAGGACCAAGTGGAGAAAG	GTCAGAGTTCGGGTCCAGAG
Pax4	ACCTCATCCCAGGCCTATCT	AGGCCTCTTATGGCCAGTTT
Pdx1	AACAAGAGGACCCGTACTGC	TTCAACATCACTGCCAGCTC
Ppara	AATGCAATTCGCTTTGGAAG	GGCCTTGACCTTGTTCATGT
Pparg	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
Тbp	CAAACTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCCAGAGC

Tabela 2 – Detalhamento dos primers utilizados

Abreviações: Bax, Proteína associada ao BCL2 X; Bcl2, Regulador da apoptose BCL2; Fgf21, Fator de crescimento de fibroblastos 21; Glp1r, Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1; Glut2, Transportador de glicose 2; Mafa, Fator de transcrição da família oncogênica musculoaponeurótica fibrossarcoma A; Neurod1, Diferenciação neuronal 1; Neurog3, Neurogenina-3; Nkx6.1, Homeobox NK6.1; Pax4, Caixa emparelhada 4; Pdx1, Homeobox pancreático e duodenal 1; Ppara, Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; Pparg, Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; Tbp, Proteína de ligação à TATA box. Fonte: A autora, 2025.

3.9. Análise Estatística

Os testes post hoc Brown–Forsythe e Welch ANOVA e Dunnett T3 foram usados para testar as diferenças entre os grupos. Um índice de significância de P<0,05 foi adotado.

Os dados de qPCR foram analisados por meio de uma matriz de correlação e análise de componentes principais (PCA). Um teste multivariado fornece uma comparação mais confiável entre os tratamentos do que vários testes univariados porque considera a correlação das variáveis (Reis-Barbosa e Mandarim-de-Lacerda, 2024). Usamos os componentes com autovalores ≥1,0, representando a variação compartilhada na população (de acordo com a abordagem Kaiser–Guttman). Uma vez que os componentes mais influentes que afetam a variação dos dados (PC1 e PC2) foram confirmados, plotamos os escores de PC em um gráfico usando os eixos PC1 e PC2, separando os grupos (GraphPad Prism versão 10.2.3 para Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Comportamento alimentar, Massa corporal

Os grupos C e HF iniciaram o experimento (semana 0) sem diferença nas massas corporais. Após uma semana de ingestão de dieta hiperlipídica, o grupo HF apresentou aumento da MC quando comparado ao grupo C (+4 %, Figura 9A). Este aumento perdurou ao longo de todo experimento até o início do tratamento (+18 %, Figura 9A), que começou a mostrar diferenças entre os grupos na primeira semana de administração. A partir de então, e seguindo até o final do experimento, os grupos HF tratados tiveram redução significativa da massa corporal em relação a sua contraparte não tratada (HF-a: -5%; HF-g: -13%; e HF-d: -16% vs. HF, Figura 9A). No que se refere à massa do pâncreas, os animais HF apresentaram um aumento nesse dado quando comparado ao controle (+22% vs. C, Fig. 9B), e o tratamento com as monoterapias combinadas foi capaz de reduzi-la em relação a sua contraparte (-16% HF-d vs. HF, Figura 9B).

A ingestão alimentar em gramatura não apresentou diferença estatística entre os grupos, descartando a necessidade de grupos "*pair-feeding*". Convertendo a gramatura ingerida para a energia que as dietas fornecem, com base em sua densidade energética, foi visto que o grupo HF teve uma ingestão energética maior que o grupo C (+31% vs. C, Figura 9C), não havendo diferença entre os grupos tratados e suas contrapartes (Figura 9C).





Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP (n = 10 para massa corporal e n = 5 para os parâmetros restantes). As diferenças foram testadas com Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA e pós-teste Dunnett T3 e são marcadas da seguinte forma: a \neq C, b \neq HF para massa corporal, **P < 0,01 e ***P < 0,001 para os demais parâmetros. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g.

Fonte: A autora, 2025.

4.2. Metabolismo de carboidratos

A análise da área sob a curva (ASC) do TOTG revelou que a dieta HF promoveu intolerância oral à glicose nos animais por um aumento significativo na ASC (+52% vs. C, Figuras 9D e 9E). Os tratamentos atenuaram a intolerância oral à glicose,

apresentando um valor menor da ASC em relação ao grupo HF (HF-a: -13%; HF-g: -16%; HF-d: -18% vs. HF).

O TOTG revelou intolerância oral à glicose por meio de uma ASC aumentada no grupo HF (+52% vs. C, Figuras. 9D e 9E). Em contraste, os tratamentos atenuaram a intolerância oral à glicose, diminuindo a AUC (HF-a: -13%; HF-g: -16%; HF-d: -18% vs. HF). Ademais, o grupo HF apresentou hiperglicemia (+23% vs. C, Fig. 10A) e hiperinsulinemia (+247% vs. C, Figura 10B). Apenas o grupo HF-g reverteu a hiperglicemia (-14% vs. HF), enquanto todos os tratamentos reduziram a concentração plasmática de insulina (HF-a: -66%, HF-g: -42% e HF-d: -59% vs. HF).

Figura 10 – Concentrações de glicemia em jejum (A), insulina plasmática (B), leptina plasmática (C), adiponectina plasmática (D), GLP-1 plasmático (E), GIP plasmático (F), teste de resistência à insulina em jejum (G) e índice HOMA-beta (H).



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP (n=5 para cada grupo). As diferenças foram testadas com Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA e pós-teste Dunnett T3 e são marcadas da seguinte forma: a \neq C, b \neq HF para massa corporal, *P<0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a em gordura tratado com agonista PPAR-a + agonista PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.

O grupo HF apresentou hiperleptinemia (+59% vs. C, Figura 10C), enquanto todos os tratamentos atenuaram as concentrações de leptina (HF-a: -73%, HF-g: -70% e HF-d: -58% vs. HF). Por outro lado, a adiponectina plasmática foi reduzida no grupo HF (-61% vs. C, Figura 10D) e aumentada nos grupos tratados (HF-a: +90%; HF-g: +215%; HF-d: +192% vs. HF). As concentrações de GLP1 não mudaram devido à dieta ou aos tratamentos (Figura 10E), mas o GIP foi reduzido no grupo HF (-61% vs. C, Fig. 10F) e aumentado no grupo HF-d (+40% vs. HF).

4.3. Histologia e estereologia do pâncreas

O grupo HF apresentou aumento da massa de ilhotas (+629% vs. C, Figura 11B), corroborando a resistência à insulina através do aumento dos valores de FIRi (+329% vs. C, Figura 10H) e hipersecreção de ilhotas através do aumento dos valores de HOMA-B (+238% vs. C, Figura 10I). As fotomicrografias revelaram ilhotas de tamanho padrão no grupo C e hipertrofiadas no grupo HF, confirmando os achados bioquímicos (Figura 11A). Em contraste, os grupos tratados tinham ilhotas equivalentes em tamanho às do grupo C (Figura 11A).

A massa de ilhotas foi reduzida nos grupos HF-g (-38% vs. grupo HF) e HF-d (-41% vs. grupo HF, Figura 11B). Todos os tratamentos atenuaram a resistência à insulina, conforme indicado por um FIRi reduzido (HF-a: -68%, HF-g: -50% e HF-d: -61% vs. HF, Figura 10G), e restauraram a secreção de insulina, conforme indicado por um HOMA-B reduzido (HF-a: -68%, HF-g: -35% e HF-d: -64% vs. HF, Figura 10H).

A hipertrofia das ilhotas no grupo HF foi acompanhada por aumento das massas de células beta (+986% vs. C, Figura 11C) e de células alfa (+682% vs. C, Figura 11D). Todos os tratamentos reduziram a massa de células beta (HF-a: -53%, HF-g: -54% e HF-d: -59% vs. HF), enquanto a massa de células alfa foi reduzida apenas nos grupos HF-g (-52% vs. HF) e HF-d (-52% vs. HF). A proporção de células alfa para beta foi reduzida no grupo HF (-37% vs. C), mas foi restaurada no grupo HF-a (+35% vs. HF, Figura 11E).

Figura 11 – Seções pancreáticas coradas com hematoxilina e eosina (A), massa das ilhotas (B) massa de células beta (C), massa de células alfa (D) e razão de células alfa para beta (E).



Legenda: Comparado com o grupo C, a histologia do pâncreas no grupo HF revelou hipertrofia compensatória das ilhotas. Os grupos tratados HF-a e HF-g apresentaram ilhotas menores do que aquelas no grupo HF. Em contraste, o grupo HF-d apresentou ilhotas comparáveis em tamanho às do grupo C (barra de escala = 50 µm). Os dados são apresentados como média \pm DP (n=5 para cada grupo). As diferenças foram testadas com Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA e pós-teste Dunnett T3 e são marcadas da seguinte forma: a \neq C, b \neq HF para massa corporal, *P<0.05, **P < 0,01 e ***P < 0,001. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g. (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.

4.4. RT-qPCR

Metabolismo energético e homeostase: *Ppara* e *Pparg* foram abordados como alvos dos tratamentos propostos. A dieta HF reduziu a expressão de *Ppara* nas ilhotas (-100% vs. C, Figura 12A). Os grupos tratados com o agonista PPAR-a (monoterapia ou em combinação) apresentaram aumento da expressão do *Ppara* (HF-a: +11.070% e HF-g: +7.700% vs. HF). Da mesma forma, a pioglitazona aumentou o *Pparg* (HF-g: +2.881% e HF-d: +10.096% vs. HF, Fig. 12B). Com relação à função das células beta, o *Fgf21*, um marcador de sensibilidade à insulina aumentada, foi

regulado positivamente pelos tratamentos (HF-a: +3.400%, HF-g: +13.200% e HF-d: +35.800% vs. HF, Fig. 12C).

Sensibilidade e secreção de insulina: O aumento da expressão de *Glp1r* nas ilhotas após os tratamentos (HF-a: +1.868%, HF-g: +1.943% e HF-d: +2.062% vs. HF, Figura 12D) indica melhora na função das células beta e na homeostase da glicose. O gene *Glut2*, que é essencial para GSIS, aumentou nos grupos tratados (HF-a: +180%, HF-g: +323% e HF-d: +470% vs. HF, Figura 12E), apoiando as descobertas anteriores. Esses genes foram reduzidos no grupo HF (-99% para *Fgf21*, -83% para *Glp1r* e -24% para *Glut2* vs. C), implicando disfunção das células beta.

Função, diferenciação e manutenção das células beta: Em relação à diferenciação e manutenção das células beta, *Neurog3*, que é essencial para a diferenciação das células beta, foi reduzido no grupo HF (-96% vs. C, Figura 12F), enquanto o grupo HF-d apresentou o maior aumento de expressão (+1.575% vs. HF). *Mafa*, um fator de transcrição essencial para a expressão e função da insulina em células beta adultas, apresentou expressão aumentada nos grupos tratados (HF-a: +233%, HF-g: +412% e HF-d: +561% vs. HF, Figura 12G). *Mafa* atua conjuntamente com *Pdx1* e *Neurod1*. O *Pdx1* foi aumentado em todos os grupos tratados (variando de +1.740% a +2.060% vs. HF, Figura 12H). Embora a expressão de *Neurod1* não tenha diferido entre os grupos C e HF, os grupos tratados com PPAR-a apresentaram expressão aumentada (HF-a: +46% e HF-d: +112% vs. HF, Figura 12I), o que pode indicar que o tratamento com PPAR-a pode preservar ou restaurar a identidade das células beta sob estresse lipotóxico.

Figura 12 – Expressão relativa de mRNA nas ilhotas pancreáticas para Ppara (A), Pparg (B), Fgf21 (C), Glp1r (D), Glut2 (E), Neurog3 (F), Mafa (G), Pdx1 (H) e Neurod1 (I)



Legenda: O controle endógeno *Tbp* (proteína de ligação TATA Box) foi usado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são apresentados como média \pm DP (n=5 para cada grupo). As diferenças foram testadas com Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA e pós-teste Dunnett T3 e são marcadas da seguinte forma: a \neq C, b \neq HF para massa corporal, *P<0.05, **P < 0,01 e ***P < 0,001. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.

Apoptose, sobrevivência e regeneração celular: A regulação positiva de *Bax* no grupo HF (+986% vs. C, Figura 13A) concomitante com a regulação negativa de *Bcl2* (-58% vs. C, Figura 13B) sugere aumento da apoptose. Por outro lado, os tratamentos reduziram a expressão de *Bax* (HF-a: -69%, HF-g: -28%, HF-d: -67% vs. HF) enquanto aumentaram *Bcl2* (HF-a: +162%, HF-g: +133% e HF-d: +121% vs. HF). A razão *Bax/Blc2* aumentou no grupo HF (+2.820% vs. C, Figura 13C), mas diminuiu nos grupos tratados (HF-a: -12%, HF-g: -27% e HF-d: -14% vs. HF), o que implica que os tratamentos preservaram a viabilidade das células beta.

Os genes *Pax4* e *Nkx6.1* estão relacionados à regeneração de células beta e manutenção de sua identidade, enquanto o ARX é aumentado na presença de células beta desdiferenciadas. A expressão reduzida de *Pax4* (-100% vs. C, Figura 13D) e

Nkx6.1 (-94% vs. C, Figura 13E) no grupo HF foi consistente com a imunomarcação proeminente de ARX nas ilhotas HF (Figura 14), sugerindo a presença de células beta disfuncionais. Em contraste, os tratamentos aumentaram a expressão de *Pax4* (variando de +1.840% a +3.060% vs. HF) e *Nkx6.1* (de +1.417% a +4.632% vs. HF), com imunomarcação perceptível para KI67 e PAX4 nos animais tratados (Figura 14), indicando a preservação da identidade das células beta após o tratamento com agonistas de PPAR.

Figura 13 – Expressão relativa de mRNA nas ilhotas pancreáticas de *Bax* (A), *Bcl*2 (B), razão *Bax/Bcl*2 (C), *Pax4* (D) e *Nkx6.1* (E).



Legenda: O controle endógeno *Tbp* (proteína de ligação TATA Box) foi usado para normalizar a expressão dos genes selecionados. Os dados são apresentados como média \pm DP (n=5 para cada grupo). As diferenças foram testadas com Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA e pós-teste Dunnett T3 e são marcadas da seguinte forma: a \neq C, b \neq HF para massa corporal, *P<0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratado com agonista PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.
Figura 14 – Imunohistoquímica para Ki67, PAX4 e ARX.



Legenda: Os animais HF apresentaram imunorreações positivas para ARX e leve imunomarcação para KI67 e PAX4. Os grupos tratados apresentaram expressão resgatada de Ki67 e PAX4 e expressão atenuada de ARX, assemelhando-se aos do grupo C (barra de escala = 50 µm). Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista de PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratada com um agonista de PPAR-a (ieta rica em gordura tratada com um agonista de PPAR-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista de PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratada com um agonista de PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.

4.5. Análise de componentes principais

O mapa de calor identificou as variáveis mais influentes na matriz de correlação, com os coeficientes mais altos aparecendo em azul e os mais baixos em vermelho (Figura 15A). Os dois primeiros PCs (PC1 e PC2) mostraram uma variância cumulativa de 83,3% (Figura 15B) e, portanto, foram retidos na análise.

O biplot PCA (Figura 16A) revelou que a expressão de um gene apoptótico (*Bax*) foi maior no grupo HF que nos outros grupos. Em contraste, os genes *Ppara*, antiapoptótico (*Bcl2*) e de proliferação de células beta (*Pax4* e *Neurog3*) foram associados aos escores de PC dos grupos C e HF-a. Em contraste, os genes de função melhorada da célula beta (*Fgf21*, *Glp1r* e *Glut2*), identidade e manutenção da célula beta (*Pdx1*, *Neurod1*, *Mafa* e *Nkx6.1*) carregaram mais perto dos escores de PC do HF-d que do HF-g.

Finalmente, os escores de PC (Figura 16B) dos grupos tratados foram opostos às do grupo HF não tratado, indicando a eficiência dos tratamentos. O HF foi o grupo mais alterado, pois foi colocado distante do centro do gráfico e do grupo C. Os escores de HF foram reunidos no lado inferior direito (pior resultado), enquanto todos os grupos tratados foram agrupados no lado esquerdo do gráfico (melhor resultado). Além disso, os escores de HF-a e HF-g foram diferentes entre os grupos C e HF-d, destacando a ativação dupla de PPAR-a/g como o tratamento mais bem-sucedido.

Figura 15 – Mapa de calor da análise de componentes principais (PCA) (A) e proporção de variância dos componentes principais (B)



Legenda: A PCA manteve PC1 e PC2 na análise, pois eles mostraram uma variância cumulativa de 83,3%, validando a análise. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a + agonista PPAR-g.

Fonte: A autora, 2025.



Figura 16 – Gráfico biplot PCA (A) e escores de componentes principais (B).

Legenda: Os escores PCA colocaram os grupos tratados opostos ao grupo HF e próximos ao grupo C, destacando a eficiência dos tratamentos propostos. Abreviações: C, dieta controle; HF, dieta rica em gordura; HF-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a (WY-14643); HF-g, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-g (pioglitazona); HF-d, dieta rica em gordura tratada com um agonista PPAR-a + agonista PPAR-g. Fonte: A autora, 2025.

5 DISCUSSÃO

Este protocolo de obesidade induzida por dieta de 10 semanas causou sobrepeso, hiperglicemia, intolerância oral à glicose, um perfil de adipocina próinflamatória, hipertrofia de ilhotas pancreáticas, hipersecreção e redução da expressão gênica relacionada à manutenção de células beta no grupo HF. Em contraste, o agonista PPAR-a WY14643 e uma dose baixa de pioglitazona combinados reduziram o peso corporal, normalizando este parâmetro. Todos os tratamentos restauraram a sensibilidade à insulina, produziram um perfil de adipocina anti-inflamatória e resgataram o tamanho e a estrutura das ilhotas, resultando em aumento da expressão de genes relacionados à proliferação de células das ilhotas, identidade de células beta, conversão semelhante a alfa para beta e efeitos antiapoptóticos.

O efeito de sensibilização à insulina da ativação total do PPAR-g (pioglitazona) envolve múltiplos órgãos. No entanto, está presente no TAB, o local da transcrição da adiponectina e do transportador de glicose, onde controla a inflamação e aumenta a captação periférica de glicose (Czaja, 2009). A ativação do PPAR-a e do PPAR-a/g duplo alivia a resistência à insulina por meio da mitigação do "whitening" do tecido adiposo marrom e da estimulação do "*browning*" do TAB subcutâneo, ativando as vias termogênicas dependentes e independentes de UCP1. Esta última pode atuar como um "sumidouro" de glicose, aumentando a oxidação da glicose em adipócitos bege por meio do aumento do ciclo de Ca2+ dependente de ATP pela via Serca2b-Ryr2 (Miranda *et al.*, 2022).

Camundongos obesos induzidos por dieta exibem hipertrofia e hipersecreção de ilhotas devido à secreção compensatória de insulina pelas células beta para manter a homeostase da glicose (Cerf, 2020). Além das alterações locais no pâncreas endócrino, o tecido adiposo colabora com o início do DM2 ao se tornar disfuncional e liberar adipocinas pró-inflamatórias excedentes em vez de adipocinas sensibilizadoras de insulina, como a adiponectina, conforme observado no grupo HF (Bays *et al.*, 2008).

Em comparação com monoterapias, os agonistas duplos PPAR-a/g tiveram melhores efeitos na massa corporal, tolerância oral à glicose, ilhotas e massa de células beta. Esses efeitos sugeriram uma função melhorada das células beta devido à supressão da lipotoxicidade, conforme encontrado após o tratamento com os agonistas duplos PPAR-a/g aleglitazar (Stirban *et al.*, 2016) e muraglitazar (Fernandez *et al.*, 2011). Como uma doença multi-hormonal, o DM2 envolve uma massa reduzida de células beta e a perda do efeito incretina. Dietas HF crônicas levam à perda da capacidade da incretina GLP1 aumentar a responsividade das células beta à glicose e sua proliferação, resultando na exaustão dessas células (Holst *et al.*, 2011). A perda do efeito incretina ocorre mesmo com níveis normais de GLP1 e GIP em indivíduos obesos, sugerindo possível resistência às suas ações, conforme descrito para insulina e leptina (Knop *et al.*, 2012).

O aumento da expressão do *Pparg* nos grupos tratados teve como alvo o *Fgf21*, *Glut2* e *Glp1r*. No pâncreas endócrino, o aumento da expressão de *Glut2* prediz GSIS adequada nos grupos tratados. Isso é consistente com a regulação positiva de *Fgf21*, que protege as células beta dos danos da glicolipotoxicidade ao melhorar o GSIS secundário à ativação de PI3K/AKT e PDX1 (Low *et al.*, 2021). O eixo célula alfa glucagon-fígado FGF21 sugere que o bloqueio do glucagon hepático estimula o fígado a liberar FGF21, promovendo a proliferação de células beta (Cui *et al.*, 2023). Além disso, a liraglutida (agonista do receptor GLP1) induz o FGF21 a promover perda de peso em camundongos alimentados com uma dieta rica em carboidratos (Le *et al.*, 2023). Todos os tratamentos aumentaram a expressão de *Fgf21*, *Pparg* e *Glp1r*, sugerindo que eles favorecem a manutenção e regeneração das ilhotas.

Nesse contexto, alguns fatores de transcrição são cruciais para o desenvolvimento do pâncreas, e sua expressão adequada garante uma organogênese perfeita. Após o órgão ter amadurecido, o fenótipo das células beta precisa ser mantido (Cerf, 2006). A redução da expressão de *Pdx1*, *Pax4*, *Neurod1*, *Mafa* e *Nkx6.1* no grupo HF sugere a presença de células beta disfuncionais e pode indicar uma vida útil reduzida. Em contraste, os grupos HF-a e HF-d restauraram a expressão de todos esses genes. Já o grupo HF-g restaurou a expressão de *Pdx1*, *Pax4*, *Mafa* e *Nkx6.1*, sugerindo um possível papel da ativação de PPAR na manutenção do fenótipo das células beta.

Todos os tratamentos aumentaram a expressão de *Pparg* nas ilhotas, regulando positivamente seus genes-alvo *Pdx1* e *Nkx6.1*. Esse cenário indica uma maturação favorecida das ilhotas em vez de proliferação, além de uma melhora na GSIS devido ao aumento de GLUT2, glucoquinase e pró-insulina, como observado em um modelo de pancreatectomia de 60% em ratos (Moibi *et al.*, 2007). O PDX1 é o

principal fator de transcrição envolvido no desenvolvimento inicial do pâncreas, na diferenciação das células beta e na manutenção das células beta maduras (Wang *et al.*, 2005). Em células beta maduras, o *Pdx1* regula a transcrição de insulina e *Nkx6.1* (Shih *et al.*, 2002). O *Nkx6.1* também influencia o remodelamento pancreático e a proliferação de células beta, e sua redução no grupo HF é consistente com ilhotas aumentadas e disfuncionais. A regulação positiva de *Pdx1*, *Neurod1*, *Mafa* e *Neurog3* no grupo HF-d foi consistente com uma melhor tolerância oral à glicose e sugeriu uma melhora na biossíntese de insulina (Itkin-Ansari *et al.*, 2005a).

Nossos resultados sugerem uma alta taxa de proliferação relacionada à manutenção e identidade das células beta, conforme indicado pelo aumento de células positivas para Ki67 nos grupos tratados (Brown e Gatter, 2002). Em contraste, os camundongos do grupo HF apresentaram uma leve imunomarcação para Ki67 concomitante à reduzida expressão de Pax4 e Mafa. O DM2 está relacionado à perda de identidade das células beta, com transdiferenciação para a expressão de glucagon e falha de processos influenciados por Pax4 (Lau et al., 2023) e pela perda de Mafa nas células beta pancreáticas de camundongos diabéticos (Nishimura et al., 2022). A regulação positiva de Pax4 promove a sobrevivência e proliferação das células beta, bloqueando a desdiferenciação (Lorenzo et al., 2015) e mantendo a expressão de Nkx6.1 nas células beta em diferenciação, desempenhando um papel crucial em seu desenvolvimento (Itkin-Ansari et al., 2005b). O fator de transcrição específico das células beta Nkx6.1 é necessário para especificar a linhagem das células beta, classificando-o como um fator essencial que reprime genes endócrinos não beta (Pavluch et al., 2023). Além disso, o Mafa interage com o Pdx1 e Neurod1 para ativar a expressão de insulina nas células beta pancreáticas (Kataoka et al., 2002). Assim, nossos resultados sugerem que o fenótipo das células beta é mantido pelo aumento da expressão de Pax4, Mafa e Nkx6.1, consistente com a preservação da massa de células beta nos grupos tratados.

A plasticidade celular das ilhotas e a manipulação da transdiferenciação emergem como potenciais alvos para o controle do espectro do DM2, promovendo não apenas a restauração funcional, mas também a longevidade das células pancreáticas, garantindo sua viabilidade e contribuindo para o manejo metabólico a longo prazo. Nesse contexto, a transformação de células não beta em células produtoras de insulina e a reprogramação das células das ilhotas dependem de fatores de transcrição, entre outros gatilhos (Spezani *et al.*, 2024). Neste estudo, os

grupos HF-a e HF-d beneficiaram-se do aumento de *Neurod1* paralelo ao aumento de *Pdx1* e *Nkx6.1*, sugerindo que células não beta foram convertidas em células produtoras de insulina após a ativação de PPAR (Gosmain *et al.*, 2011). Além disso, os grupos tratados apresentaram alta expressão proteica e gênica de PAX4, concomitante com leve imunocoloração para ARX, sugerindo a conversão de células alfa em células semelhantes às beta por meio da inibição de ARX mediada por PAX4 (Collombat *et al.*, 2003).

Em humanos com DM2, a apoptose contribui para a perda da massa de células beta e o aumento de *Bax* contribui ativamente para o fenótipo das ilhotas diabéticas em camundongos ob/ob (Chan *et al.*, 2013). De forma semelhante, membros da família *Bcl* desempenham um papel na morte de células beta durante a glucolipotoxicidade (Lupi *et al.*, 2002). A redução da razão *Bax/Bcl2* nos grupos tratados sugere que a ativação de PPAR pode mitigar a morte das células das ilhotas nesse modelo de camundongos (Gao e Wang, 2009).

A análise de componentes principais (PCA) permite comparações entre os tratamentos, pois um teste multivariado pode identificar fenótipos complexos que são difíceis de perceber por meio de vários testes univariados. Os escores de PCA do grupo HF-a (agonista isolado de PPAR-a) agruparam-se próximos aos genes *Bcl2*, *Neurog3* e *Pax4*, com efeitos antiapoptóticos e aumento da proliferação de células beta como os desfechos mais influentes. Os escores do grupo tratado com baixa dose de pioglitazona (HF-g) e a combinação de PPAR-a/g (HF-d) agruparam-se próximos a genes relacionados à melhoria da função, identidade e manutenção das células beta. O PCA também separou o grupo HF dos grupos C e tratados, com HF-a próximo ao grupo C e HF-g entre os grupos HF e HF-d. O grupo HF-d agrupou-se oposto ao grupo HF, provando ser o tratamento mais eficaz considerando esta avaliação multivariada (Reis-Barbosa e Mandarim-de-Lacerda, 2024).

O presente estudo apresenta algumas limitações, incluindo a impossibilidade de realizar western blotting devido à falta de ilhotas isoladas viáveis em quantidade suficiente e o volume sanguíneo total limitado da linhagem de camundongos, o que impediu a avaliação da razão pró-insulina/insulina. Além disso, não foi possível a avaliação de fêmeas, o que poderia contribuir com a identificação de dimorfismo sexual nos desfechos avaliados.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram evidências de remodelação benéfica de ilhotas e sensibilidade à insulina melhorada após monoterapia e tratamento duplo com PPARa/g. A pioglitazona em baixa dosagem pode minimizar os efeitos adversos devido ao agonismo total do PPAR-g e, quando usada sozinha ou em combinação com PPARa, pode emergir como uma terapia que visa o aprimoramento da identidade das células beta para o controle do espectro do DM2.

Considerando os resultados do qPCR, os escores de PC separaram os grupos tratados do grupo HF não tratado, confirmando os efeitos benéficos da ativação do PPAR na homeostase das ilhotas pancreáticas. No entanto, a maior distância do HFd dos escores de PC do HF garante que a combinação PPAR-a/g foi o tratamento mais eficaz, com genes relacionados à função das células beta e manutenção da identidade como os principais alvos. A Figura 17 resume nossas principais descobertas.



Figura 17 – Resumo dos principais resultados

Legenda: A dieta HF causou disfunção das células beta, caracterizada por hipertrofia das ilhotas, aumento das massas de células alfa e beta e um padrão de expressão gênica nas ilhotas compatível com proliferação prejudicada, manutenção da identidade comprometida e favorecimento da desdiferenciação de células alfa, levando ao aumento da apoptose. O gene Bax, associado aos animais HF na análise de PCA, é destacado em vermelho (A). Por outro lado, o tratamento com agonistas de PPAR-α/γ restaurou a função das ilhotas ao preservar as massas de células alfa e beta e restaurar a expressão gênica associada à proliferação, função e manutenção da identidade das células beta, inibindo assim a apoptose (B). Os genes que tiveram maior influência nos melhores resultados observados no grupo HF-d são destacados em verde.

Fonte: A autora, 2025 (Fernandes-da-Silva et al., 2025)

REFERÊNCIAS

- Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet* 2023; <u>402</u>: 203-234 (doi: 10.1016/s0140-6736(23)01301-6)
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M et al. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013; <u>19</u>: 557-566 (doi: 10.1038/nm.3159)
- Ahmed B, Sultana R, Greene M. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine* & *Pharmacotherapy* 2021; <u>137</u>: 111315 (doi: 10.1016/j.biopha.2021.111315)
- Anabtawi A, Moriarty PM, Miles JM. Pharmacologic Treatment of Dyslipidemia in Diabetes: A Case for Therapies in Addition to Statins. *Curr Cardiol Rep* 2017; <u>19</u>: 62 (doi: 10.1007/s11886-017-0872-8)
- Atlas ID. IDF diabetes atlas. International diabetes federation 2019; (em impressão, doi: (doi:
- Baeyens L, Bouwens L. Cellular plasticity of the pancreas. *Biol Chem* 2009; <u>390</u>: 995-1001 (doi: 10.1515/bc.2009.117)
- Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; <u>6</u>: 343-368 (doi: 10.1586/14779072.6.3.343)
- Bensellam M, Jonas J-C, Laybutt DR. Mechanisms of β-cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *Journal of Endocrinology* 2018; <u>236</u>: R109-R143 (doi: 10.1530/JOE-17-0516)
- Berger C, Zdzieblo D. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 2020; <u>472</u>: 1249-1272 (doi: 10.1007/s00424-020-02383-4)
- Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005; <u>26</u>: 244-251 (doi: 10.1016/j.tips.2005.03.003)
- Bouzakri K, Ribaux P, Halban PA. Silencing Mitogen-activated Protein 4 Kinase 4 (MAP4K4) Protects Beta Cells from Tumor Necrosis Factor-α-induced Decrease of IRS-2 and Inhibition of Glucose-stimulated Insulin Secretion*. *Journal of Biological Chemistry* 2009; <u>284</u>: 27892-27898 (doi: https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048058)
- Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, Dorrell C, Liu C, Luo Y et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. *J Clin Invest* 2013; <u>123</u>: 1275-1284 (doi: 10.1172/jci66514)
- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; <u>40</u>: 2-11 (doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01343.x)
- Brunton SA, Wysham CH. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes: role and clinical experience to date. *Postgrad Med* 2020; <u>132</u>: 3-14 (doi: 10.1080/00325481.2020.1798099)
- Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; <u>15</u>: 798-808 (doi: 10.1038/oby.2007.608)
- Cerf ME. Transcription factors regulating β-cell function. *European Journal of Endocrinology* 2006; <u>155</u>: 671-679 (doi: 10.1530/eje.1.02277)
- Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Med Sci Monit* 2007; <u>13</u>: RA12-17 (doi:

- Cerf ME. High fat programming of beta-cell failure. *Adv Exp Med Biol* 2010; <u>654</u>: 77-89 (doi: 10.1007/978-90-481-3271-3_5)
- Cerf ME. Beta Cell Physiological Dynamics and Dysfunctional Transitions in Response to Islet Inflammation in Obesity and Diabetes. *Metabolites* 2020; <u>10</u>: (doi: 10.3390/metabo10110452)
- Chan JY, Luzuriaga J, Bensellam M, Biden TJ, Laybutt DR. Failure of the Adaptive Unfolded Protein Response in Islets of Obese Mice Is Linked With Abnormalities in β-Cell Gene Expression and Progression to Diabetes. *Diabetes* 2013; <u>62</u>: 1557-1568 (doi: 10.2337/db12-0701)
- Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS. Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci* 2019; <u>20</u>: (doi: 10.3390/ijms20205055)
- Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinelli C, Boccuzzi G et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. *Br J Pharmacol* 2010; <u>160</u>: 1892-1902 (doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00671.x)
- Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; <u>81</u>: 243-248 (doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.006)
- Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G et al. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes* & development 2003; <u>17</u>: 2591-2603 (doi: 10.1101/gad.269003)
- Committee ADAPP. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care* 2023; <u>47</u>: S20-S42 (doi: 10.2337/dc24-S002)
- Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N et al. The inactivation of Arx in pancreatic α-cells triggers their neogenesis and conversion into functional β-like cells. *PLoS Genet* 2013; <u>9</u>: e1003934 (doi: 10.1371/journal.pgen.1003934)
- Cuciureanu M, Carataşu CC, Gabrielian L, Frăsinariu OE, Checheriță LE, Trandafir LM et al. 360-Degree Perspectives on Obesity. *Medicina (Kaunas)* 2023; <u>59</u>: (doi: 10.3390/medicina59061119)
- Cui X, Feng J, Wei T, Zhang L, Lang S, Yang K et al. Pancreatic alpha cell glucagonliver FGF21 axis regulates beta cell regeneration in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2023; <u>66</u>: 535-550 (doi: 10.1007/s00125-022-05822-2)
- Cusi K, Isaacs S, Barb D, Basu R, Caprio S, Garvey WT et al. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care and Endocrinology Clinical Settings: Co-Sponsored by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). *Endocrine Practice* 2022; <u>28</u>: 528-562 (doi: https://doi.org/10.1016/j.eprac.2022.03.010)
- Czaja MJ. Pioglitazone: more than just an insulin sensitizer. *Hepatology* 2009; <u>49</u>: 1427-1430 (doi: 10.1002/hep.22983)
- Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; <u>123</u>: 1120-1128 (doi: 10.1053/gast.2002.35954)
- de-Lima-Júnior JC, Rodovalho S, Van de Sande-Lee S, Monfort-Pires M, Rachid B, Cintra RM et al. Effect of pioglitazone treatment on brown adipose tissue volume and activity and hypothalamic gliosis in patients with type 2 diabetes mellitus: a

proof-of-concept study. *Acta Diabetologica* 2019; <u>56</u>: 1333-1339 (doi: 10.1007/s00592-019-01418-2)

- de Orçamentos Familiares IP. Familiares 2017–2018: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Rio de Janeiro, Brazil* 2020; (*em impressão*, doi: 1-65 (doi:
- Della-Morte D, Palmirotta R, Rehni AK, Pastore D, Capuani B, Pacifici F et al. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors. *Pharmacogenomics* 2014; <u>15</u>: 2063-2082 (doi: 10.2217/pgs.14.162)
- Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 2015; <u>7</u>: e1024405 (doi: 10.1080/19382014.2015.1024405)
- Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 2011; <u>11</u>: 98-107 (doi: 10.1038/nri2925)
- Dumasia NP, Pethe PS. Pancreas development and the Polycomb group protein complexes. *Mechanisms of Development* 2020; <u>164</u>: 103647 (doi: https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103647)
- Felig P, Wahren J, Sherwin R, Hendler R. Insulin, glucagon, and somatostatin in normal physiology and diabetes mellitus. *Diabetes* 1976; <u>25</u>: 1091-1099 (doi: 10.2337/diab.25.12.1091)
- Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Santana-Oliveira DA, Oliveira-Cordeiro B, Rangel-Azevedo C, Silva-Veiga FM et al. Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur J Nutr* 2021; <u>60</u>: 2949-2960 (doi: 10.1007/s00394-021-02542-y)
- Fernandes-da-Silva A, Miranda RA, Lisboa PC, Souza-Mello V. Revisiting pancreatic islet isolation in murine models: A practical and effective technical protocol. *Physiol Rep* 2024; <u>12</u>: e16040 (doi: 10.14814/phy2.16040)
- Fernandes-da-Silva A, Santana-Oliveira DA, Miranda RA, Souza-Tavares H, Silva-Veiga FM, Mandarim-de-Lacerda CA et al. Dual PPAR-α/γ enhances beta cell identity, preserving islet structure in HF-fed mice. *Journal of Endocrinology* 2025; <u>264</u>: e240180 (doi: 10.1530/joe-24-0180)
- Fernandez M, Gastaldelli A, Triplitt C, Hardies J, Casolaro A, Petz R et al. Metabolic effects of muraglitazar in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Obes Metab* 2011; <u>13</u>: 893-902 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01429.x)
- FERREIRA TDAM. 2018. SÍNTESE DE DERIVADOS DO CÁRDANOL E AVALIAÇÃO SOBRE RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS In.
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 2014; <u>20</u>: 953-966 (doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018)
- Gale EA. Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet* 2001; <u>357</u>: 1870-1875 (doi: 10.1016/s0140-6736(00)04960-6)
- Gao C, Wang A-Y. Significance of Increased Apoptosis and Bax Expression in Human Small Intestinal Adenocarcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2009; <u>57</u>: 1139-1148 (doi: 10.1369/jhc.2009.954446)
- Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; <u>292</u>: E871-883 (doi: 10.1152/ajpendo.00551.2006)

- Gawrieh S, Noureddin M, Loo N, Mohseni R, Awasty V, Cusi K et al. Saroglitazar, a PPAR-α/γ Agonist, for Treatment of NAFLD: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial. *Hepatology* 2021; <u>74</u>: 1809-1824 (doi: 10.1002/hep.31843)
- Gillies CL, Abrams KR, Lambert PC, Cooper NJ, Sutton AJ, Hsu RT et al. Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and metaanalysis. *Bmj* 2007; <u>334</u>: 299 (doi: 10.1136/bmj.39063.689375.55)
- Gosmain Y, Cheyssac C, Heddad Masson M, Dibner C, Philippe J. Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α-cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes Obes Metab* 2011; <u>13 Suppl 1</u>: 31-38 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01445.x)
- Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 2014; <u>13</u>: 17 (doi: 10.1186/1475-2891-13-17)
- Habener JF, Stanojevic V. α-cell role in β-cell generation and regeneration. *Islets* 2012; <u>4</u>: 188-198 (doi: 10.4161/isl.20500)
- Hædersdal S, Andersen A, Knop FK, Vilsbøll T. Revisiting the role of glucagon in health, diabetes mellitus and other metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 2023; <u>19</u>: 321-335 (doi: 10.1038/s41574-023-00817-4)
- Han L, Shen WJ, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-β/δ and PPAR-γ. *Future Cardiol* 2017; <u>13</u>: 279-296 (doi: 10.2217/fca-2017-0019)
- Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature — An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 2019; <u>221</u>: 115-124 (doi: https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.09.008)
- Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; <u>34</u> <u>Suppl 2</u>: S251-257 (doi: 10.2337/dc11-s227)
- Hong F, Xu P, Zhai Y. The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. Int J Mol Sci 2018; <u>19</u>: (doi: 10.3390/ijms19082189)
- Hörnblad A, Cheddad A, Ahlgren U. An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and β-cell mass distribution. *Islets* 2011; <u>3</u>: 204-208 (doi: 10.4161/isl.3.4.16417)
- Hudish LI, Reusch JE, Sussel L. β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2019; <u>129</u>: 4001-4008 (doi: 10.1172/jci129188)
- Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; <u>101</u>: 4543-4547 (doi: 10.1073/pnas.0400356101)
- Inaishi J, Saisho Y. Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review. *Nutrients* 2020a; <u>12</u>: 3846 (doi: 10.3390/nu12123846)
- Inaishi J, Saisho Y. Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review. *Nutrients* 2020b; <u>12</u>: (doi: 10.3390/nu12123846)

- Itkin-Ansari P, Marcora E, Geron I, Tyrberg B, Demeterco C, Hao E et al. NeuroD1 in the endocrine pancreas: localization and dual function as an activator and repressor. *Dev Dyn* 2005a; <u>233</u>: 946-953 (doi: 10.1002/dvdy.20443)
- Itkin-Ansari P, Marcora E, Geron I, Tyrberg B, Demeterco C, Hao E et al. NeuroD1 in the endocrine pancreas: Localization and dual function as an activator and repressor. *Developmental Dynamics* 2005b; <u>233</u>: (doi:
- Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R et al. Dual PPARα/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int* 2018; <u>38</u>: 1084-1094 (doi: 10.1111/liv.13634)
- Jain S, Pulikuri S, Zhu Y, Qi C, Kanwar YS, Yeldandi AV et al. Differential expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and PPAR-binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the mouse. Am J Pathol 1998; <u>153</u>: 349-354 (doi: 10.1016/s0002-9440(10)65577-0)
- Kanda Y, Shimoda M, Hamamoto S, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M et al. Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPARgamma agonist. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; <u>298</u>: E278-286 (doi: 10.1152/ajpendo.00388.2009)
- Kataoka K, Han S-i, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA Is a Glucoseregulated and Pancreatic β-Cell-specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene *. *Journal of Biological Chemistry* 2002; <u>277</u>: 49903-49910 (doi: 10.1074/jbc.M206796200)
- Kataoka SY, Lois N, Kawano S, Kataoka Y, Inoue K, Watanabe N. Fenofibrate for diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2023; <u>6</u>: Cd013318 (doi: 10.1002/14651858.CD013318.pub2)
- Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *AJP Endocrinology and Metabolism* 2000a; <u>278</u>: E1-E14 (doi:
- Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000b; <u>278</u>: E1-e14 (doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.1.E1)
- Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem* 2015; <u>48</u>: 923-930 (doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023)
- Knop FK, Aaboe K, Vilsboll T, Volund A, Holst JJ, Krarup T et al. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2012; <u>14</u>: 500-510 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01549.x)
- Laganà AS, Vitale SG, Nigro A, Sofo V, Salmeri FM, Rossetti P et al. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Dysregulated Metabolic Homeostasis, Inflammation and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2016; <u>17</u>: (doi: 10.3390/ijms17070999)
- Lau HH, Krentz NAJ, Abaitua F, Perez-Alcantara M, Chan J-W, Ajeian J et al. PAX4 loss of function increases diabetes risk by altering human pancreatic endocrine cell development. *Nature Communications* 2023; <u>14</u>: 6119 (doi: 10.1038/s41467-023-41860-z)
- Le TDV, Fathi P, Watters AB, Ellis BJ, Besing G-LK, Bozadjieva-Kramer N et al. Fibroblast growth factor-21 is required for weight loss induced by the glucagonlike peptide-1 receptor agonist liraglutide in male mice fed high carbohydrate

diets. *Molecular Metabolism* 2023; <u>72</u>: 101718 (doi: https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101718)

- Lebovitz HE. Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. *Curr Diab Rep* 2019; <u>19</u>: 151 (doi: 10.1007/s11892-019-1270-y)
- Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; <u>116</u>: 571-580 (doi: 10.1172/jci27989)
- Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol* 2010a; <u>690</u>: 3-12 (doi: 10.1007/978-90-481-9060-7_1)
- Leung PS. 2010b. Overview of the Pancreas. In: Leung PS, editor. The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas: The RAS in the Pancreas. Dordrecht: Springer Netherlands. p 3-12.
- Leung PS. 2010c. *Physiology of the Pancreas*. In: Leung PS, editor. The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas: The RAS in the Pancreas. Dordrecht: Springer Netherlands. p 13-27.
- Loke YK, Kwok CS, Singh S. Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj* 2011; <u>342</u>: d1309 (doi: 10.1136/bmj.d1309)
- López-Salazar V, Tapia MS, Tobón-Cornejo S, Díaz D, Alemán-Escondrillas G, Granados-Portillo O et al. Consumption of soybean or olive oil at recommended concentrations increased the intestinal microbiota diversity and insulin sensitivity and prevented fatty liver compared to the effects of coconut oil. *J Nutr Biochem* 2021; <u>94</u>: 108751 (doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108751)
- Lorenzo PI, Fuente-Martín E, Brun T, Cobo-Vuilleumier N, Jimenez-Moreno CM, G. Herrera Gomez I et al. PAX4 Defines an Expandable β-Cell Subpopulation in the Adult Pancreatic Islet. *Scientific Reports* 2015; <u>5</u>: 15672 (doi: 10.1038/srep15672)
- Louzada M, Cruz GLD, Silva K, Grassi AGF, Andrade GC, Rauber F et al. Consumption of ultra-processed foods in Brazil: distribution and temporal evolution 2008-2018. *Rev Saude Publica* 2023; <u>57</u>: 12 (doi: 10.11606/s1518-8787.2023057004744)
- Low BSJ, Lim CS, Ding SSL, Tan YS, Ng NHJ, Krishnan VG et al. Decreased GLUT2 and glucose uptake contribute to insulin secretion defects in MODY3/HNF1A hiPSC-derived mutant β cells. *Nat Commun* 2021; <u>12</u>: 3133 (doi: 10.1038/s41467-021-22843-4)
- Lukitasari M, Nugroho DA, Rohman MS, Widodo N, Farmawati A, Hastuti P. Beneficial effects of green coffee and green tea extract combination on metabolic syndrome improvement by affecting AMPK and PPAR-α gene expression. *J Adv Pharm Technol Res* 2020; <u>11</u>: 81-85 (doi: 10.4103/japtr.JAPTR_116_19)
- Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C et al. Prolonged Exposure to Free Fatty Acids Has Cytostatic and Pro-Apoptotic Effects on Human Pancreatic Islets: Evidence that β-Cell Death Is Caspase Mediated, Partially Dependent on Ceramide Pathway, and Bcl-2 Regulated. *Diabetes* 2002; <u>51</u>: 1437-1442 (doi: 10.2337/diabetes.51.5.1437)
- Lytrivi M, Castell A-L, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of β-Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. *Journal of molecular biology* 2020a; <u>432</u>: 1514-1534 (doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.016)
- Lytrivi M, Castell AL, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of β-Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. *J Mol Biol* 2020b; <u>432</u>: 1514-1534 (doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.016)

- Magliano DJ, Boyko EJ, committee IDFDAtes. 2021. *IDF Diabetes Atlas*. In: Idf diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation
- © International Diabetes Federation, 2021.
- Mahadevan V. Anatomy of the pancreas and spleen. *Surgery (Oxford)* 2019; <u>37</u>: 297-301 (doi: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.04.008)
- Malur P, Menezes A, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lavie CJ. The Microvascular and Macrovascular Benefits of Fibrates in Diabetes and the Metabolic Syndrome: A review. *Mo Med* 2017; <u>114</u>: 464-471 (doi:
- Mancini M. Diretrizes brasileiras de obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade 2016; <u>4</u>: (doi:
- Manio MC, Matsumura S, Inoue K. Low-fat diet, and medium-fat diets containing coconut oil and soybean oil exert different metabolic effects in untrained and treadmill-trained mice. *J Int Soc Sports Nutr* 2018; <u>15</u>: 29 (doi: 10.1186/s12970-018-0234-y)
- Marinho TdS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. *International Journal of Morphology* 2019; <u>37</u>: 1331-1334 (doi:
- Marinovic MP, Sousa-Filho CPB, Batista FAH, Avelino TM, Cogliati B, Figueira ACM et al. Green tea extract increases adiponectin and PPAR α levels to improve hepatic steatosis. J Nutr Biochem 2022; <u>103</u>: 108957 (doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.108957)
- Mastracci TL, Apte M, Amundadottir LT, Alvarsson A, Artandi S, Bellin MD et al. Integrated Physiology of the Exocrine and Endocrine Compartments in Pancreatic Diseases: Workshop Proceedings. *Diabetes* 2023; <u>72</u>: 433-448 (doi: 10.2337/db22-0942)
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; <u>28</u>: 412-419 (doi: 10.1007/bf00280883)
- McKenna NJ, O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. Endocrinology 2002; 143: 2461-2465 (doi: 10.1210/endo.143.7.8892)
- Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* 2006; <u>116</u>: 598-606 (doi: 10.1172/jci27958)
- Migowski A, da Costa GTL. Análise temporal da prevalência da obesidade e do sobrepeso no Brasil entre 2006 e 2023: evidências a partir dos dados do Vigitel. *OnScience* 2024; <u>2</u>: e00104-e00104 (doi:
- Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR-α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition* 2020; <u>78</u>: 110791 (doi: 10.1016/j.nut.2020.110791)
- Miranda CS, Silva-Veiga FM, Fernandes-da-Silva A, Guimarães Pereira VR, Martins BC, Daleprane JB et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2022; <u>562</u>: (doi:
- Miranda CS, Silva-Veiga FM, Fernandes-da-Silva A, Guimarães Pereira VR, Martins BC, Daleprane JB et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2023; <u>562</u>: 111839 (doi: https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111839)

- Mirza AZ, Althagafi, II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem* 2019; <u>166</u>: 502-513 (doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.067)
- Moibi JA, Gupta D, Jetton TL, Peshavaria M, Desai R, Leahy JL. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-γ Regulates Expression of PDX-1 and NKX6.1 in INS-1 Cells. *Diabetes* 2007; <u>56</u>: 88-95 (doi: 10.2337/db06-0948)
- Molnár R, Madácsy T, Varga Á, Németh M, Katona X, Görög M et al. Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion. *Laboratory Investigation* 2020; <u>100</u>: 84-97 (doi: 10.1038/s41374-019-0300-3)
- Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2016; <u>65</u>: 1049-1061 (doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.014)
- Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg Chem* 2018; <u>77</u>: 548-567 (doi: 10.1016/j.bioorg.2018.02.009)
- Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; <u>4</u>: 525-536 (doi: 10.1016/s2213-8587(15)00482-9)
- Nishimura W, Iwasa H, Tumurkhuu M. Role of the Transcription Factor MAFA in the Maintenance of Pancreatic β-Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; <u>23</u>: 4478 (doi:
- Nissen S, Wolski K. Rosiglitazone Revisited An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. *Archives of internal medicine* 2010; <u>170</u>: 1191-1201 (doi: 10.1001/archinternmed.2010.207)
- Nussey S, Whitehead S. 2001. In: Endocrinology: An Integrated Approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers Copyright © 2001, BIOS Scientific Publishers Limited.
- Okopień B, Bułdak Ł, Bołdys A. Benefits and risks of the treatment with fibrates--a comprehensive summary. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018; <u>11</u>: 1099-1112 (doi: 10.1080/17512433.2018.1537780)
- Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith R et al. Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science (New York, N.Y.)* 2006; <u>313</u>: 1137-1140 (doi: 10.1126/science.1128294)
- Pavluch V, Engstová H, Špačková J, Ježek P. Deficiency of transcription factor Nkx6.1 does not prevent insulin secretion in INS-1E cells. *Scientific Reports* 2023; <u>13</u>: 683 (doi: 10.1038/s41598-023-27985-7)
- Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 2000; <u>20</u>: 5119-5128 (doi: 10.1128/mcb.20.14.5119-5128.2000)
- Po Sing Leung. The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas, 2010: p.
- Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008; <u>29</u>: 351-366 (doi: 10.1210/er.2007-0023)
- Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006; <u>116</u>: 1802-1812 (doi: 10.1172/JCl29103)

- Puri S, Hebrok M. Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell* 2010; <u>18</u>: 342-356 (doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.005)
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res* 2010; <u>2010</u>: (doi: 10.1155/2010/612089)
- 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; <u>123</u>: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)
- Reis-Barbosa PH, Mandarim-de-Lacerda CA. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor (SGLT2i) plus glucagon-like peptide type 1 receptor combination is more effective than SGLT2i plus dipeptidyl peptidase-4 inhibitor combination in treating obese mice metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Fundam Clin Pharmacol* 2024; <u>38</u>: 1059-1068 (doi: 10.1111/fcp.13024)
- Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007; <u>1771</u>: 926-935 (doi: 10.1016/j.bbalip.2007.02.013)
- Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E et al. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 2002; <u>16</u>: 2628-2644 (doi: 10.1210/me.2002-0036)
- Rukstalis JM, Habener JF. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets* 2009; <u>1</u>: 177-184 (doi: 10.4161/isl.1.3.9877)
- Rutter GA, Hodson DJ. Beta cell connectivity in pancreatic islets: a type 2 diabetes target? *Cell Mol Life Sci* 2015; <u>72</u>: 453-467 (doi: 10.1007/s00018-014-1755-4)
- Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opin Pharmacother* 2014; <u>15</u>: 493-503 (doi: 10.1517/14656566.2014.876992)
- Saleh M, Gittes GK, Prasadan K. Alpha-to-beta cell trans-differentiation for treatment of diabetes. *Biochem Soc Trans* 2021; <u>49</u>: 2539-2548 (doi: 10.1042/bst20210244)
- Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutr Metab* 2015; <u>66 Suppl 2</u>: 7-12 (doi: 10.1159/000375143)
- Shih DQ, Heimesaat M, Kuwajima S, Stein R, Wright CVE, Stoffel M. Profound defects in pancreatic β-cell function in mice with combined heterozygous mutations in <i>Pdx-1</i>, <i>Hnf-1</i>α, and <i>Hnf-3</i>β. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; <u>99</u>: 3818-3823 (doi: doi:10.1073/pnas.062605899)
- Siddiqui MS, Parmar D, Sheikh F, Sarin SK, Cisneros L, Gawrieh S et al. Saroglitazar, a Dual PPAR α/γ Agonist, Improves Atherogenic Dyslipidemia in Patients With Non-Cirrhotic Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pooled Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2023; <u>21</u>: 2597-2605.e2592 (doi: 10.1016/j.cgh.2023.01.018)
- Siersbæk MS, Ditzel N, Hejbøl EK, Præstholm SM, Markussen LK, Avolio F et al. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention. *Sci Rep* 2020; <u>10</u>: 14052 (doi: 10.1038/s41598-020-70765-w)
- Silva Júnior WS VC, Araujo-Neto JM, Godoy-Matos AF, Bertoluci M. . Doença hepática esteatótica metabólica (DHEM). Diretriz Oficial da Sociedade

Brasileira de Diabetes (2024). (*em impressão*, doi: 10.29327/5412848.2024-8): (doi: 10.29327/5412848.2024-8)

- Skandalakis LJ, Rowe JS, Jr., Gray SW, Skandalakis JE. Surgical embryology and anatomy of the pancreas. *Surg Clin North Am* 1993; <u>73</u>: 661-697 (doi: 10.1016/s0039-6109(16)46080-9)
- Son J, Accili D. Reversing pancreatic β-cell dedifferentiation in the treatment of type 2 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine* 2023; <u>55</u>: 1652-1658 (doi: 10.1038/s12276-023-01043-8)
- Souza-Mello V, Gregório BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarimde-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas* 2011; <u>40</u>: 715-722 (doi: 10.1097/MPA.0b013e3182153922)
- Souza-Tavares H, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Sandoval C, Santana-Oliveira DA, Silva-Veiga FM et al. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas. *World J Gastroenterol* 2023; <u>29</u>: 4136-4155 (doi: 10.3748/wjg.v29.i26.4136)
- Spezani R, Reis-Barbosa PH, Mandarim-de-Lacerda CA. Update on the transdifferentiation of pancreatic cells into functional beta cells for treating diabetes. *Life Sciences* 2024; <u>346</u>: 122645 (doi: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122645)
- Stirban AO, Andjelkovic M, Heise T, Nosek L, Fischer A, Gastaldelli A et al. Aleglitazar, a dual peroxisome proliferator-activated receptor-α/γ agonist, improves insulin sensitivity, glucose control and lipid levels in people with type 2 diabetes: findings from a randomized, double-blind trial. *Diabetes Obes Metab* 2016; <u>18</u>: 711-715 (doi: 10.1111/dom.12620)
- Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2007; <u>28</u>: 551-558 (doi: 10.1016/j.it.2007.09.003)
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; <u>56</u>: 2910-2918 (doi: 10.2337/db07-0767)
- Suda K, Nobukawa B, Takase M, Hayashi T. Pancreatic segmentation on an embryological and anatomical basis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 2006; <u>13</u>: 146-148 (doi: 10.1007/s00534-005-1039-3)
- Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; <u>44</u>: 645-651 (doi: 10.1016/0026-0495(95)90123-x)
- Teodoro JS, Varela AT, Rolo AP, Palmeira CM. High-fat and obesogenic diets: current and future strategies to fight obesity and diabetes. *Genes Nutr* 2014; <u>9</u>: 406 (doi: 10.1007/s12263-014-0406-6)
- Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 2010; <u>464</u>: 1149-1154 (doi: 10.1038/nature08894)
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; <u>6</u>: 772-783 (doi: 10.1038/nri1937)
- Tong J, Utzschneider KM, Carr DB, Zraika S, Udayasankar J, Gerchman F et al. Plasma pancreatic polypeptide levels are associated with differences in body fat distribution in human subjects. *Diabetologia* 2007; <u>50</u>: 439-442 (doi: 10.1007/s00125-006-0553-4)

- Vasques-Monteiro IML, Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Silva-Veiga FM, Daleprane JB, Souza-Mello V. Anti-steatotic effects of PPAR-alpha and gamma involve gut-liver axis modulation in high-fat diet-fed mice. *Mol Cell Endocrinol* 2024a; <u>585</u>: 112177 (doi: 10.1016/j.mce.2024.112177)
- Vasques-Monteiro IML, Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Silva-Veiga FM, Daleprane JB, Souza-Mello V. Anti-steatotic effects of PPAR-alpha and gamma involve gut-liver axis modulation in high-fat diet-fed mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2024b; <u>585</u>: 112177 (doi: https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112177)
- Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis* 2009; <u>8</u>: 25 (doi: 10.1186/1476-511x-8-25)
- Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in dietinduced obese mice. *Biochimie* 2017; <u>140</u>: 106-116 (doi: https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.003)
- Vilas-Boas EA, Almeida DC, Roma LP, Ortis F, Carpinelli AR. Lipotoxicity and β-Cell Failure in Type 2 Diabetes: Oxidative Stress Linked to NADPH Oxidase and ER Stress. *Cells* 2021; 10: (doi: 10.3390/cells10123328)
- Wagner R, Eckstein SS, Yamazaki H, Gerst F, Machann J, Jaghutriz BA et al. Metabolic implications of pancreatic fat accumulation. *Nature Reviews Endocrinology* 2022; <u>18</u>: 43-54 (doi: 10.1038/s41574-021-00573-3)
- Wang H, Iezzi M, Theander S, Antinozzi PA, Gauthier BR, Halban PA et al. Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells. *Diabetologia* 2005; <u>48</u>: 720-731 (doi: 10.1007/s00125-005-1692-8)
- Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci* 2013; <u>1281</u>: 92-105 (doi: 10.1111/nyas.12031)
- Wierzbicki AS. Fibrates: no ACCORD on their use in the treatment of dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol* 2010; <u>21</u>: 352-358 (doi: 10.1097/MOL.0b013e32833c1e74)
- Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020; <u>13</u>: 3611-3616 (doi: 10.2147/dmso.S275898)
- Yanai H, Adachi H. The Low-Dose (7.5 mg/day) Pioglitazone Therapy. *J Clin Med Res* 2017; <u>9</u>: 821-825 (doi: 10.14740/jocmr3144w)
- Ye J. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; <u>374</u>: 405-408 (doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.068)
- Zhang W, Chen M, Chen X, Segura BJ, Mulholland MW. Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 2001; <u>537</u>: 231-236 (doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0231k.x)
- Zhang X, Ha S, Lau HC, Yu J. Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities. *Semin Cancer Biol* 2023; <u>92</u>: 16-27 (doi: 10.1016/j.semcancer.2023.03.008)
- Zhu L, Rossi M, Doliba NM, Wess J. Beta-cell M(3) muscarinic acetylcholine receptors as potential targets for novel antidiabetic drugs. *Int Immunopharmacol* 2020; <u>81</u>: 106267 (doi: 10.1016/j.intimp.2020.106267)

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética

Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Agonistas duo ppar-alfa/gama na modulação do eixo adipoinsular, secreção de insulina e remodelamento das ilhotas pancreáticas" registrado com o nº 020/2022, sob a responsabilidade de Vanessa de Souza Mello - 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 09/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/08/2026
Espécie / linhagem / raça	Camundongos da linhagem C57BL/8
Nº de animais	120
Peso / Idade	20 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 09 de agosto de 2022.

Dr. Claudio C. Filgueiras Professor Associado Matr. 33080-3 Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

all abrun Villaco

Dra. Yael A. Villaça Professora Associada <u>Matr.</u> 35066-0 Vice Coordenadora CEUA/IBRAG/UERJ

http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO B – Publicações de artigos científicos resultantes da tese

 Received: 15 February 2024
 Revised: 20 April 2024
 Accepted: 20 April 2024

 DOI: 10.14814/phy2.16040
 0
 0
 0

METHODS ARTICLE

PHYSIOLOGICAL REPORTS #

Check for updates

Revisiting pancreatic islet isolation in murine models: A practical and effective technical protocol

Aline Fernandes-da-Silva¹ | Rosiane Aparecida Miranda² | Patricia Cristina Lisboa² | Vanessa Souza-Mello¹

¹Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Endocrine Physiology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Vanessa Souza-Mello, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomedico, Instituto de Biologia, Laboratorio de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular. Av 28 de Setembro 87 fds. 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Email: souzamello uerj@gmail.com

Funding information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Grant/ Award Number: E-26/200.914/2022 and E-26/200.984/2022; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant/ Award Number: 309507/2021-9 and 303785/2020-9 Abstract

The endocrine pancreas is composed of clusters of cell groups called pancreatic islets. These cells are responsible for the synthesis and secretion of hormones crucial for glycemic homeostasis, such as insulin and glucagon. Therefore, these cells were the targets of many studies. One method to study and/or understand endocrine pancreatic physiology is the isolation of these islets and stimulation of hormone production using different concentrations of glucose, agonists, and/or antagonists of specific secretagogues and mimicking the stimulation of hormonal synthesis and secretion. Many researchers studied pancreatic physiology in murine models due to their ease of maintenance and rapid development. However, the isolation of pancreatic islets involves meticulous processes that may vary between rodent species. The present study describes a simple and effective technical protocol for isolating intact islets from mice and rats for use as a practical guide for researchers. The method involves digestion of the acinar parenchyma by intraductal collagenase. Isolated islets are suitable for in vitro endocrine secretion analyses, microscopy techniques, and biochemical analyses.

KEYWORDS

endocrine pancreas, isolated islets, methodology, pancreatic islets



Journal of Endocrinology (2024) 264 e240180 https://doi.org/10.1530/JOE-24-0180

Received 11 June 2024 Accepted 22 October 2024 Available online 22 October 2024 Version of Record published 20 December 2024

RESEARCH

Dual PPAR-α/γ enhances beta cell identity, preserving islet structure in HF-fed mice

Aline Fernandes-da-Silva¹, Daiana Araujo Santana-Oliveira¹, Rosiane Aparecida Miranda², Henrique Souza-Tavares¹, Flávia Maria Silva-Veiga¹, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda¹ and Vanessa Souza-Mello¹

¹Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Centre, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil ²Laboratory of Endocrine Physiology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to V Souza-Mello vanessa.souza.mello@uerj.br or to souzamello.uerj@gmail.com

Abstract

The pancreas suffers from lipotoxicity, which threatens the survival of pancreatic islets. Dual peroxisome proliferatoractivated receptor-alpha/gamma (PPAR-a/y) agonism is a promising method for treating type 2 diabetes mellitus (T2DM). This study evaluated the effects of single PPAR-a and PPAR-y or their combined activation on pancreatic islet remodelling, beta cell proliferation, identity and maintenance in an experimental obesity model. Fifty three-month-old mice, randomly divided to receive the control (C) or high-fat (HF) diet for ten weeks, were then redivided for a four-week treatment: C, HF, HF-a (received the PPAR-α agonist), HF-g (received the PPAR-γ agonist pioglitazone) and HF-d (received PPAR-α/γ agonists). The HF group was overweight, had oral glucose intolerance, showed a proinflammatory adipokine profile, exhibited increased alpha and beta cell masses and showed islet gene expression compatible with compromised beta cell proliferation and favoured dedifferentiation. All treatments reduced body weight, mitigated oral glucose intolerance and produced an anti-inflammatory adipokine profile, which rescued islet cytoarchitecture and beta cell function. Principal component analysis (PCA) revealed a shift in the antiapoptotic gene Bcl2 and beta cell proliferation genes (Pax4 and Neurog3) in HF-a. Conversely, HF-g and HF-d benefited from the upregulation of genes related to beta cell function (Fgf21, Glut2 and Glp1r), identity and maintenance (Pdx1, Neurod1, Mafa and Nkx6.1). The HF mice were glucose intolerant, showing islet hypertrophy and low beta cell identity-related genes. In contrast, PPAR activation rescued islet structure, and PCA showed that the PPAR-a/y combination was the most effective treatment because it favoured beta cell function, identity and maintenance-related genes, halting the T2DM spectrum in diet-induced obese mice.

Keywords: endocrine pancreas; beta cell; high-fat diet; PPAR; low-dose pioglitazone; principal component analysis

ANEXO C - Publicações de artigos científicos em primeira autoria durante o doutorado

Molecular and Cellular Endocrinology 594 (2024) 112380

-17121247	Contents lists available at ScienceDirect	з MGE
	Molecular and Cellular Endocrinology	`Q`
ELSEVIER	journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce	a ⊭ ≟a

LDT409 (pan-PPAR partial agonist) mitigates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in high-fructose-fed mice

Aline Fernandes-da-Silva^{a,1}, Daiana Araujo Santana-Oliveira^{a,1}, Andressa S de Oliveira^{b,c}, Thaís A.M. Ferreira^{b,c}, Natália Cipriano Monteiro^{b,c}, Flávia Maria Silva-Veiga^a, Fabiane Ferreira Martins^a, Carolyn L. Cummins^d, Luiz Antonio Soares Romeiro^{b,c} Vanessa Souza-Mello

⁶ Laboreney of Morphowery, Merabahan, and Cardonescalar Direase, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Ele de Janeiro, Rio de Janeiro ⁸ Gedatase Program in Pharmacentation Sciences, Dapartment of Pharmacy, Holdri Sciences Faculty, University of Faculta, Beralia, BF, Brazil ⁴ Calorentary of Darmacentales Sciences, Laboration (LDT), Concer for Trapical Medicine, Faculty of Metricine, University of Elevine, Brazilia, Brazilia, Brazilia, ⁴ Department of Pharmace, University of Faculta ⁴ Department of Pharmacentales Sciences, London ⁴ Department of Pharmacentales Sciences, Laboration (LDT), Concer Sciences, ON, Canada aues, Diomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO	A B S T R A C T
Handling Editor: Carolyn M. Klinge Keynorda: Fractose MASED LIFT409 PPAR-Apha PPAR-Apha PPAR-Samma ER stress	Aire: This study sought to evaluate the effects of LDT409, a pan-PPAR partial agenist obtained from the main industrial wate from cashess nut processing, on hepatic remodeling, highlighting energy metabolism and endoplasmic reticutum (ER) steess in high-fructose-fud rice. Methods: Male CS78L/5 mice received a control dist (C) or a high-fructose dist (HFRU) for ten works. Then, a five-week treatment started: C, C-LDT409, HFRU, and HFRU-LDT409. The LDT409 (40 mg/kg of body weight) was mixed with the dists. Ready: The HFRU dist caused insulin resistance and endoplasmic reticulum (ER) stress. High Pparg and decreased Ppero expression increased statutes and pro-fibrogenic gene expression in livers of HFRU-fed mice. Suppressed lipogenic factors, urchestrated by PPAR-gamma, and mitigated ER stress concomizant with the in- crease in beta-oxidation driven by PPAR-galma. The LDT409 beneficial effects. Conclusion: LDT409 may represent a potential low-cost approach to treat metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, which does not currently have a specific treatment.

1. Introduction

The nutritional transition has increased household food consumption lately, especially fructose within processed food (Lustig et al., 2012). Fructose is a monosaccharide constituent of sucrose (β-D-Fructofuranosyl α-D-glycopyranoside) and other polymers such as inulin (Hannou et al., 2018), found predominantly in sweetened drinks, juices, and soft drinks and in corn syrup with high sweetening power and low commercial cost, being used on a large scale by the industry today (Baker et al., 2020).

Fructose metabolism promotes lactic acid production, gluconeogenesis, and de novo lipogenesis (Tappy et al., 2010). Excessive fructose intake causes great concern and has become a target of many studies,

showing harmful effects on liver beta-oxidation and mitochondrial Mowing intrinue energies of the balance of the second seco homeostasis (Apostolova et al., 2013), leading to proinflammatory signals due to unbalanced pathways regulated by transcription factors like peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Souza-Mello, 2015; Qiu et al., 2023).

PPARs regulate genes involved with carbohydrate and lipid meta bolism, and their three isoforms are expressed in the liver: PPAR-alpha, PPAR-beta, and PPAR-gamma (Souza-Mello, 2015; Qiu et al., 2023). PPAR-alpha activates the transcription of genes related to hepatic beta-oxidation, such as Cpt2a (Jegntheesan et al., 2015) and hepatic mitochondrial biogenesis (Ppargc1a) (Qian et al., 2024), while it represses proinflammatory genes like NJ-kb (Korbecki et al., 2019).

ANEXO D – Publicações de artigos científicos em colaboração durante o doutorado



1. Introduction

Obesity is a pandemic and a global health challenge (Green et al., 2020). Almost 60% of adults are overweight worldwide, causing more than 1.2 million deaths (Boutari et al., 2022). Among obesity's comorbidities, metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) relates to altered gut microbiota composition (dysbiosis) (Zhou et al., 2021).

High-fat diets (HFD) increase the plasma lipopolysaccharides (LPS) concentrations, an endotoxin that disrupts the tight junctions (TJ) and aggments intestinal permeability (Massushin et al., 2016). The influx of bacterial products, including LPS (endotoxemia), through the portal vein into the liver upregulates the transmembrane protein toll-like receptor 4 (TLR4), TLR4-LPS-CD14 complex aggregation triggers pro-inflammatory cytokines release (Clessickin et al., 2021), Germ-free mice that received fecal transplants from MAFLD mice developed this disease (Le Roy et al., 2013), highlighting the crucial role of gut microbiota in its pathogenesis. Moreover, the intestinal microbiota changes according to MAFLD severity (Eslamparast et al., 2014).

Against this backdrop, drugs that alleviate gut dysbiosis and dietinduced liver changes are pertinent, given the high prevalence and deleterious progression of obesity and that there is, to date, no treatment exclusive to MAFLD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) emerge as possible targets because they are transcription factors that modulate several biological processes disordered in obesity, including inflammation, ligid and glucose metabolism, and overall energy homeostasis (Gross et al., 2017). PPARs activation reduces body mass (BM) and insulin resistance, favoring mitochondrial beta-oxidation (Veiga et al., 2017). Conversely, total PPARs activation enhances insulin sensitivity, albeit with adipocyte hypertrophy and marked hepatic steatosis (Fnulob et al., 2012). Pioglitazone (10 mg/kg) did not reduce BM or rescue the neurovascular supply of brown adipocytes (Miranda et al., 2023).

The effects of low-dose pioglitazone or the combination of PPARa/ γ activation on the gut-liver axis are relevant and unprecedented in the





Journal of the American Nutrition Association

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/uacn21

Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice

Carolline Santos Miranda, Flávia Maria Silva-Veiga, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Gabrielle Carvalho Brito, Fabiane Ferreira Martins & Vanessa Souza-Mello

To cite this article: Carolline Santos Miranda, Flávia Maria Silva-Veiga, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Gabrielle Carvalho Brito, Fabiane Ferreira Martins & Vanessa Souza-Mello (2023) Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice, Journal of the American Nutrition Association, 42:5, 435-444, DOI: <u>10.1080/07315724.2022.2062686</u>

To link to this article: https://doi.org/10.1080/07315724.2022.2062686

Journal of Endocrinology A Santana-Oliveira et al.

259:1 e230123

RESEARCH

Exercise prevents obesity by reducing gut-derived inflammatory signals to brown adipocytes in mice

Daiana Araujo Santana-Oliveira¹⁰, Henrique Souza-Tavares¹⁰, Aline Fernandes-da-Silva¹⁰, Flavia Maria Silva-Veiga¹⁰, Gustavo Casimiro-Lopes²⁰, Patricia Cristina Lisboa³⁰, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda¹⁰ and Vanessa Souza-Mello⁹

¹Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil ²Department of Gymnastics, Physical Education and Sports Institute, Laboratory of Evercise Pathophysiology (LAFE), Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

Laboratory of Endocrine Physiology, Biology Institute, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to V Souza-Mello: vanessa.souza.mello@uerj.br

Abstract

Gut dysbiosis impairs nonshivering thermogenesis (NST) in obesity. The antiobesogenic effects of exercise training might involve the modulation of gut microbiota and its inflammatory signals to the brown adipose tissue (BAT). This study evaluated whether high-intensity interval training (HIIT) and moderate-intensity continuous training (MICT) prevent overweight through reduced gut-derived inflammatory signals to BAT in high-fatfed mice. Sixty male C57BL/6 mice (3 months old) comprised six experimental groups: control (C) diet group, C diet + HIIT (C-HIIT) group, C diet + MICT (C-MICT) group, high-fat (HF) diet group, HF diet + HIIT (HF-HIIT) group, and HF diet + MICT (HF-MICT) group. The protocols lasted for 10 weeks. HIIT and MICT restored body mass, mitigated glucose intolerance, and prevented hyperinsulinemia in HF-trained groups. A chronic HF diet caused dysbiosis, but HIIT and MICT prevented gut dysbiosis and preserved tight junction (TJ) gene expression. HF-HIIT and HF-MICT groups exhibited a similar pattern of goblet cell distribution, agreeing with the decreased plasma lipopolysaccharide concentrations and interscapular BAT (iBAT) Lbp-Cd14-Tir4 expression. The lowered NIrp3 and II16 in the HF-HITT and HF-MICT groups complied with iBAT thermogenic capacity maintenance. This study shows reliable evidence that HIIT and MICT prevented overweight by restoring the diversity of the gut microbiota phyla and TJ gene expression, thereby reducing inflammatory signals to brown adipocytes with preserved thermogenic capacity. Both exercise modalities prevented overweight, but HIIT rescued Zo-1 and Jam-a gene expression, exerting more potent anti-inflammatory effects than MICT (reduced LPS concentrations), providing a sustained increase in thermogenesis with 78% less distance traveled.

Key Words

- ► HIIT
- obesity
- exercise
- thermogenesis
- gut microbiota

Journal of Endocrinology (2023) **259. e230123**



An Acad Bras Cienc (2023) 95(Suppl. 2): e20220784 DOI 10.1590/0001-3765202320220784 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annois of the Brazilian Academy of Sciences Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

BIOMEDICAL SCIENCES

Long-term hepatic damage in high-fructose-fed C57BL/6 mice: hepatic fibrogenesis, endoplasmic reticulum stress markers, and fibrosis

BRENDA OLIVEIRA-CORDEIRO, ALINE FERNANDES-DA-SILVA, FLAVIA MARIA SILVA-VEIGA, CAROLLINE S. MIRANDA, FABIANE F. MARTINS & VANESSA SOUZA-MELLO

Abstract: The rising fructose intake in sugar-sweetened beverages and ultra-processed foods relates to the high incidence of nonalcoholic fatty liver disease. This study aimed to examine the effects of long-term high-fructose diet intake (for 16 or 20 weeks) on progressive hepatic damage, focusing on the endoplasmic reticulum stress markers and fibrogenesis as possible triggers of liver fibrosis. Forty 3-month-old male C57BL/6J mice were randomly divided into four nutritional groups: C16 (control diet for 16 weeks), C20 (control diet for 20 weeks), HFRU16 (high-fructose diet for 16 weeks), and HFRU20 (high-fructose diet for 20 weeks). Both HFRU groups showed oral glucose intolerance and insulin resistance, but only the HFRU20 group exhibited increased inflammation. The increased lipogenic and endoplasmic reticulum stress markers triggered hepatic fibrogenesis. Hence, time-dependent perivascular fibrosis with positive immunostaining for alpha-smooth muscle actin and reelin in HFRU mice was observed, ensuring fibrosis development in this mouse model. Our study showed time-dependent and progressive damage on hepatic cytoarchitecture, with maximization of hepatic steatosis without overweight in HFRU20 mice. ER stress and liver inflammation could mediate hepatic stellate cell activation and fibrogenesis, emerging as targets to prevent NAFLD progression and fibrosis onset in this dietary model.

Key words: fructose, NAFLD, hepatic fibrogenesis, ER stress, aging, hepatic stellate cell.



DOI: 10.3748/wjg.v29.i26.4136

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

REVIEW

Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas

Henrique Souza-Tavares, Carolline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Cristian Sandoval, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Flavia Maria Silva-Veiga, Aline Fernandes-da-Silva, Vanessa Souza-Mello

Specialty type: Biochemistry and molecular biology

Provenance and peer review: Invited article; Externally peer

reviewed. Peer-review model: Single blind

Peer-review report's scientific

quality classification

Grade A (Excellent): 0 Grade B (Very good): B Grade C (Good): C Grade D (Fair): 0 Grade E (Poor): 0

P-Reviewer: Morozov S, Russia; Wu QN, China

Received: April 21, 2023 Peer-review started: April 21, 2023 First decision: May 15, 2023 Revised: May 26, 2023 Accepted: June 13, 2023

Article in press: June 13, 2023 Published online: July 14, 2023 Henrique Souza-Tavares, Carolline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Flavia Maria Silva-Veiga, Aline Fernandes-da-Silva, Vanessa Souza-Mello, Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

Cristian Sandoval, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Salud, Universidad Santo Tomás, Osorno 5310431, Chile

Cristian Sandoval, Departamento de Ciencias Preclínicas, Universidad de la Frontera, Temuco 4780000, Chile

Corresponding author: Vanessa Souza-Mello, PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Blvd. 28 de setembro 87, fundos, Rio de Janeiro 20551030, Brazil. souzamello.uerj@gmail.com

Abstract

The world is experiencing reflections of the intersection of two pandemics: Obesity and coronavirus disease 2019. The prevalence of obesity has tripled since 1975 worldwide, representing substantial public health costs due to its comorbidities. The adipose tissue is the initial site of obesity impairments. During excessive energy intake, it undergoes hyperplasia and hypertrophy until overt inflammation and insulin resistance turn adipocytes into dysfunctional cells that send lipotoxic signals to other organs. The pancreas is one of the organs most affected by obesity. Once lipotoxicity becomes chronic, there is an increase in insulin secretion by pancreatic beta cells, a surrogate for type 2 diabetes mellitus (T2DM). These alterations threaten the survival of the pancreatic islets, which tend to become dysfunctional, reaching exhaustion in the long term. As for the ecular and Cellular Endocrinology 562 (2023) 111839



Molecular and Cellular Endocrinology

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



Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity

Carolline Santos Miranda^a, Flávia Maria Silva-Veiga^a, Aline Fernandes-da-Silva^a, Vitória Regina Guimarães Pereira^a, Bruna Cadete Martins^b, Julio Beltrame Daleprane^b, Fabiane Ferreira Martins^a, Vanessa Souza-Mello^{a,}

⁶Laboreney of Morphonetry, Metabalion and Cardioreacular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Braul ^b Laboreney for Studies of Interactions Between Martition and Genetics (LEING), Duritude of Martilon, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Braul

ARTICLEINFO	ABSTRACT
Handling Editor: Carolyn M. Klinge	Aire: To evaluate the effects of single PPARs or PPARy activation, and their synergism (combined PPARa/y activation) upon the set-adinose tissue axis. formine on the endotesamic and unstream intersemular between
Reprovit: brosen adipose tierme Whiteming PFAR Gat dysbiosis Endotoxernia Obesity	adipose tissue (BAT) function in high-saturated fat-fed mice. Mathods: Male C57BL/6 mice received a control diet (C, 10%) lipids) or a high-fat diet (HF, 50% lipids) for 12 works. Then, the HF proup was divided to receive the treatments for four works: HFY (pispiltacoust, 10 mg/kg), HFa (WT-4643, 3.5 mg/kg), and HFu/ (tes- glinzar, 4 mg/kg). Reache: The HF group exhibited overweight, ceal glucose intolerance, gut dysbiosis, altered gut persensibility, and endotoxensia, culminating in iBAT whitening. The downregolation of LP5-Th4 signaling underpined reduced inflammatics and improved lipid metabolism in iBAT in the HFu/y group, the unique to show normalized body mass and increased energy expenditure. Casclasion: PFARa/y synergism treated obesity by anteliceating the gat-adipose tissue axis, where restored gat microbiots and permeability controlled endo- trovernia and rescured BAT whitesing: through favored thermagenesis.

1. Introduction

Adipose tissue plays a central role in energy balance and, therefore, in obesity onset (Golozoubova et al., 2006). Of the three types of adipocytes exhibited by rodents, brown adipocytes are the major contributors to nonshivering thermogenesis through their unique ability to dissipate mitochondrial energy in the form of heat via uncoupling pro-

tein 1 (UCP1), located in the inner mitochondrial membrane, increasing energy expenditure (Nedergnard et al., 2001,Wu et al., 2013). Classic human brown adipocytes have molecular properties like ro-dent interscapular brown adipose tissue (IBAT), such as constitutive this interseptini totwa more association in the control of the expression of UCP1, homogeneous multilocalar morphology, and myogenic origin (MyfS⁺) (Giralt and Villarroya, 2013). However, in obesity, brown adipocytes undergo whitening, which entails vascular rarefaction, decreased adrenergies stimulus, and inflammation, leading to a white adipocyte phenotype with low UCP1 expression and reduced thermogenic capacity, characterizing brown adipocyte dysfunction

(Sh u et al., 2014; Shimizu and Walsh, 2015].

Recently, impairments of the gut-adipose tissue axis emerged as a possible whitening trigger. Several microorganisms populate in the digestive tract, predominantly bacteria from the Firmicutes and Bacteroldetes phyla, influenced by the qualitative diet composition (Matsushita et al., 2016). Excessive dietary saturated fat causes dysbiosis, with the predominance of gram-negative gut microbiota, which has lipopolysaccharides (LPS) as a component of their outer wall (Zhou et al., 2014). Gut dysbiosis compromises the integrity of the mucosa through changes in tight junctions (TJs) protein expression and increased intestinal permeability, resulting in LPS migration to other tissues (Matsushita et al., 2016). Thus, endotoxemia (high circulating levels of LPS) can cause brown adipose tissue dysfunction (whitening), reducing adaptive thermogenesis by activating the LPS-TLR4 (tall-like receptor 4) axis, with consequent inflammation-induced mitochondrial dysfunction and altered batokines secretion (Okla et al., 2015; Okla et al., 2018), Hence, the use of drugs that reverse dysbiosis, induce thermogenesis, and

Journal of Molecular Endocrinology

D A Santana-Oliveira, A Fernandes-da-Silva *et al.* Anti-obesity PPAR-alpha and DPP-4i effects 68:4 **225**-241

RESEARCH

A PPAR-alpha agonist and DPP-4 inhibitor mitigate adipocyte dysfunction in obese mice

Daiana Araujo Santana-Oliveira*, Aline Fernandes-da-Silva*, Carolline Santos Miranda, Fabiane Ferreira Martins, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda and Vanessa Souza-Mello

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

Correspondence should be addressed to V Souza-Mello: souzamello.uerj@gmail.com

*(D A Santana-Oliveira and A Fernandes-da-Silva contributed equally to this work)

Abstract

Obesity causes white and brown adipocyte dysfunction, reducing browning and stimulating whitening. Drugs that tackle adipocyte dysfunction through thermogenesis stimulation could be used to treat obesity. This study sought to address whether a combination of the PPAR-alpha agonist (WY14643) and DPP4i (linagliptin) potentiates browning and mitigates adipose tissue dysfunction, emphasizing the pathways related to browning induction and the underlying thermogenesis in high-fat-fed mice. Adult male C57BL/6 mice were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% lipids) or a high-fat diet (HF, 50% lipids) for 12 weeks. Experiment 1 aimed to evaluate whether 5 weeks of combined therapy was able to potentiate browning using a five-group design: C, HF, HFW (monotherapy with WY14643, 2.5 mg/kg body mass), HFL (monotherapy with linagliptin, 15 mg/kg body mass), and HFC (a combination of both drugs). Experiment 2 further addressed the pathways involved in browning maximization using a four-group study design: C, CC (C diet plus the drug combination), HF, and HFC (HF diet plus the drug combination). The HF group showed overweight, oral glucose intolerance, sWAT adipocyte hypertrophy, and reduced numerical density of nuclei per area of BAT confirming whitening. Only the combined treatment normalized these parameters in addition to body temperature increase, browning induction, and whitening rescue. The high expression of thermogenic marker genes parallel to reduced expression of inflammatory and endoplasmic reticulum stress genes mediated the beneficial findings. Hence, the PPAR-alpha agonist and DPP-4i combination is a promising target for obesity control by inducing functional brown adipocytes, browning of sWAT, and enhanced adaptive thermogenesis.

Key Words

- obesity
- PPAR-alpha
- DPP-4i
 browning
- thermogenesis
- ER stress

Journal of Molecular Endocrinology (2022) **68**, 225–241



Chapter 2. Metabolic Pathways Involved in the Beneficial Effects of HIIT in Rodent Models. Daiana Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Fabiane Ferreira Martins, Sandra Barbosa-da-Silva and Vanessa Souza-Mello – Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.



<section-header><text>

Chapter 2. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors: Beyond Glycemic Control. Fabiane Ferreira Martins, PhD, Daiana Santana-Oliveira, Aline Fernandes-da-Silva, Flávia Maria Silva-Veiga, PhD, and Vanessa Souza-Mello, PhD, Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Anatomy Department, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.

ADVANCES IN HEALTH AND DISEASE

<page-header><text><image>

