



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

Julie de Oliveira Alves Bittencourt

**Tirzepatida demonstra benefícios no remodelamento do tecido adiposo
marrom em camundongos ovariectomizados obesos e diabéticos**

Rio de Janeiro
2025

Julie de Oliveira Alves Bittencourt

Tirzepatida demonstra benefícios no remodelamento do tecido adiposo marrom em camundongos ovariectomizados obesos e diabéticos

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Aguila Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro
2025

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

B624 Bittencourt, Julie de Oliveira Alves

Tirzepatida demonstra benefícios no remodelamento do tecido adiposo marrom em camundongos ovariectomizados obesos e diabéticos / Julie de Oliveira Alves Bittencourt. – 2025.

60 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Aguila Mandarin de Lacerda

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

1. Tirzepatida – Farmacologia. 2. Termogênese – Efeitos dos fármacos – Teses. 3. Obesidade – Fisiopatologia – Teses. 4. Diabetes Mellitus – Metabolismo – Teses. I. Lacerda, Marcia Barbosa Aguila Mandarin de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-008.9

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Julie de Oliveira Alves Bittencourt

Tirzepatida demonstra benefícios no remodelamento do tecido adiposo marrom em camundongos ovariectomizados obesos e diabéticos

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

Aprovada em 24 de fevereiro de 2025

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Aguila Mandarin de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

Prof.^a Dra. Thereza Christina Lonzetti Bargut
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2025

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a ciência, pois ela que move o mundo.

AGRADECIMENTOS

Acredito que esta seja a parte mais fácil, aparentemente, e ao mesmo tempo muito difícil. Tentei começar o texto dos agradecimentos de diversas formas, confesso que a primeira coisa que veio na minha cabeça foi: minha família. Sem a base familiar nada disso seria possível, desta forma agradeço grandiosamente esse trabalho a vocês. Pai e mãe, Fernando e Flavia, vocês são minha maior motivação para continuar, gratidão. Minhas irmãs, Carolina e Bruna, agradeço por existirem pois ser a irmã mais velha me exige ser um modelo a ser seguido por vocês. Ao apoio fundamental do meu paidastro. Minha avó Lenita, meu padrinho Alexandre e minha madrinha Patrícia foram e são muito importantes nessa trajetória. Ron Greene, *my American dad, I don't have words to express what you have been doing to me, since always, thank you so much from all my soul*. Gostaria de agradecer também minha família de coração, Lucia e Iury, vocês foram essenciais na minha jornada. Minha avó Thereza gratidão por ser meu anjo de guarda e me dar forças para segurar as batalhas no caminho. Agradeço enormemente a Professora Márcia por ser minha mãe científica desde a graduação, obrigada pelo apoio de sempre e ainda despertar em mim a paixão pela corrida. Além disso, Professor Mandarin igualmente, é uma grande inspiração para mim e me ajudou muito nessa trajetória, só tenho a agradecer. Além disso, Thaty, não tenho palavras para te agradecer pela ajuda, tanto pela nossa amizade, como pelos puxões de orelha que foram super necessários para meu amadurecimento científico. Matheus Fabiano, meu melhor amigo e parceiro da anatomia, obrigada por todas as vezes que você se mostrou disponível para me auxiliar nas técnicas, como também por me escutar e me ajudar sempre. Thamyres Sales, obrigada “gata”, você, além de ter me auxiliado bastante no biotério, tornou-se uma grande amiga. As alunas de iniciação científica que me ajudaram demais no biotério: Andressa Dias, Anna Muniz, Tamires Bonifácio e Isabelle Carneiro. Aos meus parceiros de biotério: Ilitch e Thiago, sem vocês não teria sido tão leve como foi e, também, meus parceiros de laboratório: Renata Spezani, Renata Guarnieri, Lohayne Braga, Brenda Nagagata, Tamires Petito, Felipe Missiba Andrea Betoldo, Aline Penna e aos professores: Luiz Cardoso, Sandra Barbosa e Vanessa Mello. Obrigada família LMMC, vocês são demais.

RESUMO

BITTENCOURT, Julie de Oliveira Alves. **Tirzepatida demonstra benefícios no remodelamento do tecido adiposo marrom em camundongos ovariectomizados obesos e diabéticos**. 2025. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana Experimental) – Instituto de Biologia Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Este estudo investigou os efeitos da Tirzepatida (TZP) na termogênese do tecido adiposo marrom (TAM) interescapular em um modelo de camundongo obeso/diabético (Od) e menopausa induzida por ovariectomia (O). Oitenta camundongos fêmeas C57BL/6, com três meses, foram divididos em dois grupos principais: ovariectomia bilateral (**O**, n=40) e procedimento simulado (sham, n=40). Cada grupo foi subdividido e alimentado por 12 semanas com uma dieta controle (**C**) ou uma dieta rica em gordura e sacarose (**HFHS**), para indução da obesidade e diabetes (**Od**) (n=20/grupo). Após o período de indução, os animais foram tratados diariamente com TZP (**T**) (10 nmol/kg) por quatro semanas, formando oito grupos experimentais: C, CT, CO, COT, Od, OdT, OdO, OdOT (n=10/grupo). Na 16ª semana, os grupos Od e OdO apresentam maior massa corporal que seus controles e redução significativa na temperatura interescapular em comparação com seus respectivos controles, enquanto o tratamento com TZP reduziu a massa corporal e aumentou significativamente a temperatura nos grupos OdT e OdOT. A análise histológica do TAM interescapular mostrou sinais de branqueamento nos grupos Od e OdO, incluindo redução de adipócitos marrons multiloculados e aumento de adipócitos com características de adipócitos brancos. Essas alterações foram revertidas nos grupos tratados com TZP. A imunomarcagem e expressão proteica de UCP1 e B3AR, reduzidas nos grupos Od e OdO, apresentaram aumento significativo após o tratamento com TZP. No nível gênico, os grupos Od demonstraram maior expressão dos genes associados ao RE, enquanto os grupos tratados com TZP exibiram elevação nos níveis de genes termogênicos e de batocinas. A Análise de Componentes Principais (PCA) destacou a distinção dos grupos, agrupando Od e OdO em um eixo oposto ao dos grupos tratados com TZP. Em conclusão, a TZP sugere uma melhora na termogênese, aumento da temperatura interescapular e redução do estresse do RE no TAM, demonstrando possível eficácia no contexto de obesidade, diabetes e menopausa.

Palavras-chave: obesidade; diabetes mellitus tipo 2; menopausa; tecido adiposo marrom; termogênese.

ABSTRACT

BITTENCOURT, Julie de Oliveira Alves. *Tirzepatide leads to beneficial brown adipose tissue remodeling in obese diabetic ovariectomized mice*. 2025. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana Experimental) – Instituto de Biologia Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

This study investigated the effects of tirzepatide (TZP) on interscapular brown adipose tissue (BAT) thermogenesis in an obese/diabetic (Od) and ovariectomy-induced menopause (O) mouse model. Eighty-three-month-old female C57BL/6 mice were divided into two main groups: bilateral ovariectomy (O, n=40) and sham (n=40). Each group was subdivided and fed for 12 weeks with a control diet (C) or a high-fat, high-sucrose diet (HFHS) to induce obesity and diabetes (Od) (n=20/group). After the induction period, the animals were treated daily with TZP (T) (10 nmol/kg) for four weeks, forming eight experimental groups: C, CT, CO, COT, Od, OdT, OdO, OdOT (n=10/group). At week 16, the Od and OdO groups showed higher body mass than their controls and a significant reduction in body temperature compared to their respective controls, while TZP treatment reduced body mass and significantly increased temperature in the OdT and OdOT groups. Histological analysis of the interscapular BAT showed signs of whitening in the Od and OdO groups, including a reduction in multiloculated brown adipocytes and an increase in adipocytes with characteristics of white adipocytes. These changes were reversed in the TZP-treated groups. The immunostaining and protein expression of UCP1 and B3AR, reduced in the Od and OdO groups, showed a significant increase after TZP treatment. At the gene level, the Od groups demonstrated greater expression of ER-associated genes, while the TZP-treated groups exhibited an increase in the levels of thermogenic genes and batokines. Principal Component Analysis (PCA) highlighted the distinction of the groups, clustering Od and OdO on an axis opposite to that of the TZP-treated groups. In conclusion, TZP induces improved thermogenesis, increased body temperature, and reduced ER stress in BAT, demonstrating efficacy in the context of obesity, diabetes, and menopause.

Keywords: obesity; type 2 diabetes mellitus; menopause; brown adipose tissue; thermogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Obesidade: resultado da interação entre fatores genéticos, hormonais, comportamentais e sociais branqueamento.....	13
Figura 2	Esquema histológico dos três tipos de adipócitos e suas principais características branqueamento.....	15
Figura 3	Remodelamento do tecido adiposo marrom (TAM) no processo de branqueamento.....	16
Figura 4	Interações das incretinas GLP-1 e GIP no metabolismo.....	17
Figura 5	Procedimento cirúrgico de ovariectomia.....	20
Figura 6	Desenho e disposição dos grupos experimentais.....	22
Figura 7	Peso corporal e ganho ponderal dos grupos experimentais.....	30
Figura 8	Ingestão alimentar, ingestão energética e eficiência alimentar dos grupos experimentais.....	31
Figura 9	Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) pré e pós-tratamento dos grupos experimentais.....	33
Figura 10	Insulina plasmática, Índice de Resistência à Insulina (FIRi) e Índice de Sensibilidade à Insulina (QUICKi) dos grupos experimentais.....	34
Figura 11	Termografia nas semanas 12 e 16: imagens e fotos representativas dos grupos experimentais.....	35
Figura 12	Relação entre o tecido adiposo marrom (TAM) e o peso corporal dos grupos experimentais.....	36
Figura 13	Níveis plasmáticos de GIP, GLP-1, adiponectina e leptina dos grupos experimentais.....	38
Figura 14	Fotomicrografias representativas do tecido adiposo marrom (TAM) e expressão proteica de UCP-1 e B3-AR dos grupos experimentais.....	40
Figura 15	Expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM): Gp1r, Cidea e batocinas dos grupos experimentais.....	42
Figura 16	Expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM): indicadores de termogênese e estresse do retículo endoplasmático (RE) dos grupos experimentais.....	43
Figura 17	Análise multivariada de expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM) dos grupos experimentais.....	47

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Composição e conteúdo energético das dietas experimentais....	21
Tabela 2	Sequencia de iniciadores senso (forward) e antisenso (reverse) utilizados para quantificar a expressão de RNAm e suas vias correspondentes.....	27
Tabela 3	Análise de variância bidirecional mostrando os efeitos isolados e a interação entre a ovariectomia (Ovx) e o tratamento com tirzepatida (Tzp).....	45

LISTAS DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<i>Adrb3</i>	Adrenoceptor beta-3
B3AR	Receptor beta 3 adrenérgico (do inglês, beta-3 adrenergic receptor)
ACP	Análises de componentes principais
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição (do inglês, American Institute of Nutrition)
ASC	Área sobre a curva
<i>Atf4</i>	Fator de transcrição ativador 4 (do inglês, Activating transcription factor 4)
<i>Bmp8b</i>	Proteína morfogenética óssea 8 (do inglês, Bone morphogenetic protein 8b)
C	Controle
<i>Cidea</i>	Ativador de morte celular (do inglês, Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A)
CO	Controle ovariectomia
COT	Controle ovariectomia tirzepatida
CP	Componentes principais
CT	Controle tirzepatida
DCNT	Doença crônica não transmissível
<i>Ddit3</i>	Proteína homóloga C/EBP (do inglês, DNA damage inducible transcript 3)
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EA	Eficiência Alimentar
<i>Fgf21</i>	Fator de crescimento de fibroblastos 21 (do inglês, Fibroblast growth factor 21)
FIRi	Índice de resistência à insulina em jejum
<i>Gadd45a</i>	Parada do crescimento e proteína alfa induzível por dano ao DNA (do inglês, Growth arrest and DNA damage-inducible 45 alpha)
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose (do inglês, Gastric inhibitory polypeptide)
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (do Glucagon-like Peptide-1)
<i>Glp1r</i>	Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1
GP	Ganho de peso
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IA	Ingestão alimentar
IMC	Índice de massa corporal
MASLD	Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (do inglês, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease)

Od	Obeso diabético
OdO	Obeso diabético ovariectomia
OdOT	Obeso diabético ovariectomia tirzepatida
OdT	Obeso diabético tirzepatida
O ou Ovx	Ovariectomia
PC	Peso corporal
<i>Ppara</i>	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomo (do inglês, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha)
QUICKi	Índice quantitativo de sensibilidade à insulina
RE	Retículo endoplasmático
SNS	Sistema nervoso simpático
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
<i>Tbp</i>	Proteína de ligação a TATA (do inglês, TATA-box binding protein)
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
TZP	Tirzepatida
<i>Ucp1</i>	Proteína desacopladora 1
<i>Vegfa</i>	Fator de crescimento endotelial vascular A

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	OBJETIVOS.....	18
1.1	Gerais.....	18
1.2	Específicos.....	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1	Desenho experimental – animais e protocolo experimental.....	19
2.2	Peso Corporal (PC), Ganho Ponderal (GP), Ingestão Alimentar (IA) e Eficiência Alimentar (EA)	23
2.3	Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) e glicose em jejum.....	23
2.4	Termografia.....	23
2.5	Sacrifício dos animais e extração dos tecidos.....	24
2.6	Análises plasmáticas.....	24
2.7	Imunohistoquímica do TAM.....	24
2.8	Westen blotting.....	25
2.9	Extração e Análise de RNA do Tecido Adiposo Marrom (TAM).....	25
2.10	Análise de dados.....	28
3	RESULTADOS.....	29
3.1	Peso corporal, ingestão alimentar e energética e eficiência alimentar.....	29
3.2	Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	32
3.3	Termografia.....	34
3.4	Relação da massa de tecido adiposo marrom (TAM) pelo peso corporal.....	36
3.5	Análises plasmáticas.....	36
3.6	Avaliação Histológica e imunomarcção de UCP1 e B3-AR.....	38
3.7	Expressão gênica de marcadores termogênicos, batocinas e estresse do Retículo Endoplasmático.....	41
3.8	Efeito e interação de Ovx e Tzp nos resultados.....	44
3.9	Análise dos Componentes Principais.....	46
4	DISCUSSÃO.....	48
	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa.....	59
	ANEXO B – Submissão artigo.....	60

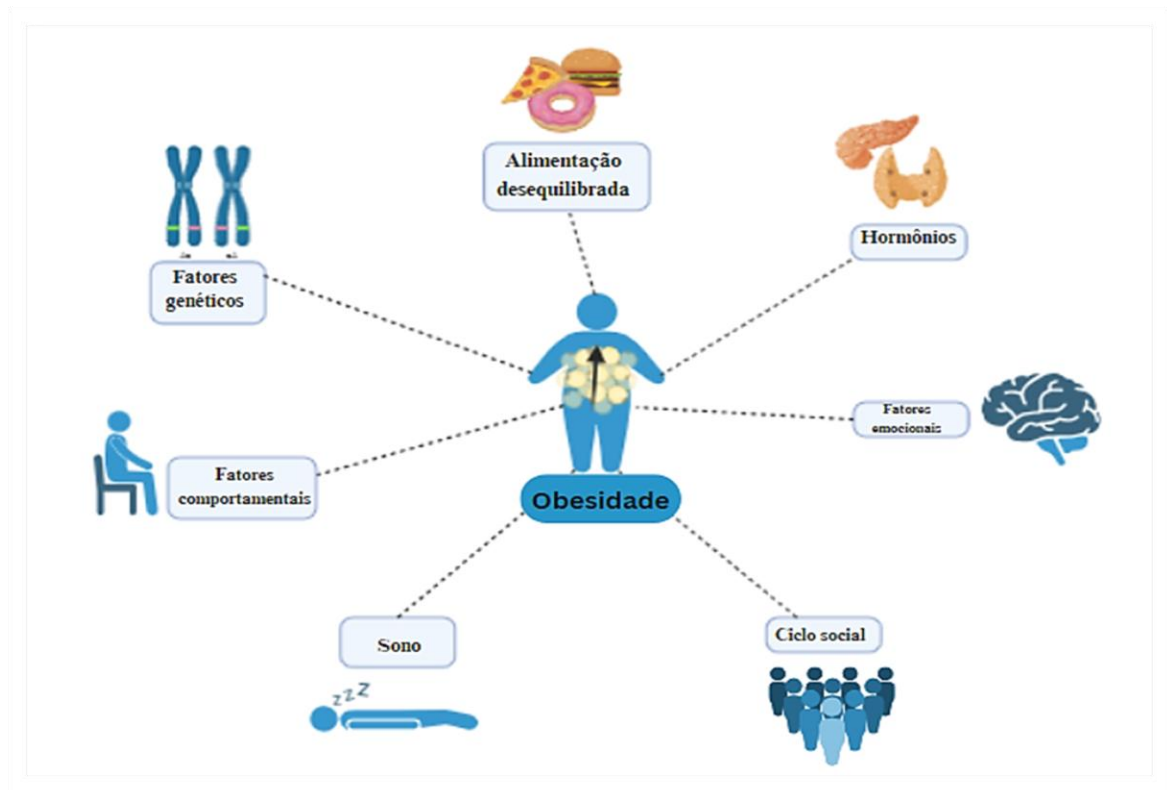
INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que compromete a saúde, sendo caracterizada também como uma condição inflamatória de baixo grau. Essa doença possui um caráter multifatorial, como ilustrado na Figura 1, com fatores associados aos hábitos alimentares, predisposição genética, ambiente, comportamento, entre outros, que podem contribuir para o seu desenvolvimento (1, 2). Classificada como uma doença crônica não transmissível (DCNT), a obesidade pode afetar indivíduos de todas as faixas etárias e não possui caráter contagioso (3). Dados epidemiológicos indicam um aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil ao longo dos anos, com percentuais mais elevados entre as mulheres(4). Em 2023, a prevalência de obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) foi de 24 % entre homens e 25 % entre mulheres no Brasil, evidenciando seu status como um problema de saúde pública tanto a nível nacional quanto globalmente (5). Para 2025, as projeções globais indicam que 2,3 bilhões de pessoas estarão acima do peso, das quais 700 milhões estarão obesas (6).

Essa condição patológica acarreta uma série de consequências adversas para a saúde (7). O acúmulo excessivo de tecido adiposo contribui para a deterioração do estado de saúde, sendo um fator precursor no desenvolvimento de diversas doenças metabólicas, como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (ou MASLD, do termo em inglês “*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*”), entre outras comorbidades amplamente documentadas na literatura (8). Nesse contexto, estudos focados no tratamento da obesidade tornam-se cada vez mais urgentes.

Entre as doenças associadas à obesidade, o DM2 destaca-se como uma condição crônica também classificada como DCNT. Seu desenvolvimento está intimamente relacionado ao estilo de vida, assim como a fatores genéticos e ambientais (9). A disfunção pancreática, em um primeiro momento, faz com esse órgão

Figura 1 - Obesidade: resultado da interação entre fatores genéticos, hormonais, comportamentais e sociais.



Legenda: A obesidade é uma doença multifatorial, influenciada por uma combinação de fatores genéticos, comportamentais, hormonais, emocionais e sociais. A imagem ilustra alguns dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento dessa condição. Fatores genéticos podem aumentar a predisposição individual à obesidade ao longo dos anos. Comportamentos alimentares disfuncionais e uma dieta desequilibrada podem intensificar o ambiente obesogênico. Disfunções hormonais em glândulas importantes no controle energético, como o pâncreas e a tireoide, também podem agravar o quadro de obesidade. Além disso, aspectos emocionais, relações sociais e qualidade do sono são fatores cruciais, tanto para o desenvolvimento quanto para a progressão da obesidade.

Fonte: Autora, 2025.

apresente secreção desbalanceada, hiperinsulinemia, e configura com hiperglicemia crônica, com isso, a longo prazo resulta em resistência à insulina (10). Esse quadro clínico dificulta a captação adequada de glicose pelas células, geralmente associado ao aumento de gordura visceral (11).

Os hábitos alimentares desempenham um papel crucial tanto no desenvolvimento quanto na manutenção e tratamento do DM2, sendo que dietas ricas em açúcares simples e gorduras saturadas, comumente presentes em alimentos ultraprocessados, estão associadas à progressão dessa doença (12).

Além dos fatores externos mencionados, que intensificam as condições de indivíduos com obesidade, fatores fisiológicos também podem agravar tanto o quadro de obesidade quanto o de DM2. A menopausa, uma condição natural nas mulheres, ocorre geralmente entre 45 e 55

anos e marca o fim da menstruação e da fertilidade (13). A transição para essa nova fase na saúde da mulher envolve alterações significativas na secreção de hormônios sexuais, especialmente a queda acentuada do estrogênio pelos ovários. A redução desse hormônio primariamente pelo eixo hipotálamo-hipófise, faz com que haja redução dos receptores do estrogênio e diminuição da foliculogênese, essas mudanças estão associadas a mudanças fisiológicas, emocionais, comportamentais e físicas (14). Esse fenômeno contribui para o agravamento do cenário obesogênico e aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, osteoporose e outras alterações metabólicas (15). Além disso, a redistribuição de gordura para a região abdominal intensifica ainda mais essa condição, tornando essa população uma prioridade para intervenções terapêuticas (13).

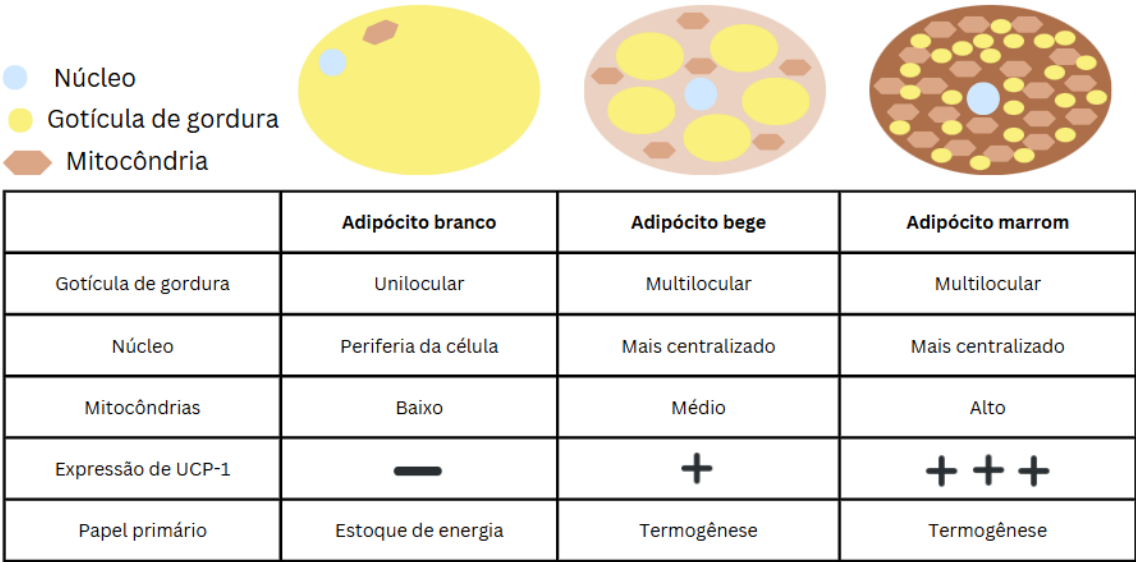
O tecido adiposo é caracterizado principalmente como um órgão de reserva energética, mas também desempenha um papel fundamental como órgão endócrino (16). Os adipócitos, as células principais que constituem esse tecido, além da fração vascular estromal, apresentam três fenótipos distintos: adipócito branco, adipócito bege e adipócito marrom (17). O tecido adiposo branco (TAB) é responsável pelo armazenamento energético e exerce uma função endócrina ao secretar adipocinas importantes, como adiponectina e leptina. Os adipócitos brancos apresentam uma morfologia unilocular, nas quais as inclusões de gordura são volumosas, deslocando os núcleos para a periferia da célula e apresentando um número reduzido de mitocôndrias (18). O adipócito bege, considerado intermediário entre os adipócitos mencionados, possui a mesma linhagem genética do TAB, mas quando estimulado, exibe características funcionais do tecido adiposo marrom (TAM) (19). Em contraste, o TAM é caracterizado pela termogênese e pela secreção de moléculas conhecidas como batocinas, como Vegfa, Bmp8b e Fgf21 (20). A morfologia do adipócito marrom é multilocular, com gotículas de gordura menos volumosas, um elevado número de mitocôndrias e núcleos centralizados, favorecendo sua função termogênica (21). Essas diferenças estão ilustradas na Figura 2.

No contexto da obesidade, observa-se um processo antagônico em que o TAM pode passar por um remodelamento desfavorável, denominado *whitening*, do português, branqueamento (22). Esse fenômeno resulta em alterações significativas na conformação histológica do TAM, que, originalmente, apresenta adipócitos multiloculares, tornando-se predominantemente unilocular e apresentando uma redução no número de mitocôndrias. Essas modificações comprometem substancialmente as funções termogênicas do TAM, impactando diretamente o metabolismo do indivíduo (23). A termogênese é um processo metabólico de produção de calor endógeno, podendo ser também induzida por alimentos, exercício físico ou medicamentos (24). Essas alterações são ilustradas na Figura 3. Em camundongos, o TAM

localiza-se predominantemente na região interescapular, embora também apresente depósitos nas regiões subescapular, cervical, periaórtica e perirrenal (25, 26).

Nesse contexto, as pesquisas voltadas para o tratamento da obesidade e do DM2 tornam-se essenciais, especialmente diante do aumento alarmante de casos de sobrepeso e obesidade em nível global. Embora mudanças no estilo de vida sejam consideradas a base para a melhoria no cenário obesogênico e diabetogênico, muitas vezes essas intervenções isoladas não se mostram suficientes (27). Portanto, é urgente considerar a inclusão de tratamentos farmacológicos concomitantes.

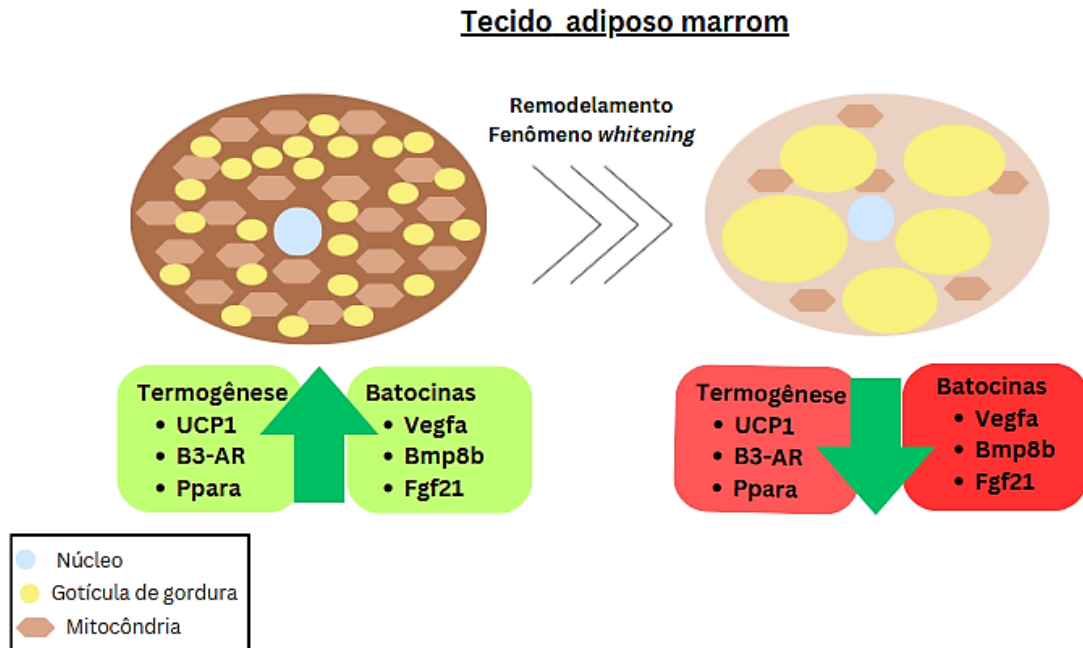
Figura 2 - Esquema histológico dos três tipos de adipócitos e suas principais características.



Legenda: Adipócito branco: Caracteriza-se pela presença de uma gotícula de gordura unilocular, com o núcleo deslocado para a periferia da célula e um baixo número de mitocôndrias. Sua função primária é o armazenamento de energia. Adipócito bege: Este tipo de adipócito é considerado intermediário entre o adipócito branco e o marrom. Sob estímulos específicos, pode desenvolver características funcionais do tecido adiposo marrom. Apresenta gotículas de gordura multiloculares, núcleo centralizado e um número médio de mitocôndrias, com expressão positiva de UCP-1, desempenhando papel na termogênese. Adipócito marrom: Composta por células multiloculares, este adipócito é fundamental para a termogênese. Possui múltiplas gotículas lipídicas menores, um elevado número de mitocôndrias e núcleos centralizados. A expressão positiva de UCP-1 favorece a produção de calor.

Fonte: a autora, 2025.

Figura 3 - Remodelamento do tecido adiposo marrom (TAM) no processo de branqueamento.



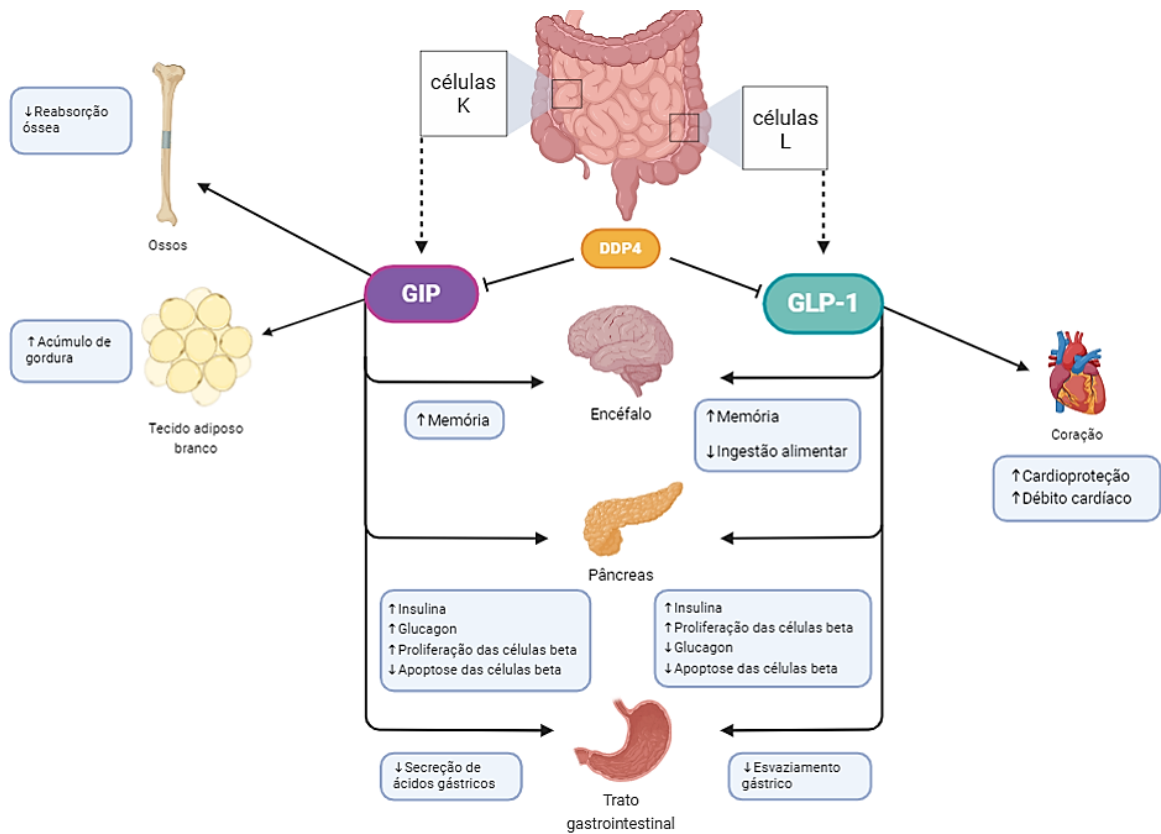
Legenda: Remodelamento do TAM no fenômeno de "branqueamento", onde adipócitos multiloculares se transformam em uniloculares, comprometendo as funções termogênicas. Esse processo é comum em contextos obesogênicos, nos quais o TAM perde suas características típicas, como multilocularidade dos lipídios e alta concentração mitocondrial, responsáveis pela sua coloração marrom e elevada capacidade termogênica, com expressão aumentada de UCP1, B3-AR e Ppara, além das batocinas (adipocinas marrons). Com a progressão da obesidade, o tecido passa a apresentar gordura em gotículas uniloculares, menor densidade mitocondrial e redução na expressão de UCP1, B3-AR, Ppara e batocinas, tornando-o similar ao tecido adiposo branco.

Fonte: Autora, 2025.

Os análogos do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) são os principais fármacos utilizados no manejo dessas condições, com destaque para a liraglutida e a semaglutida (28). Esses fármacos atuam ativando os receptores do GLP-1, resultando em efeitos benéficos no controle glicêmico, na perda de peso e na redução do apetite (29). A tirzepatida, um novo duplo agonista dos receptores de GLP-1 e do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), surge como uma inovação importante na indústria farmacêutica; essas duas incretinas são produzidas pelas células L e K intestinais, respectivamente (30). Essas moléculas desempenham funções em diversos órgãos, como o pâncreas, o cérebro e o trato gastrointestinal. Isoladamente, o GLP-1 demonstra efeitos cardioprotetores, enquanto o GIP contribui para a modulação da homeostase óssea e influencia o tecido adiposo branco (TAB), conforme ilustrado na Figura 4 (31). A sinergia entre essas moléculas desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo glicídico e lipídico, e a ação simultânea dos dois agonistas proporciona um impacto mais significativo na perda de peso, no metabolismo glicêmico e em outros órgãos afetados pelas consequências da obesidade. Isso sugere a necessidade de uma abordagem terapêutica multifacetada utilizando esses fármacos (32, 33).

Nesse contexto, a investigação do uso da tirzepatida no tratamento da obesidade associada ao DM2 e à menopausa apresenta-se como uma abordagem promissora na literatura científica. A hipótese central deste estudo é que a tirzepatida não apenas atua na redução do peso corporal, mas também pode potencializar a atividade termogênica do tecido adiposo marrom, mitigando assim as consequências adversas decorrentes da obesidade, DM2 e menopausa. Essa ação sinérgica pode resultar em melhorias significativas na homeostase metabólica e mulheres afetadas, abrindo novas perspectivas para o manejo clínico dessas condições inter-relacionadas.

Figura 4 - Interações das incretinas GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1) e GIP (polipeptídeo inibidor gástrico) no metabolismo



Legenda: O GLP-1 e o GIP atuam em órgãos comuns e distintos, desempenhando funções essenciais para o metabolismo energético e a homeostase glicídica. O GLP-1, secretado pelas células L do intestino em resposta à ingestão alimentar, age no sistema nervoso central reduzindo a ingestão de alimentos e estimulando a memória; no pâncreas, promove a secreção de insulina e proliferação de células beta, além de inibir a secreção de glucagon e a apoptose das células beta; no estômago, retarda o esvaziamento gástrico; e, no coração, aumenta o débito cardíaco e contribui para a cardioproteção. O GIP, secretado pelas células K do intestino em resposta a alimentos ricos em lipídios e carboidratos, também estimula a memória no sistema nervoso central; no pâncreas, aumenta a secreção de insulina, a proliferação de células beta e a liberação de glucagon, além de reduzir a apoptose das células beta; no estômago, diminui a secreção gástrica; no tecido adiposo, estimula o armazenamento de gordura; e no tecido ósseo, reduz a reabsorção óssea, favorecendo a saúde óssea.

Fonte: Autora, 2025.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Investigar os efeitos do tratamento com tirzepatida na morfologia e na via termogênica dos adipócitos marrons em um modelo de camundongos que apresenta obesidade, DM2 e menopausa.

1.2 Específicos

- a) Avaliar a evolução da massa corporal, a ingestão alimentar e a eficiência alimentar ao longo do tratamento com tirzepatida;
- b) Analisar o metabolismo de carboidratos, com ênfase nos níveis de glicose e insulina;
- c) Investigar a concentração de adipocinas, como adiponectina e leptina, em resposta ao tratamento;
- d) Descrever a multilocularidade dos adipócitos no TAM interescapular, refletindo a atividade termogênica e avaliar a imunomarcagem de anticorpos relacionados à termogênese;
- e) Monitorar a temperatura interescapular dos animais para avaliar o efeito termogênico associado ao tratamento;
- f) Analisar a expressão proteica de marcadores-chave envolvidos na termogênese;
- g) Avaliar os efeitos da tirzepatida no TAM, avaliando a expressão de genes relacionados à termogênese, batocinas e estresse do retículo endoplasmático.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental - animais e protocolo experimental

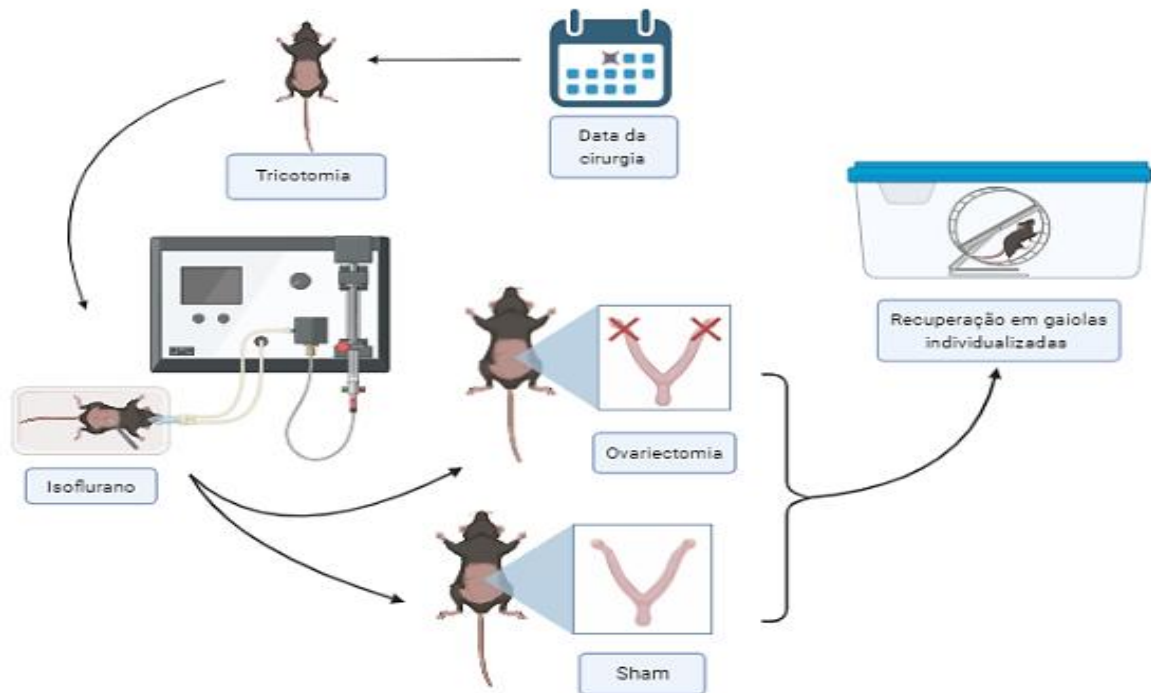
Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes estabelecidas para uso de animais em pesquisa científica, conforme estabelecido pelo National Institutes of Health (Pu. n° 85-23, revisado em 1996) e pelo National Academies Press (8ª edição, Washington, DC, 2011), bem como as recomendações ARRIVE 2.0. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (protocolo CEUA 018/2022).

Camundongos fêmeas C57BL/6 com três meses de idade (n=80) foram mantidas em estantes ventiladas (21 ± 2 °C, 60 ± 10 % umidade, ciclo claro-escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração (sistema NexGen, Allentown Inc., PA, EUA). Metade dos animais sofreu ovariectomia (O) com remoção bilateral dos ovários, conforme metodologia descrita (34). A outra metade dos animais foi submetida ao mesmo estresse cirúrgico (anestesia e abertura da parede abdominal), porém os ovários foram mantidos intactos (grupo sham).

A indução anestésica foi realizada com isoflurano a 3-4 %, sendo mantida a 1-2 % por um cone nasal, enquanto os animais foram acomodados em plataforma aquecida (39 °C) durante todo o procedimento. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais por 72 horas para recuperação (Figura 5). Após uma semana, os camundongos foram alocados em dois grupos principais, alimentados com dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica rica em sacarose (HFHS)

Nos grupos ovariectomizados (**O**), os ovários foram cauterizados e removidos, enquanto nos grupos sham, os ovários foram identificados sem que ocorresse ligadura do pedículo ovariano. Após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente por 72 horas para recuperação pós-operatória. Uma semana após o procedimento, os camundongos foram distribuídos em grupos alimentados com dieta controle ou com dieta hiperlipídica e rica em sacarose. A composição detalhada das dietas está apresentada na Tabela 1, sendo ambas formuladas conforme as diretrizes do American Institute of Nutrition para manutenção de roedores adultos (AIN93M) (35) e produzidas pela Pragsoluções (Jaú, São Paulo, Brasil), nesse primeiro momento do experimento haviam quatro grupos (n=60/grupo). Ao término da 12ª semana, os grupos foram novamente subdivididos para o início do período de tratamento, resultando em oito subgrupos (n=30/grupo), dos quais quatro eram grupos controle (C) e quatro grupos obeso-diabéticos (Od). O desenho experimental completo é apresentado na Figura 6.

Figura 5 - Procedimento cirúrgico de ovariectomia (Ovx)



Legenda: Cronograma detalhado do procedimento cirúrgico, com as etapas principais, incluindo as datas da cirurgia, tricotomia pré-operatória realizada algumas horas antes da intervenção, anestesia com isoflurano e execução das cirurgias Ovx ou Sham. Após a cirurgia, os animais foram alocados em caixas individuais para a recuperação pós-operatória.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas experimentais

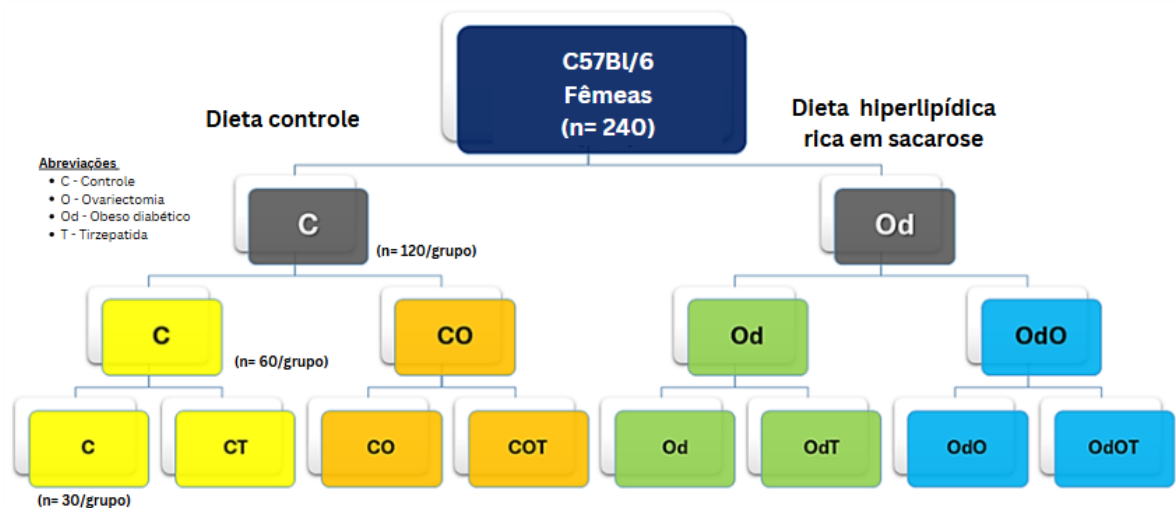
Ingredientes (g/kg)	Dietas por grupos	
	C	Od
Caseína (85% proteína)	140,0	160,0
Amido de milho	620,692	62,684
Sacarose	100,0	400,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	0,0	238,0
Fibra dietética	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,016
Total (g)	1000	1000
Energia (kJ/Kg)	16000	21000
Carboidrato (%)	76	36
Sacarose (%)	10	32
Proteína (%)	14	14
Lipídios (%)	10	50

Legenda: controle (C) e obeso-diabéticos (Od)

Fonte: a autora, 2025.

As abreviações dos grupos experimentais foram as seguintes: C (controle), CT (controle + tirzepatida), CO (controle + ovariectomia), COT (controle + ovariectomia + tirzepatida), Od (obeso-diabético), OdT (obeso-diabético + tirzepatida), OdO (obeso-diabético + ovariectomia) e OdOT (obeso-diabético + ovariectomia + tirzepatida). A tirzepatida, na forma de cloridrato (MCE, HY-P1731B/C-0107005, Med Chem Express, Monmouth Junction, NJ, EUA) foi administrado subcutaneamente em uma dose de 10 nmol/kg diariamente, diluída em um veículo (tampão Tris-HCl, pH 8,0, 40,0 mM). Nos grupos controle, os animais receberam apenas o veículo, uma vez ao dia, conforme protocolo estabelecido em estudo prévio com camundongos (36).

Figura 6 - Desenho e disposição dos grupos experimentais



Legenda: C (grupo controle), O (grupo ovariectomizado), Od (grupo obeso-diabético), T (grupo tratado com tirzepatida).

Fonte: a autora, 2025.

2.2 Peso Corporal (PC), Ganho Ponderal (GP), Ingestão Alimentar (IA) e Eficiência Alimentar (EA)

O peso corporal (PC) dos camundongos foi medido semanalmente usando uma balança digital de precisão, e o ganho ponderal (GP) foi calculado ao longo do período de tratamento, sendo feito a subtração do peso da semana 16 pelo peso da semana 12. A ingestão alimentar (IA) foi monitorada diariamente às 12 horas a.m., com base na diferença entre a quantidade inicial de ração fornecida e a quantidade remanescente na gaiola. A eficiência alimentar (EA) foi determinada pela razão entre ganho de PC em gramas e o consumo de ração, multiplicada por 100.

2.3 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e Glicose em Jejum

O TOTG foi realizado em dois momentos experimentais: após 12 semanas de indução de obesidade e DM2 (fase pré-tratamento) e após 4 semanas de tratamento com tirzepatida (fase pós-tratamento). Após um jejum de 6 horas, a glicemia basal foi medida no tempo 0. Em seguida, uma solução de glicose (2g/kg) foi administrada por gavagem orogástrica, e as medições de glicemia foram repetidas nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos, utilizando um glicosímetro Roche Accu Check. A Área Sob a Curva (ASC) foi calculada para comparação entre grupos, sendo todas as análises realizadas no software GraphPad Prism v.9.4.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Após o segundo momento do experimento, foram calculados o índice de resistência à insulina em jejum (FIRi), definido por $\{25 \div \text{Insulina (ui/ml)} \times (\text{Glicemia} - 3,5)\}$, para avaliação da resistência insulina (37), e o índice quantitativo de sensibilidade à insulina (QUICKi), definido por $1 / (\text{Log insulina} + \text{Log glicemia})$, para análise da sensibilidade à insulina (38).

2.4 Termografia

A temperatura interescapular foi medida na região interescapular de animais conscientes nas semanas 12 e 16, em temperatura ambiente, utilizando uma câmera termográfica FLIR C2 com sistema infravermelho (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA). As fotos foram tiradas a partir de 12h, para respeitar o ciclo dos animais, todos foram alocados em uma caixa de acrílico para garantir a mesma distância em todos e foram usados 5 animais por grupo com 10 fotos cada. Esse método permite a avaliação não invasiva e precisa da temperatura

interescapular, fornecendo informações importantes sobre a atividade termogênica na região de interesse.

2.5 Sacrifício dos Animais e Extração dos Tecidos

Ao final das 16 semanas, os animais, após um período de jejum de 6 horas, foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (3-4 %) e, posteriormente, eutanasiados por punção cardíaca, com administração prévia de Dalteparina sódica (Fragmin, 134 Pfizer, SP, Brasil) para heparinização. Amostras de sangue foram coletadas do ventrículo direito, centrifugadas à temperatura ambiente (712 xg, 15 minutos) e armazenadas para análises bioquímicas subsequentes. O TAM foi cuidadosamente dissecado, pesado e dividido em alíquotas, com armazenamento a -80°C para futuras análises moleculares. Fragmentos adicionais do TAM foram fixados em formaldeído recém-preparado a 4 % (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por 48 horas em temperatura ambiente, visando análises histológicas e imuno-histoquímicas.

2.6 Análises Plasmáticas

Os níveis de GIP, GLP1, leptina, insulina e estradiol plasmáticas foram quantificados utilizando imunoenaios multiplex para biomarcadores com tecnologia xMAP Luminex (Millipore, Billerica, MA, EUA, cat. #MMHMAG-44K). Para a determinação dos níveis de adiponectina, foi realizado um ensaio imunoenzimático específico (kit de adiponectina ELISA de rato #EZMADP-60K, Millipore, Missouri, EUA).

2.7 Imunohistoquímica do Tecido Adiposo Marrom (TAM)

O TAM passou pelo processamento histológico fixado em formaldeído e incluído em Paraplast, posteriormente, foram feitos cortes com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), os demais cortes foram incubados com anticorpos. As seções histológicas de TAM foram imunomarcadas para UCP1 e B3AR. Para tanto, as amostras foram submetidas a recuperação de antígeno (pH 6,0, 60 °C, por 20 minutos), seguidas de bloqueio de peroxidase e proteínas. Em seguida, foram incubadas overnight com anticorpos primários específicos para UCP1 (CSB141 PA025554ESR2HU, Cusabio; 1:100) e B3AR (SC1473, Santa Cruz; 1:100). Após o bloqueio pós-primário, a detecção foi realizada com o sistema de polímero

Novolink e diaminobenzidina (Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K, Leica Biosystems, Vista, CA, EUA), seguido de contracoloração com hematoxilina. As imagens digitalizadas das seções foram obtidas utilizando o microscópio Nikon 80i e a câmera DS-Ri1 (Nikon Instruments, Inc., Melville, Nova York, EUA) e objetiva 40x.

2.8 Western Blotting

As proteínas foram extraídas dos tecidos com esferas de vidro em tampão de lise, contendo coquetéis de inibidores de protease e fosfatase (P8340 e P0044, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Quantidades iguais de proteína total foram tratadas com tampão de amostra contendo SDS (Laemmli, Bio-Rad; Azul de Bromofenol e Beta Mercaptoetanol, Sigma-Aldrich) a 100 °C por 5 minutos, e então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por eletroblotting (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e as membranas bloqueadas em 5 % de BSA. A incubação foi realizada com os anticorpos primários: beta-actina (anti-mouse, SC81178, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), B3-AR (anti-goat, SC-1473, 1:500, Santa Cruz Biotechnology) e UCP1 (anti-rabbit, CSB-PA025554ESR2HU, 1:500, Cusabio, Houston, TX, EUA). A beta-actina serviu como proteína de referência para controle de carga. A detecção das proteínas foi realizada por eletroquimioluminescência, utilizando o sistema de imagem molecular ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e quantificada com o software ImageJ, versão 1.54f (NIH, EUA: imagej.nih.gov/ij).

2.9 Extração e Análise de RNA do Tecido Adiposo Marrom (TAM)

O RNA total do TAM foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA), seguido pelo tratamento de 1 µg de mRNA com DNase I (Invitrogen) para remover qualquer contaminante de DNA genômico. A integridade e pureza do RNA foram avaliadas com um espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). A síntese do cDNA foi realizada a partir do mRNA extraído, utilizando Oligo d(T) para a transcrição reversa. Para a quantificação da expressão gênica, o cDNA foi combinado com primers específicos para cada gene alvo e o SYBR Green Mix (Invitrogen, CA, EUA), e submetido à reação de PCR quantitativa (qPCR).

A expressão do gene da proteína de ligação TATA-box (Tbp) foi mensurada como gene de referência para a normalização do mRNA. Controles negativos foram incluídos substituindo o cDNA por água deionizada em poços específicos para garantir a especificidade das reações. O qPCR foi conduzido no sistema CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), e a amplificação dos sinais foi quantificada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, permitindo estimar as diferenças relativas de expressão entre os genes alvo e o controle endógeno. As sequências de primers para os genes de interesse (Glp1r, Fgf21, Vegfa, Ucp1, Adrb3, Bmp8b, Ppara, Cidea, Atf4, Ddit3, Gadd45a) foram projetadas com o software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência de iniciadores senso (forward) e antisenso (reverse) utilizados para quantificar a expressão de RNAm e suas vias correspondentes

Gene	Senso	Antisenso	Função
<i>Adrb3</i>	ACAGGAATGCCACTCCAATC	TTAGCCACAACGAACACTCG	Ativação da termogênese e estímulo de lipólise
<i>Atf4</i>	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC	Fator de transcrição associado ao estresse do retículo
<i>Bmp8b</i>	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG	Regulação da homeostase energética
<i>Cidea</i>	TGGTGGACACAGAGGAGTTC	GTGACTCTGGCTATTCCCGA	Termogênese e adaptação metabólica
<i>Chop</i>	CTGCCTTTCACCTTGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA	Via da apoptose durante o estresse do retículo
<i>Fgf21</i>	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	ATCCTCCCTGATCTCCAGGT	Aumenta gasto energético
<i>Gadd45</i>	GCGAGAACGACATCAACATC	GTTTCGTCACCAGCACACAGT	Estresse do retículo
<i>Glp1r</i>	ATACACACTGCTGGCCTTCT	ATAACGAACAGCAGCGGAAC	Receptor do Glp1
<i>Ppara</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA	Receptor envolvido com termogênese
<i>Tbp</i>	CAAACCTCTGACCACTGCACC	CTGCGGTACAATTCCAGAGC	Controle endógeno para extração do PCR
<i>Ucp1</i>	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC	Regula termogênese adaptativa
<i>Vefga</i>	CACGACAGAAGGAGAGCAGA	CACAGGACGGCTTGAAGATG	Angiogênese e resposta inflamatória

Legenda: Atf4, fator de transcrição ativador 4; Adrb3, receptor adrenérgico beta-3; Bmp8b, proteína morfogenética óssea 8B; Cidea, efator indutor de morte celular associado à fragmentação de dna, similar à subunidade alfa A; Chop, proteína homóloga C/EBP; Fgf21, fator de crescimento de fibroblastos 21; Gadd45, gene da proteína de parada de crescimento induzida por dano ao DNA; Glp1r, receptor de peptídeo semelhante ao glucagon-1; Ppar-alfa, receptor alfa do ativador da proliferação de peroxissomos; TBP, proteína de ligação à caixa TATA; UCP1, proteína desacopladora 1; VEGFa, fator de crescimento endotelial vascular A.

Fonte: a autora, 2025.

2.10 Análise dos Dados

Os dados foram avaliados utilizando o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade das distribuições, método indicado para amostras de menor tamanho, e o teste de Bartlett para avaliar a homocedasticidade. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre grupos foram analisadas por ANOVA bidirecional, com os fatores sendo ovariectomia (Ovx) e tratamento com Tirzepatida (Tzp), seguido do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Considerou-se um valor de $P < 0,05$ como estatisticamente significativo (GraphPad Prism v.10.4.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

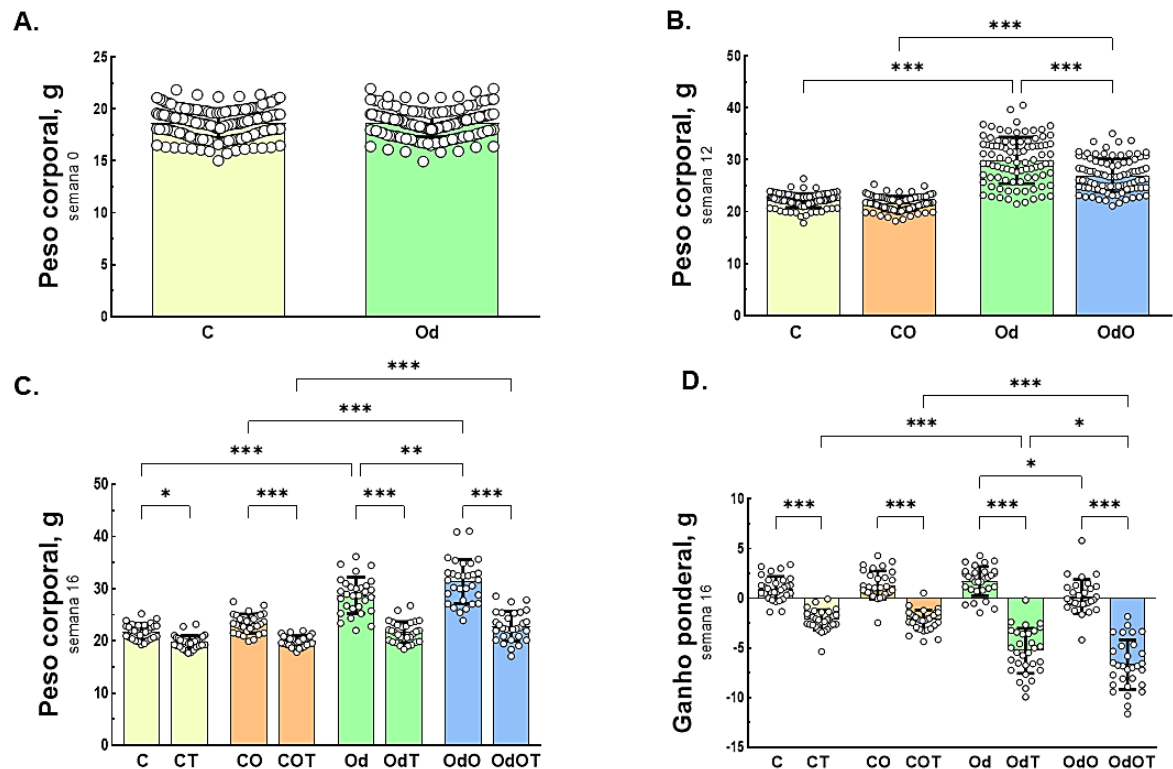
Para examinar associações entre termogênese, estresse do retículo endoplasmático (RE) e genes relacionados à batocina, foi realizada uma matriz de correlação. Adicionalmente, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para identificar padrões nos dados; componentes com autovalores $\geq 1,0$ foram retidos de acordo com o critério de Kaiser-Guttman, o que permitiu capturar a variação mais expressiva nos dados. Esta abordagem foi empregada para agrupar perfis semelhantes e diferenciar distintos grupos com base em condições de obesidade, DM2, Oxv e tratamento com Tzp, utilizando dados de expressão gênica (GraphPad Prism v.10.4.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Peso corporal, ingestão alimentar e energética e eficiência alimentar

No início do experimento (semana 0), não foram observadas diferenças significativas no peso corporal (PC) entre os grupos (Figura 7A). Entretanto, ao final da indução da obesidade (12^a semana), os grupos obesos/diabéticos mostraram um aumento significativo no PC em comparação aos respectivos grupos controle: C vs. Od (+25 %) e CO vs. OdO (+35 %). Além disso, o grupo OdO apresentou um PC superior ao do grupo Od (+11 %), indicando um efeito da ovariectomia sobre o PC (Figura 7B). Ao término do tratamento (16^a semana), todos os grupos tratados com tirzepatida apresentaram redução no PC em comparação aos grupos não tratados: C vs. CT (-9 %), CO vs. COT (-14 %), Od vs. OdT (-25 %), OdO vs. OdOT (-27 %). Por outro lado, os grupos obesos/diabéticos e ovariectomizados, mantiveram um PC elevado em relação aos grupos controle: C vs. Od (+31,5 %), CO vs. OdO (+34 %), COT vs. OdOT (+14 %) (Figura 7C). Para corroborar esses resultados, observou-se que o tratamento com tirzepatida durante as semanas 12 a 16, resultou em uma perda ponderal significativa: C vs. CT (-317 %), CO vs. COT (-266 %), Od vs. OdT (-408 %) e OdO vs. OdOT (-3616 %). É relevante destacar que, nos grupos obesos/diabéticos e ovariectomizados, a perda de peso foi mais acentuada em comparação com os grupos controle: CT vs. OdT (-144 %), COT vs. OdOT (-222 %), OdT vs. OdOT (+26 %) (Figura 7D). Esta análise dos resultados sugere que o tratamento com tirzepatida foi eficaz na redução do PC, especialmente em animais obesos/diabéticos e ovariectomizados. Esses achados ressaltam o potencial da tirzepatida como uma intervenção promissora para o controle do PC em condições associadas à obesidade e suas complicações metabólicas.

Figura 7 - Peso corporal e ganho ponderal dos grupos experimentais



Legenda: (A) Peso corporal na semana 0, (B) Peso corporal na 12ª semana, (C) Peso corporal na 16ª semana; (D) ganho ponderal durante o período de tratamento. Os grupos experimentais são definidos como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas por * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

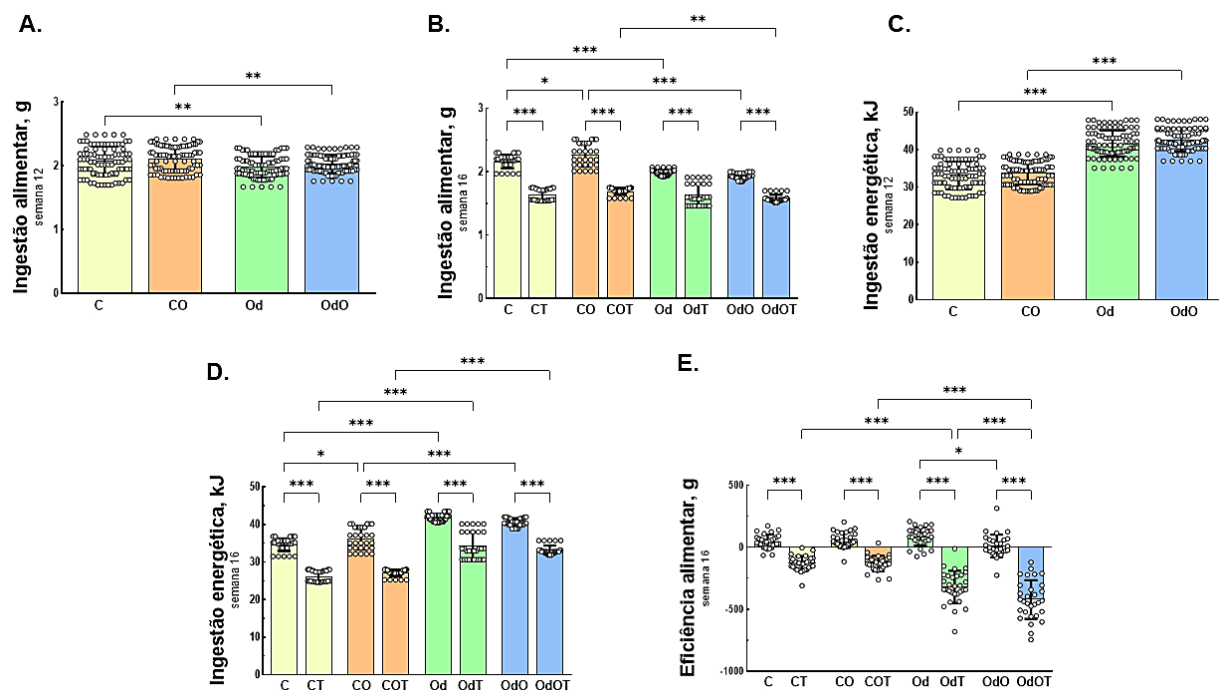
Fonte: a autora, 2025.

Na 12ª semana, a ingestão alimentar, expressa em gramas, foi menor nos grupos obesos/diabéticos: C vs. Od (-4 %), OdO vs. CO (-4 %) (Figura 8A). No entanto, esses grupos apresentaram uma maior ingestão de energia devido à maior densidade energética da dieta HFHS em comparação com a dieta controle: C vs. Od (+26 %) e CO vs. OdO (+25 %) (Figura 8C). Os dados sobre ingestão energética demonstraram que os grupos obesos/diabéticos e ovariectomizados consumiram mais energia, refletindo a natureza calórica da dieta HFHS.

Na 16ª semana, os grupos tratados com tirzepatida mostraram uma redução na ingestão alimentar em relação aos grupos controle não tratados: C vs. CT (-24 %), CO vs. COT (-26 %), Od vs. OdT (-18 %), OdO vs. OdOT (-18 %). De maneira geral, os animais submetidos à dieta HFHS consumiram menos ração em comparação aos seus grupos controle: C vs. Od (-4 %), CO vs. OdO (-15 %), embora os animais do grupo CO tenham ingerido mais do que os do grupo C (+5 %) (Figura 8B). Em relação à ingestão energética, observou-se uma diminuição significativa nos animais tratados com tirzepatida: C vs. CT (-24 %), CO vs. COT (-25 %), Od

vs. OdT (-18 %) e OdO vs. OdOT (-18 %). Em contrapartida, a ingestão energética aumentou nos animais que receberam a dieta HFHS: C vs. Od (+21 %), CO vs. OdO (+12 %), CT vs. OdT (+31 %) e COT vs. OdOT (+23 %) (Figura 8D). Além disso, a eficiência alimentar apresentou uma queda acentuada nos grupos tratados com tirzepatida em comparação com os grupos controle: C vs. CT (-390 %), CO vs. COT (-328 %), Od vs. OdT (-475 %) e OdO vs. OdOT (-4316 %) (Figura 8E). Esses resultados indicam que o tratamento com tirzepatida influenciou tanto a ingestão alimentar quanto a eficiência alimentar, resultando em uma redução significativa no consumo de alimentos.

Figura 8 - Ingestão alimentar, ingestão energética e eficiência alimentar dos grupos experimentais.



Legenda: (A) Ingestão alimentar na 12ª semana; (B) Ingestão alimentar na 16ª semana; (C) Ingestão energética na 12ª semana; (D) Ingestão energética na 16ª semana; (E) Eficiência alimentar durante o período de tratamento. Os grupos experimentais são definidos como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são indicadas por * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: a autora, 2025.

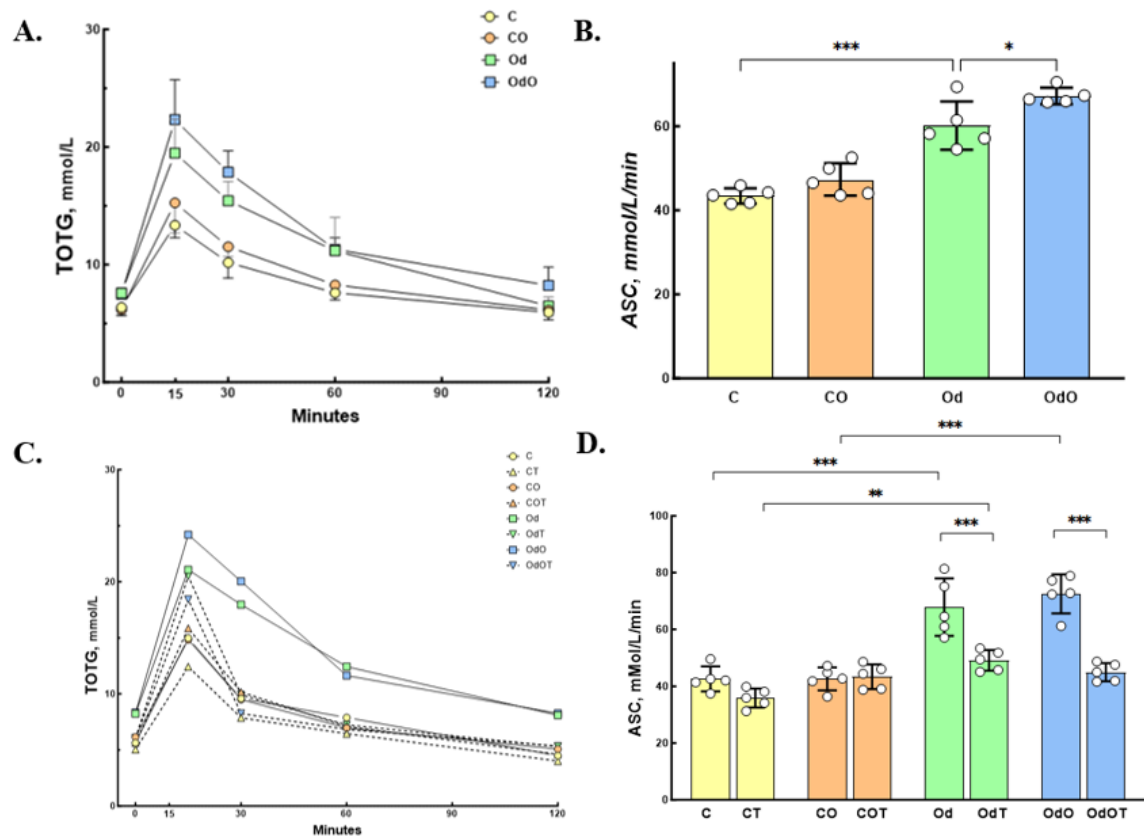
3.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Na 12^a semana, a área sob a curva (ASC) do TOTG revelou que o grupo Od apresentou intolerância à glicose em comparação ao grupo controle: C vs. Od (+38,4). O grupo OdO demonstrou uma ASC significativamente maior em relação ao grupo Od (+12 %) (Figuras 9A-B). Esses resultados sugerem que a ovariectomia e a obesidade desempenha, papéis importantes na deterioração da resposta glicêmica.

Na 16^a semana, os animais obesos/diabéticos (OdT) e obesos/diabéticos e ovariectomizados (OdOT) tratados com tirzepatida mostraram uma redução na intolerância à glicose em comparação com os grupos não tratados: Od vs. OdT (-28 %) e OdO vs. OdOT (-39 %). Contudo, as ASC dos grupos continuaram elevadas: C vs. Od (+59 %), CO vs. OdO (+70) e CT vs. OdT (+37 %), evidenciando que a ingestão da dieta HFHS teve um impacto significativo na resposta glicêmica (Figura 9C-D). Esses resultados enfatizam que o tratamento com tirzepatida melhorou a resposta à glicose nos grupos obesos/diabéticos e ovariectomizados. No entanto, a dieta HFHS ainda teve um impacto significativo na resposta glicêmica, evidenciando a complexidade das interações entre tratamento farmacológico e dieta na regulação metabólica dessas condições. Assim, é fundamental considerar não apenas o tratamento farmacológico, mas também fatores dietéticos ao avaliar a resposta glicêmica em condições relacionadas à obesidade e DM2.

Os dados de insulina plasmática dos animais submetidos à dieta HFHS corroboram com os resultados do TOTG (Figura 10A), mostrando hiperinsulinemia em comparação aos controles: C vs. Od (+78,8 %) e CO vs. OdO (+142 %). Ao comparar Od vs. OdO, observou-se que a ovariectomia possivelmente contribuiu para um aumento na secreção de insulina, resultando em um aumento de 52 %. Os animais obesos/diabéticos tratados com tirzepatida também apresentaram melhora nesse parâmetro: Od vs. OdT (-54 %) e OdO vs. OdOT (-47 %).

Figura 9 - Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) pré e pós-tratamento dos grupos experimentais



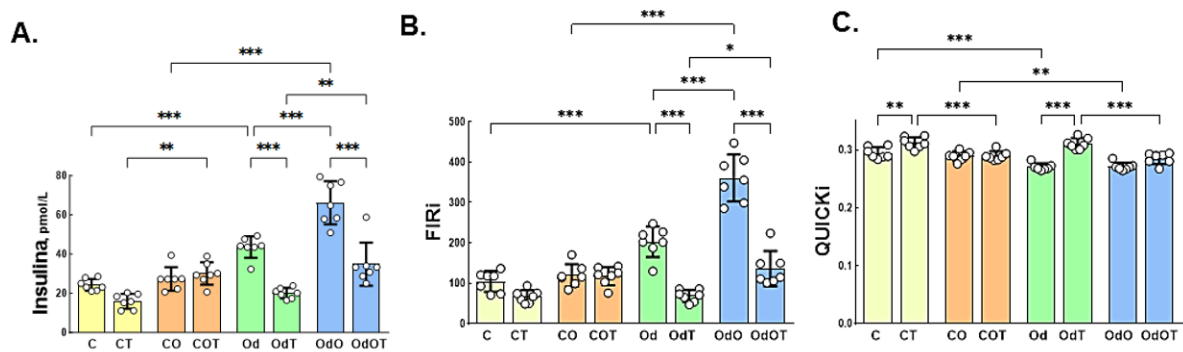
Legenda: (A) Curva glicêmica do TOTG na 12ª semana; (B) Área Sob a Curva (ASC) total na 12ª semana; (C) Curva glicêmica do TOTG na 16ª semana; (D) ASC total na 16ª semana. Os grupos experimentais são designados como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: a autora, 2025.

Ao analisar o FIRi, constatou-se que os grupos Od e OdO apresentam resistência à insulina em comparação aos seus respectivos controles: C vs. Od (+94,2 %), CO vs. OdO (+202 %) O padrão observado é semelhante ao da insulina ao comparar Od vs. OdO (+78 %), ressaltando a influência da ovariectomia e a melhora observada com o tratamento com tirzepatida: Od vs. OdT (-66 %) e OdO vs. OdOT (-62 %) (Figura 10B).

Em relação a sensibilidade à insulina, o QUICKi apresentou resultados semelhantes ao FIRi, com as seguintes comparações: C vs. Od (-8,16 %) e CO vs. OdO (-6 %). Observou-se uma melhora neste parâmetro com a administração de tirzepatida: C vs. CT (+6 %) e Od vs. OdT (+15 %) (Figura 10C).

Figura 10 - Insulina plasmática, Índice de Resistência à Insulina (FIRi) e Índice de Sensibilidade à Insulina (QUICKi) dos grupos experimentais



Legenda: (A) Insulina plasmática; (B) FIRi; (C) QUICKi. Os grupos experimentais são designados como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Fonte: a autora, 2025.

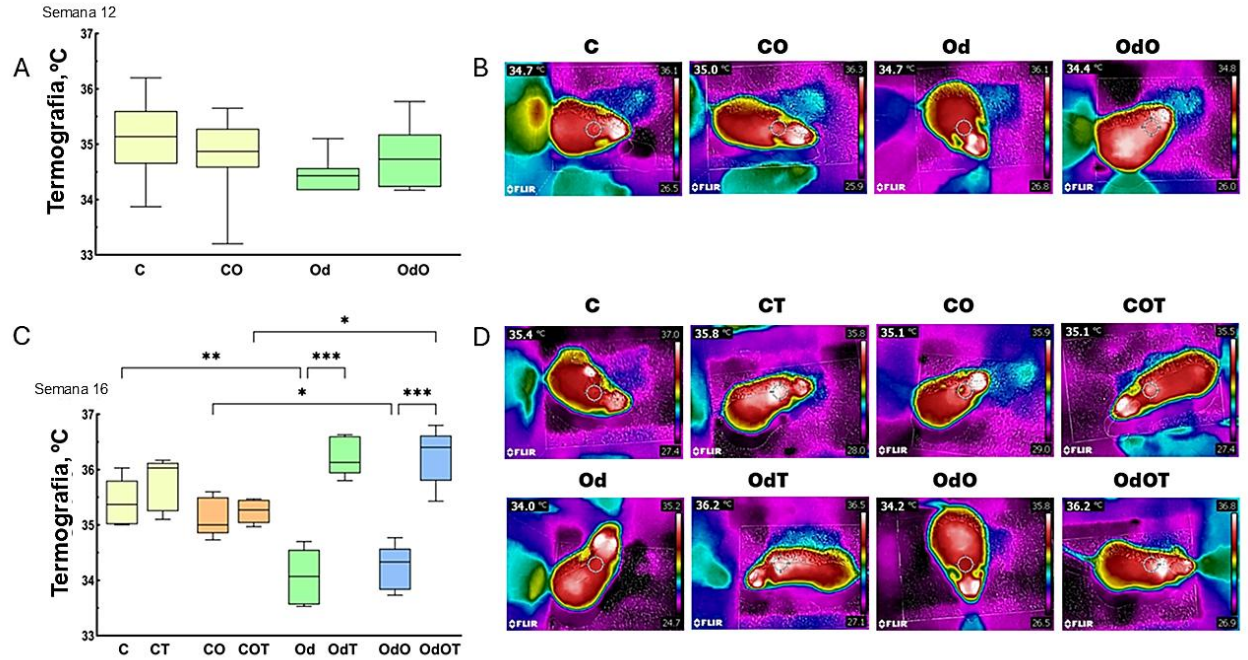
3.3 Termografia

Na 12ª semana, a análise termográfica não mostrou diferenças significativas entre os grupos. No entanto, na 16ª semana, houve uma redução na temperatura interescapular nos grupos Od e OdO em comparação com seus respectivos grupos controle: C vs. Od (-4 %) e CO vs. OdO (-3 %) (Figura 11A-B). Por outro lado, os animais tratados com tirzepatida apresentaram um aumento na temperatura interescapular em relação aos grupos controle não tratados: Od vs. OdT (+6 %), OdO vs. OdOT (+6 %) e entre os grupos COT vs. OdOT (+3 %) (Figura 11C-D).

Esses resultados sugerem que o tratamento com tirzepatida influenciou positivamente a temperatura interescapular nos grupos obesos/diabéticos e ovariectomizados. No entanto, a redução na temperatura observada nos grupos Od e OdO pode indicar uma resposta metabólica diferenciada associada à ovariectomia e à obesidade, a qual pode ser atenuada pelo tratamento com tirzepatida.

Figura 11 - Termografia nas semanas 12 e 16: imagens e fotos representativas dos grupos experimentais

Legenda: (A) Termografia na 12ª semana; (B) Fotos representativas da termografia dos grupos na 12ª semana; (C)



Termografia 16ª semana; (D) Fotos representativas da termografia dos grupos na 16ª semana. Os grupos experimentais são designados como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

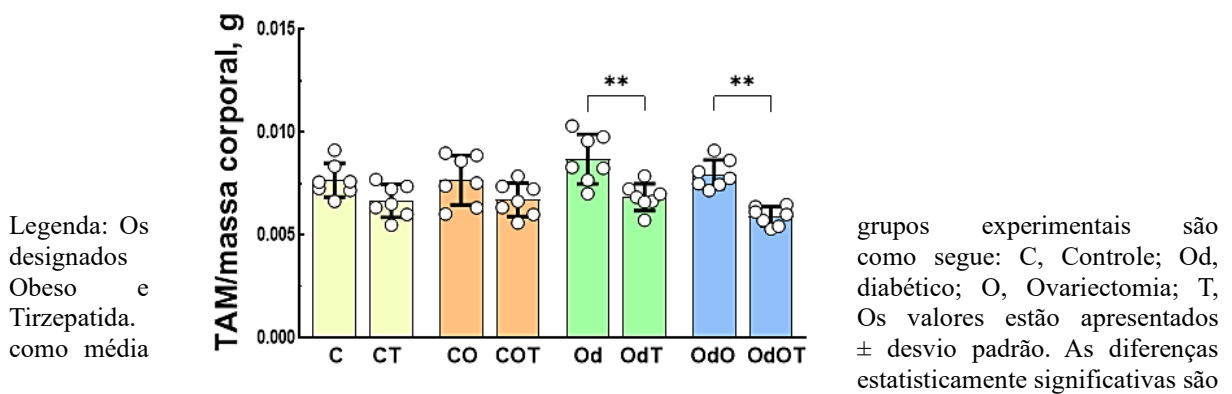
Fonte: a autora, 2025.

3.4 Relação da massa de tecido adiposo marrom (TAM) pelo peso corporal

A relação da massa do TAM pelo peso corporal foi significativamente menor nos grupos tratados com tirzepatida: Od vs. OdT (-22 %) e OdO vs. OdOT (-25 %) (Figura 12). Esse resultado sugere que o aumento da massa do TAM não está diretamente relacionado ao aumento da termogênese, uma vez que o grupo **Od** apresenta um peso corporal maior. É possível que o TAM esteja passando por um processo de remodelamento, indicando um possível *branqueamento*, enquanto nos grupos tratados com tirzepatida, pode estar ocorrendo uma ativação do TAM. Esse fenômeno está alinhado com as observações feitas nas Figuras 11C e 11D, onde a temperatura interescapular do TAM parece estar intrinsicamente relacionada ao aumento da termogênese.

Essa interpretação dos dados sugere que a tirzepatida pode estar influenciando não apenas na redução do peso corporal, mas também na ativação do TAM, o que pode contribuir para um aumento na termogênese e, conseqüente, para a perda de peso. Esses achados são relevantes para compreender os mecanismos pelos quais a tirzepatida exerce seus efeitos metabólicos e podem fornecer *insights* importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas ao controle da obesidade e suas complicações.

Figura 12 - Relação entre o tecido adiposo marrom (TAM) e o peso corporal dos grupos experimentais.



3.5 Análises plasmáticas

Os níveis plasmáticos de Estradiol estavam significativamente reduzidos nos grupos que foram ovariectomizados (CO vs. C, -83%; OdO vs. Od, -84%; OdOT vs. OdT, -86%; COT vs.

CT, -84%) corroborando a eficácia da cirurgia para induzir a menopausa, inclusive os animais obesos diabéticos não ovariectomizados apresentaram redução quando comparados ao controle (Od vs. C, -26%), o que sugere mais um efeito deletério da obesidade e DM2.

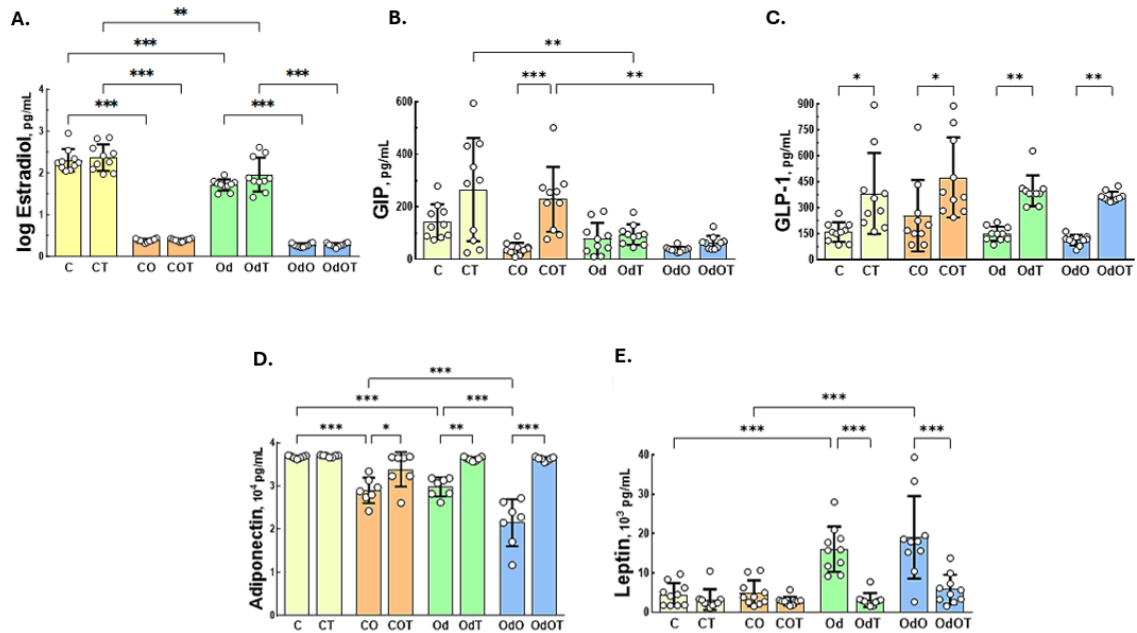
Os níveis plasmáticos de GIP mostraram diferenças significativas entre os grupos: CT vs. OdT (-71 %), CO vs. COT (+86 %) e COT vs. OdOT (-72 %) (Figura 13B). Essas variações nos níveis plasmáticos de GIP entre os grupos indicam que a tirzepatida pode ter efeitos regulatórios complexos sobre a secreção de hormônios gastrointestinais, ressaltando a importância de compreender seus mecanismos de ação e seu potencial terapêutico em diversas condições metabólicas.

Em relação às concentrações de GLP-1, todos os grupos tratados com tirzepatida tiveram maiores concentrações de GLP-1 em comparação com seus respectivos grupos controle não tratados: C vs. CT (+141 %), CO vs. COT (+86 %), Od vs. OdT (+167 %), OdO vs. OdOT (+224 %) (Figura 13C).

Os níveis plasmáticos de adiponectina foram menores nos animais que apresentavam pelo menos um insulto, como obesidade/DM2 e/ou ovariectomia, em comparação com seus grupos controles: C vs. CO (-23 %), C vs. Od (-18 %), CO vs. OdO (-28 %), Od vs. OdO (-33 %). No entanto, o tratamento com tirzepatida aumentou os níveis de adiponectina nos grupos tratados: CO vs. COT (+20 %), Od vs. OdT (+21 %), OdO vs. OdOT (+80 %) (Figura 13D).

Quanto à leptina, os animais obesos/diabéticos e ovariectomizados apresentaram hiperleptinemia em comparação com seus grupos controle: C vs. Od (+388 %) e CO vs. OdO (+199 %). No entanto, o tratamento com tirzepatida foi capaz de reduzir significativamente a concentração plasmática de leptina: Od vs. OdT (-85 %) e OdO vs. OdOT (-77 %) (Figura 13E).

Figura 13 - Níveis plasmáticos de Estradiol, GIP, GLP-1, adiponectina e leptina dos grupos experimentais



Legenda: Os grupos experimentais são designados como segue: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fonte: a autora, 2025.

3.6 Avaliação Histológica e imunomarcção de UCP1 e B3AR

A análise das fotomicrografias de cortes do TAM corados com hematoxilina e eosina (HE) (Figura 14A) revelou diferenças marcantes entre os grupos estudados. Nos animais dos grupos Od e OdO, houve um aumento pronunciado de gotículas de gordura, indicando um fenótipo de adipócito branco, um fenômeno conhecido como branqueamento. Esse fenômeno representa a transformação do TAM em tecido adiposo branco.

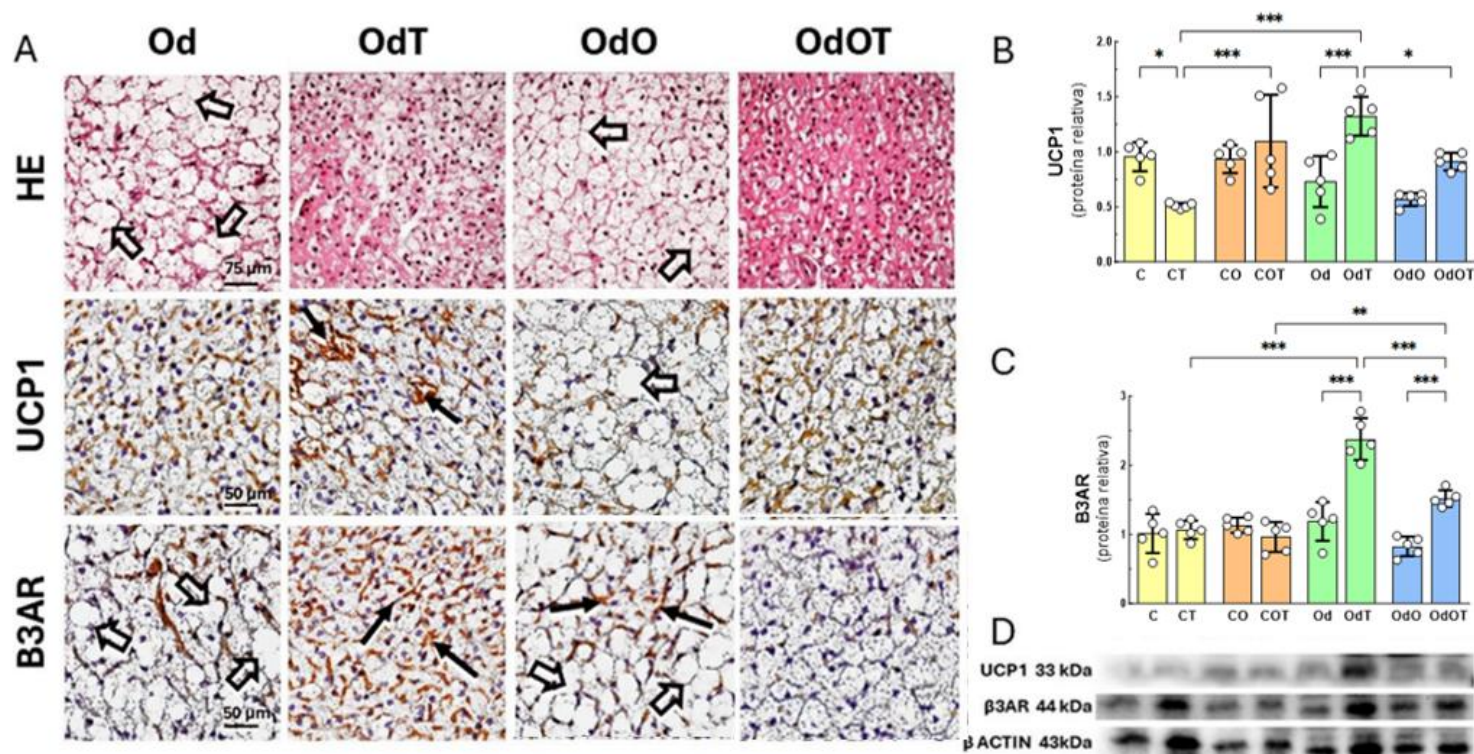
Por outro lado, nos animais tratados com tirzepatida, especificamente nos grupos OdT e OdOT, a morfologia dos adipócitos foi preservada, apresentando gotículas de gordura marrom multiloculares semelhante ao grupo controle. Esses achados sugerem um efeito protetor da tirzepatida na preservação do TAM em animais obesos/diabéticos ovariectomizados, impedindo o processo de *branqueamento* e mantendo a estrutura do TAM (Figura 14B).

Esses dados foram corroborados pela imunomarcção de anticorpos fundamentais para a termogênese, como B3-AR e UCP1. Os animais submetidos à dieta HFHS apresentaram menor imunomarcção desses anticorpos em comparação aos animais controles, enquanto os tratados com tirzepatida mostraram maior imunomarcção, destacando a importância desses

anticorpos na termogênese. Em relação a fotomicrografia e imunomarcação (UCP1 e B3AR) também foram feitos nos grupos C, CT, CO e COT porém foram dados não apresentados neste trabalho, pois o enfoque é o tratamento com tirzepatida dos grupos obesos e diabéticos.

A quantificação da expressão proteica dos mesmos anticorpos revelou que os animais tratados com tirzepatida, mesmo sob dieta HFHS, apresentaram maior expressão desses marcadores associados à termogênese. Para UCP1, as diferenças foram: **Od** vs. **OdT** (+81 %) e **OdO** vs. **OdOT** (+66 %) (Figura 14B). De forma semelhante, para B3-AR, as diferenças foram: **Od** vs. **OdT** (+101 %) e **OdO** vs. **OdOT** (+84 %) (Figura 14C). As bandas representativas estão ilustradas na (Figura 14D).

Figura 14 - Fotomicrografias representativas do tecido adiposo marrom (TAM) e expressão proteica de UCP-1 e B3-AR dos grupos experimentais



Legenda: (A) Fotomicrografias representativas, com a mesma ampliação, coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), do TAM. Nos grupos Od e OdOT, observa-se o aumento das infusões lipídicas do TAM (setas abertas) e imunomarcagem dos anticorpos analisados (setas fechadas). O tratamento com tizerpatida preservou o TAM, apresentando gotículas de gordura marrom multiloculares nos grupos OdT e OdOT, com preservação da morfologia dos adipócitos. (B) Expressão proteica de UCP1; (C) Expressão proteica de B3-AR; (D) Bandas Western blot (WB) para UCP1, B3-AR e Beta-actina. Grupos: C, Controle; Od, Obeso e diabético; O, Ovariectomia; T, Tirzepatida. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

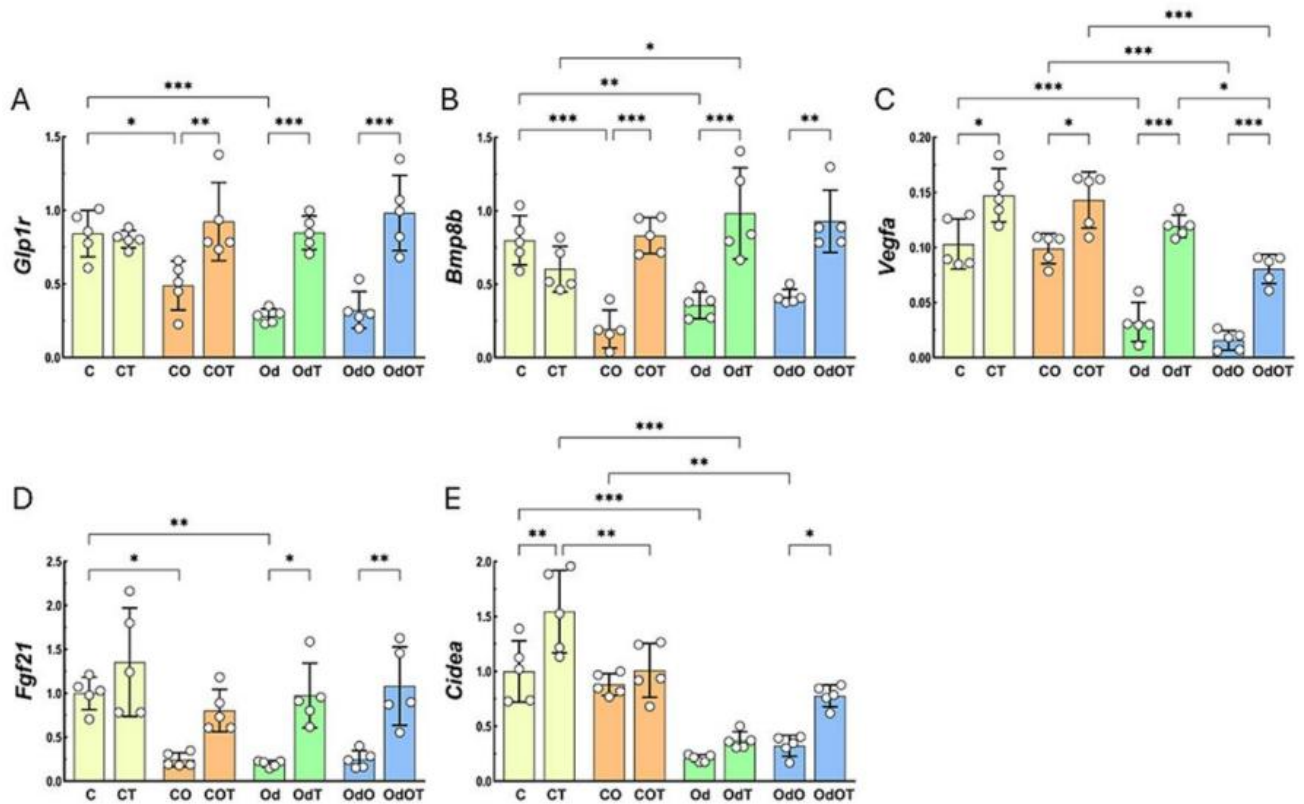
Fonte: a autora, 2025.

3.7 Expressão gênica de marcadores termogênicos, batocinas e estresse do Retículo Endoplasmático

A ovariectomia (Ovx) reduziu a expressão do receptor de GLP-1 (Glp1r) nos grupos CO em comparação ao grupo C (-51 %). No entanto, os grupos tratados com tirzepatida apresentaram um aumento na expressão de Glp1r em relação aos grupos não tratados: COT vs. CO (+85 %), OdT vs. Od (+201 %) e OdOT vs. OdO (+203 %) (Figura 15A).

A expressão das batocinas foi geralmente menor nos grupos Od em comparação aos grupos C. Especificamente, o grupo Od mostrou reduções significativas em Bmp8b (-100 %), Vegfa (-73 %) e Fgf21 (-100 %) em relação ao grupo C, além de uma diminuição de Cidea (-79 %). No entanto, a administração de tirzepatida resultou em um aumento nos níveis de batocinas em comparação com os grupos não tratados: para Bmp8b, os aumentos foram: COT vs. CO (+277 %), OdT vs. Od (+143 %) e OdOT vs. OdO (+128 %); para Vegfa, os aumentos foram: OdT vs. Od (+300 %) e OdOT vs. OdO (+450 %); e para Fgf21, os aumentos foram: OdT vs. Od (+390 %) e OdOT vs. OdO (+266 %). Da mesma forma, Cidea apresentou um aumento com tratamento de tirzepatida: CT vs. C (+54 %) e OdOT vs. OdO (+141 %) (Figuras 15B-E).

Figura 15 - Expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM): Glp1r, Cidea e batocinas dos grupos experimentais



Legenda: A – Expressão do receptor de peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (Glp1r); B – Expressão da proteína morfogenética óssea 8 (Bmp8b); C - Expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (Vegfa); D - Expressão do fator de crescimento de fibroblastos 21 (Fgf21); E – Expressão do fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efector semelhante à subunidade alfa A (Cidea). Abreviações dos grupos: C, controle; O, ovariectomia; Od, diabético obeso; T, tirzepatida. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

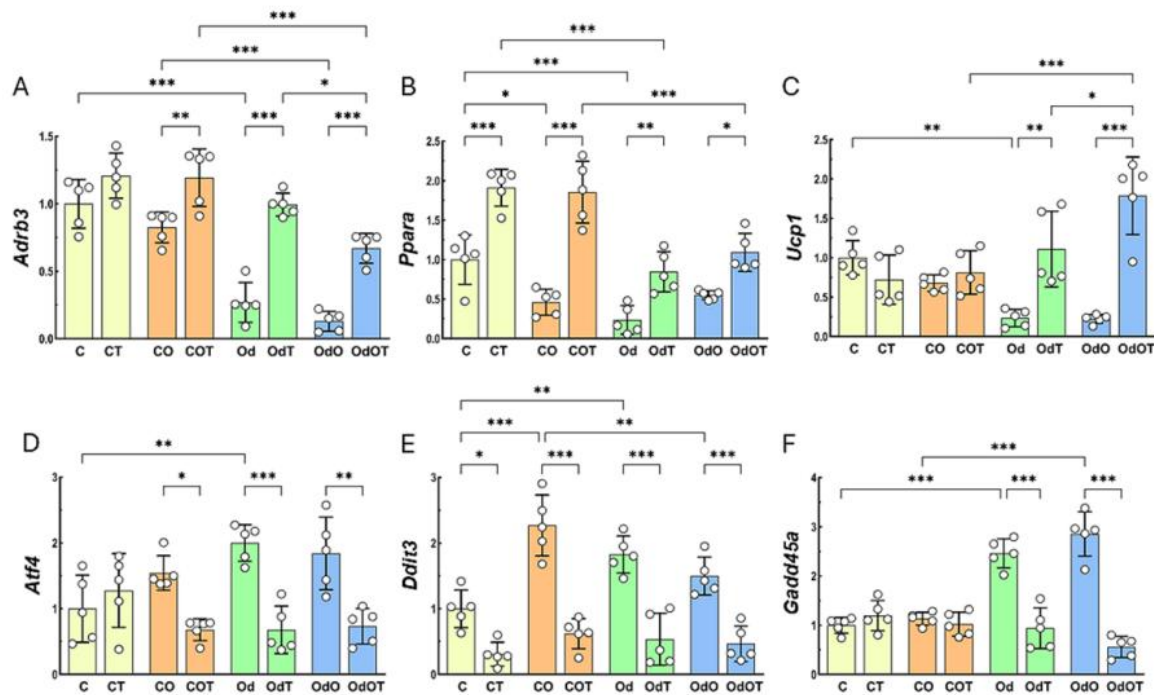
Fonte: a autora, 2025.

A expressão do gene termogênico *Adrb3* foi significativamente menor nos grupos Od vs. C (–73 %) e OdO vs. CO (–84 %). Além disso, os genes *Ppara* (–76 %) e *Ucp1* (–20 %) também foram menos expressos no grupo OdO vs. CO. O tratamento com tirzepatida resultou em um aumento na expressão desses genes em comparação com suas contrapartes não tratadas: para *Adrb3*, os aumentos foram: OdT vs. Od (+270 %) e OdOT vs. OdO (+415 %); para *Ppara*, os aumentos foram: CT vs. C (+91 %), COT vs. CO (+302 %), OdT vs. Od (+257 %) e OdOT vs. OdO (+98 %); e para *Ucp1*, os aumentos foram: OdT vs. Od (+370 %) e OdOT vs. OdO (+61 %) (Figuras 16A-C).

Os genes relacionados ao estresse do RE apresentaram, em geral, regulação positiva nos grupos Od em comparação aos grupos C: *Atf4* (+100 %), *Ddit3* (+83 %) e *Gadd45a* (+146 %). O tratamento com tirzepatida resultou na redução da expressão desses genes em comparação aos

grupos não tratados: Atf4, COT vs. CO (-56 %), OdT vs. Od (-66 %), OdOT vs. OdO (-60 %), Ddit3 (todas as comparações) e Gadd45a (OdT vs. Od, OdOT vs. OdO). Esses resultados sugerem que o tirzepatida atenua o estresse do ER (Figuras 16D-F).

Figura 16 - Expressões gênicas no tecido adiposo marrom (TAM): indicadores de termogênese e estresse do retículo endoplasmático (RE) dos grupos experimentais



Legenda: A – Expressão do receptor adrenérgico beta 3 (Adrb3); B – Expressão do receptor alfa ativado do proliferador de peroxissoma 576 (Ppara); C – Expressão da proteína desacopladora 1 (Ucp1); D – Expressão do fator de transcrição ativador 4 (Atf4); E – Expressão do transcrito induzível por dano ao DNA 3 (Ddit3); F – Expressão da proteína alfa 45 associadas a dano ao DNA e parada de crescimento (Gadd45a). Abreviações dos grupos: C, controle; O, ovariectomia; Od, diabético obeso; T, tirzepatida. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Fonte: a autora, 2025.

3.8 Efeito e interação de Ovx e Tzp nos resultados

A Tabela 3 fornece um resumo quantitativo da análise. O efeito mais pronunciado da ovariectomia (Ovx) foi observado no peso corporal (PC) na semana 16. O tratamento com tirzepatida influenciou significativamente a razão TAM/PC, o peso corporal na semana 16 e os resultados da termografia na mesma semana.

A interação entre Ovx e tirzepatida foi mínima para o peso corporal na semana 16, mas mais pronunciada na termografia.

Em relação aos genes de batocinas, a Ovx não afetou a expressão de Bmp8b. No entanto, a tirzepatida impactou significativamente todos os genes de batocina analisados, com interações entre Ovx e tirzepatida observadas para a maioria dos genes, exceto para Fgf21. O gene Cidea não demonstrou interação entre Ovx e tirzepatida.

Quanto aos genes relacionados ao estresse de RE, a Ovx não afetou a expressão de Atf4, mas influenciou Ddit3 e Gadd45a. O tratamento com tirzepatida teve um impacto significativo em todos os três genes de estresse do RE e interagiu com a Ovx para esses genes. Em relação aos genes relacionados à termogênese, a Ovx não afetou Ucp1, mas a tirzepatida influenciou significativamente a expressão de Ucp1 e interagiu com a Ovx na regulação da termogênese.

Tabela 3 - Análise de variância bidirecional analisando os efeitos e a interação da ovariectomia (Ovx) e da tirzepatida (Tzp)

Dados	Dieta		Ovx		Tzp		Tzp x Ovx		Tzp x Dieta		Ovx x Dieta		Tzp x Ovx x Dieta	
	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P
<u>Biometria</u>														
Peso TAM/PC	3,049	ns	0,5470	ns	40,2	<0,001	4,330	0,04	0,020	ns	3,46	ns	0,07	ns
PC (sem 16)	0,000	ns	33,26	<0,001	52,98	<0,001	0,3772	0,008	0,025	ns	1,166	<0,001	0,036	ns
<u>Expressão gênica</u>														
<i>Atf4</i>	0,105	ns	2,38	ns	38,20	<0,001	14,21	<0,001	3,620	ns	0,012	ns	7,688	0,01
<i>Bmp8b</i>	6,306	0,03	0,0057	ns	21,28	<0,001	9,006	0,010	7,108	0,02	7,951	0,01	9,969	0,007
<i>Cidea</i>	0,137	ns	57,51	<0,001	12,61	<0,001	0,025	ns	0,116	ns	10,47	<0,001	3,793	0,008
<i>Fgf21</i>	8,013	0,008	4,897	0,03	38,68	<0,001	2,940	ns	0,422	ns	12,95	0,001	0,1339	0,72
<i>Vegfa</i>	3,926	0,02	41,38	<0,001	30,10	<0,001	3,866	0,02	0,018	ns	0,555	ns	0,91	ns
<i>Ddit3</i>	5,591	0,004	0,0139	ns	58,34	<0,001	0,094	ns	0,728	ns	13,94	<0,001	3,032	0,03
<i>Gadd45a</i>	1,030	ns	13,40	<0,001	25,66	<0,001	28,50	<0,001	2,047	ns	0,774	ns	0,1810	ns
<i>Adrb3</i>	3,926	0,02	41,38	<0,001	30,10	<0,001	3,866	0,02	0,018	ns	0,55	ns	0,91	ns
<i>Ppara</i>	0,005	ns	25,51	<0,001	48,82	<0,001	5,429	<0,001	0,7007	ns	5,474	<0,001	1,237	ns
<i>Ucp1</i>	1,004	ns	0,1035	ns	28,01	<0,001	35,26	<0,001	6,457	0,007	4,277	0,02	0,4071	ns
<u>Expressão proteica</u>														
B3-AR	8,91	<0,001	18,79	<0,001	19,49	<0,001	25,05	<0,001	3,294	0,01	9,579	<0,001	0,4692	ns
UCP1	2,570	ns	11,9	<0,001	36,98	<0,001	5,131	0,01	0,310	ns	12,76	<0,001	6,561	0,006

Legenda: *Adrb3*, receptor adrenérgico B3; *Atf4*, Fator de transcrição ativador 4; *Bmp8b*, Proteína morfogenética óssea 8B; *Cidea*, Fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor semelhante à subunidade alfa A; *Ddit3*, Proteína homóloga C/EBP; *Fgf21*, Fator de crescimento de fibroblastos 21; *Gadd45a*, Gene de proteína de parada de crescimento induzível por dano ao DNA; *Glp1r*, receptor de peptídeo semelhante ao glucagon-1; *Ppara*, Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomo; PC, peso corporal; TAM, tecido adiposo marrom; *Ucp1*, proteína desacopladora 1; *Vegfa*, fator de crescimento endotelial vascular A.

Fonte: a autora, 2025.

3.9 Análise dos Componentes Principais

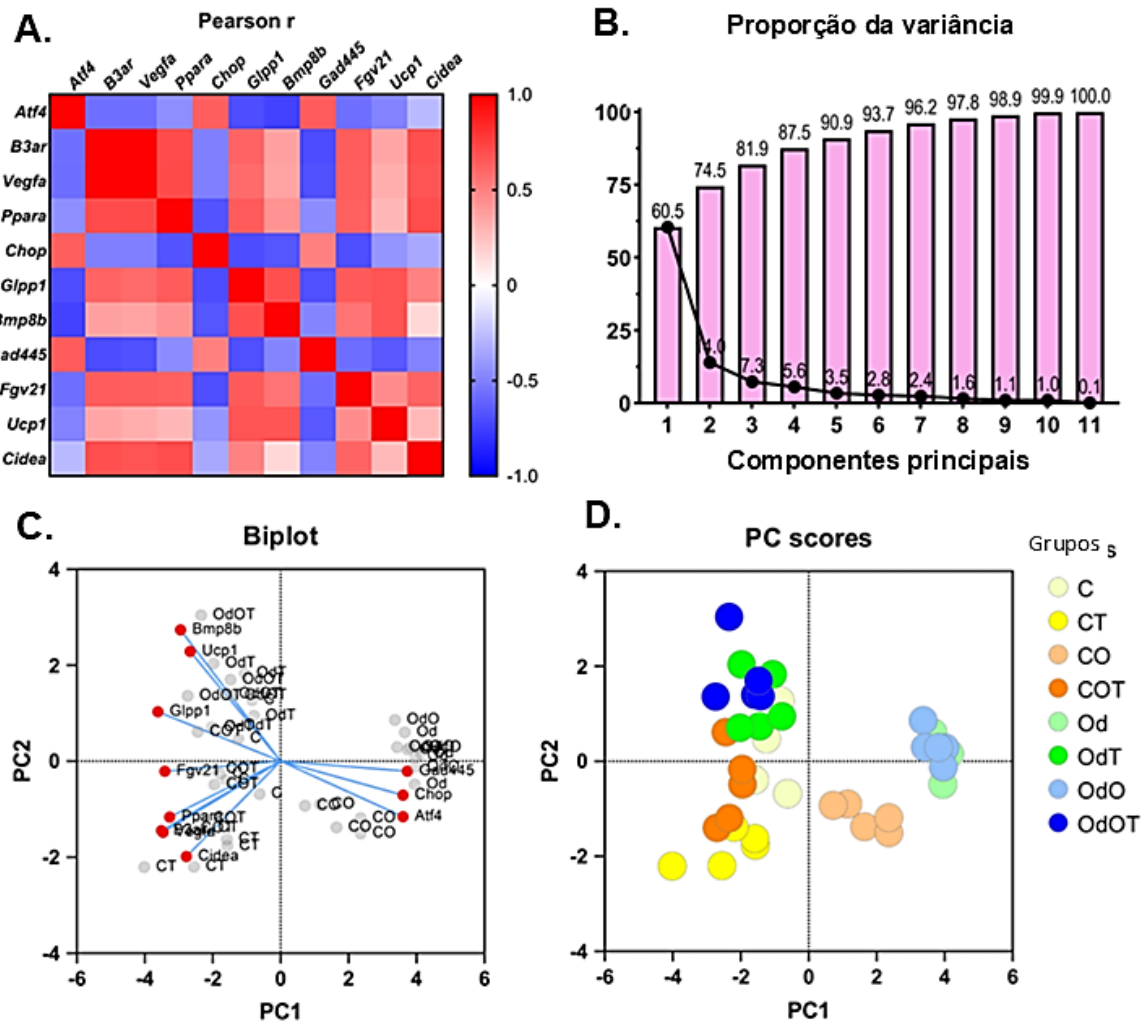
A matriz de correlação foi usada na análise dos componentes principais (ACP) e revelou as relações entre os dados, com genes de ações semelhantes apresentando correlações mais fortes em comparação aos genes com funções distintas (Fig. 17A).

A variância cumulativa dos dois primeiros componentes principais (PCs) foi de 74,5 %, justificando a retenção de PC1 e PC2 para a análise (Fig. 17B). No biplot PCA, os vetores associados aos genes de estresse do RE - Atf4, Ddit3 e Gadd45 – mostraram-se direcionados aos grupos Od, OdO e CO, indicando uma associação com obesidade, DM2 e estresse de RE exacerbado por Ovx. Por outro lado, os vetores relacionados às batocinas (Bmp8b, Vefga, Cidea e Fgf21) e à termogênese (B3-ar, Ucp1 e Ppara) concentraram-se nos grupos controle e tratados com tirzepatida, sugerindo que o tratamento com tirzepatida promoveu a termogênese e estimulou as batocinas (Figura 17C).

Os escores dos PCs corroboraram a posição relativa dos grupos, com o grupo CO distanciado dos demais controles e dos grupos tratados, mas próximo aos grupos Od e OdO, que apresentaram sobreposição (Figura 17D).

Essa análise multivariada refletiu os efeitos adversos da obesidade e DM2, além do impacto agravante da combinação com Ovx sobre os genes analisados. Importante, o tratamento com a tirzepatida mostrou-se eficaz em mitigar esses efeitos negativos.

Figura 17 - Análise multivariada de expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM) dos grupos experimentais



Legenda: (A) Mapa de calor da matriz de correlação de Pearson (r); (B) Variação cumulativa dos componentes principais, mostrando que os dois primeiros componentes explicam 74,5 % da variação total. As abreviações dos genes estão listadas na Tabela 2. (C) Gráfico de cargas dos componentes principais (CP), onde as linhas azuis indicam a direção da expressão gênica (círculos vermelhos); (D) Gráfico de pontuações dos CP, com cores diferentes para representar os grupos. Os grupos Od, OdO e CO se agrupam de um lado, sendo influenciados principalmente por genes de estresse do RE. Os demais grupos, incluindo aqueles tratados com tirzepatida, se agrupam do lado oposto, sendo influenciados por genes relacionados à termogênese, como *Cidea* e batocinas. Abreviações dos grupos: C, controle; O, ovariectomia; Od, diabético obeso; T, tirzepatida.

Fonte: a autora, 2025.

4. DISCUSSÃO

Em nosso modelo de camundongo, observamos que os adipócitos marrons interescapulares apresentaram um clareamento nos animais obesos diabéticos, com ou sem ovariectomia (Ovx) o que resultou em uma redução na expressão de Ucp1 e B3ar, prejudicando a termogênese. Concomitantemente, esses animais exibiram uma diminuição nas batocinas e um aumento no estresse do retículo endoplasmático (RE). Entretanto, a administração de tirzepatida reverteu de forma significativa esses efeitos negativos induzidos pela dieta obesogênica, reduzindo o peso corporal e controlando a glicemia. Esses achados sugerem que a tirzepatida é uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da obesidade, seja isolada ou associada ao DM2 (39, 40), mostrando-se até mais eficaz do que outros análogos do GLP1, como a semaglutida (41, 42).

A literatura mostra os benefícios dos análogos do receptor GLP-1 (GLP1R), como a semaglutida e a liraglutida (43). Além disso, outros análogos, como a cotadutida, que atua tanto nos receptores GLP1 quanto de glucagon, têm sido amplamente estudados em nosso laboratório, com resultados que corroboram nossos achados ao estimular a termogênese e remodelar o TAM interescapular em camundongos obesos (44). Esses dados reforçam a eficácia dessa estratégia no tratamento da obesidade.

Um estudo recente demonstrou que camundongos obesos tratados com succinato exógeno e liraglutida, tanto isoladamente quanto em combinação, apresentaram efeitos benéficos no TAM. O succinato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, tem sido apontado por promover o aumento do gasto energético, sobretudo no TAM, ao estimular a ativação da UCP1. A liraglutida, um análogo do GLP1 amplamente usado no tratamento da obesidade, também contribuiu para essa ação. O tratamento com essas moléculas resultou em redução da massa corporal, melhora na eficiência alimentar e aumento da temperatura interescapular – um indicativo de termogênese. Observou-se ainda maior expressão de Ucp1 no grupo tratado com succinato exógeno, com efeitos potencializados quando combinado com liraglutida, sugerindo um efeito sinérgico entre os compostos (45).

De fato, os análogos do GLP-1 são amplamente utilizados nos tratamentos atuais; entretanto, a tirzepatida com seu duplo agonismo envolvendo o GIP, tem mostrado resultados ainda mais promissores em estudos pré-clínicos (46, 47) e em ensaios clínicos (48). Esse efeito superior pode ser explicado, possivelmente, pelo sinergismo proporcionado pelo GIP (49, 50). Embora esse sinergismo possa ser responsável pelo impacto significativo do tratamento com tirzepatida, há uma diferença importante entre as espécies: enquanto o GLP-1 se mantém

constante entre elas, o GIP varia. Isso sugere limitações em estudos com camundongos, onde o GLP1 tende a predominar em relação ao GIP, tornando a proporção GLP-1/GIP mais vantajosa (51).

O receptor GIP (GIPR) é amplamente expresso no tecido adiposo branco (TAB) (52), o que é relevante, considerando que o receptor do GLP-1 (GLP-1R) não é encontrado nesse tecido. Essa diferença indica que o GIPR pode exercer efeitos únicos sobre o metabolismo da gordura branca, efeitos esses que os agonistas do GLP-1R não influenciam diretamente (36). A ação do GIPR está ligada a processos metabólicos como lipólise, captação de glicose e lipídios e aumento do fluxo sanguíneo no tecido adiposo (53). Essas ações contribuem para a redução do peso corporal e massa gorda, fatores essenciais no controle da obesidade e de distúrbios metabólicos (54). Além disso, os agonistas do GIPR podem mitigar alguns efeitos adversos dos agonistas do GLP-1R, como o aumento dos níveis de ácidos graxos livres (AGL), sugerindo que o GIPR pode auxiliar na manutenção de um perfil metabólico mais favorável quando combinado com terapias de GLP-1R. Sabe-se que o TAB possui receptores GIP, enquanto o TAM não apresenta tais receptores (55). Ainda que o TAM não expresse GIPR, os efeitos observados no estudo focado nesse tecido foram significativos.

A principal função do TAM é a termogênese, o que se reflete em adipócitos multiloculares e aumento na expressão de *Adrb3* e *UCP-1*, devido à maior quantidade de mitocôndrias, estimuladas pelo sistema nervoso simpático (SNS) (56, 57). A ativação do TAM pode ser crucial para a regulação de fatores de risco cardiovascular, incluindo níveis de lipoproteínas, colesterol e o metabolismo da glicose. Em modelos animais, a ativação do TAM induzida pelo frio demonstrou capacidade de reduzir triacilgliceróis plasmáticos (19), com potencial para mitigar a hipercolesterolemia e a formação de placas ateroscleróticas (58). Além disso, essa ativação está associada a uma maior captação de glicose e melhoria na sensibilidade à insulina (59), indicando um impacto benéfico positivo no metabolismo tanto sistêmico quanto local.

Nos camundongos, o TAM interage com tecidos como músculo esquelético, coração e rins regulando o gasto energético e o metabolismo de lipídios via mecanismos endócrinos ou parácrinos (60). Esse tecido apresenta um alto tônus simpático essencial para sua ativação e função. A extensa inervação do TAM permite uma resposta rápida ao estímulo pelo SNS (61), onde a liberação de catecolaminas, como a norepinefrina, ativa receptores β 3-adrenérgicos nos adipócitos marrons maduros, promovendo a termogênese e o catabolismo lipídico (62). Esses achados indicam que a ativação do TAM depende fortemente da sinalização do SNS, em vez de ocorrer de forma autônoma nas células (63, 64).

Estudos com adipócitos marrons primários indicam que, embora esses adipócitos marrons possuam capacidades termogênicas intrínsecas, sua ativação completa e resposta funcional *in vivo* são rigidamente reguladas por estímulos simpáticos e interações com outras células, como células endoteliais e nervosas (65). Essas interações são essenciais para processos como angiogênese e vascularização, os quais sustentam a função do TAM. Assim, embora o TAM tenha algumas propriedades autônomas, sua atividade é predominantemente impulsionada por estímulos secundários mediados pelo sistema nervoso simpático e interações intercelulares (26).

A obesidade pode alterar as características morfofuncionais do TAM, levando ao fenômeno de *branqueamento*, no qual o tecido adquire um fenótipo semelhante ao do TAB (22). Esse processo de *branqueamento* resulta em um tecido disfuncional, apresentando adipócitos uniloculares, menor quantidade de mitocôndrias e vascularização reduzida, comprometendo a função termogênica do TAM (66).

Nas análises histológicas do TAM dos animais dos grupos Od e OdO, observou-se um aspecto semelhante ao do TAB, corroborando o impacto negativo da obesidade sobre esse tecido. Em contraste, os animais dos grupos controles exibiram as características histológicas esperadas para o TAM. Nos grupos tratados com Tzp, especialmente aqueles alimentados com dieta HFHS, notou-se uma reversão do *branqueamento* do TAM, com recuperação das características típicas de um TAM saudável. Essa análise histológica sugere que o tratamento com tirzepatida foi efetivo na mitigação desse efeito adverso da obesidade. Além disso, a alteração na conformação dos adipócitos resultou em um aumento do peso do TAM nos grupos tratados com tirzepatida em comparação aos grupos não tratados, o que indica que a atividade termogênica do TAM não está diretamente relacionada ao seu peso, reforçando a importância da qualidade funcional do tecido.

Um estudo anterior com ratos (67) também demonstrou aumento no peso do TAM em animais submetidos a uma dieta rica em gordura em comparação aos controles. Esse aumento de peso foi associado a uma redução na atividade termogênica devido ao *branqueamento* dos adipócitos marrons, que comprometeu a expressão de marcadores essenciais da termogênese, como Ucp1 e B3ar (22). No presente estudo, os animais dos grupos Od e OdO exibiram essa conformação alterada, acompanhada por uma menor atividade de Ucp1 e B3ar. Observou-se que a razão TAM/PC aumentou simultaneamente à perda da aparência multiloculada nos animais não tratados com tirzepatida. No entanto, a administração de tirzepatida reduziu essa razão e restaurou a aparência multiloculada do TAM.

Esse resultado é consistente com a imunomarcagem de proteínas fundamentais para a termogênese (UCP-1 e B3-AR) e com os resultados de expressão proteica obtidos por *western blotting*. Nos animais tratados com tirzepatida, o parênquima do TAM mostrou-se semelhante ao dos controles, exibindo as características esperadas de um tecido termogênico saudável, com maior imunomarcagem das proteínas estudadas. Em contraste, os animais dos grupos Od e OdO apresentaram menor imunomarcagem e expressão proteica desses marcadores. Além disso, as expressões gênicas relacionadas à termogênese foram reduzidas nos camundongos dos grupos Od e OdO, enquanto os animais tratados com tirzepatida mostraram um aumento na expressão desses genes, em concordância com a literatura (68). Outro efeito positivo do tratamento com tirzepatida foi o aumento na expressão de batocinas, que se encontrava reduzida nos grupos Od e OdO. Esse aumento na secreção de batocinas pelo TAM reflete o papel emergente desse tecido como um regulador metabólico, cujos fatores secretados influenciam outros órgãos e tecidos (69). Esses achados sugerem novos alvos terapêuticos no combate à obesidade em mulheres pós-menopáusicas.

Investigar obesidade, DM2 e menopausa em modelos de roedores contribui para a compreensão da complexa interação entre essas condições e pode ter implicações relevantes para a saúde das mulheres. Já evidenciamos que a combinação de obesidade, DM2 e menopausa agrava a saúde de mulheres maduras e eleva o risco de eventos cardiovasculares e metabólicos (70), o que enfatiza a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema (71). Estima-se que a maioria das mulheres passará mais de um terço de suas vidas em estado pós-menopausa (72). Durante a transição para a menopausa, há uma tendência de aumento no peso corporal e mudanças na composição e distribuição de gordura, o que eleva o risco de obesidade (57, 73).

Além disso, a menopausa parece estar associada a um risco aproximadamente 2,4 vezes maior de desenvolver doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MASLD) (74-76). Muitas mulheres também relatam comprometimento da função cognitiva durante a perimenopausa (77), principalmente em casos de menopausa precoce (78). Há ainda indícios de que sintomas vasomotores durante a menopausa possam ser um marcador de risco para doença de Alzheimer (79). A relação entre obesidade e o câncer de mama pós-menopausa também tem sido amplamente discutida (80, 81). Esses fatores destacam a necessidade de estudos mais detalhados sobre a vida pós-menopausa, incluindo abordagens experimentais, para aprofundar a compreensão dos riscos e dos mecanismos envolvidos, permitindo o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas voltadas à saúde das mulheres nessa fase da vida.

Um modelo de camundongos fêmeas mais velhas podem ser mais adequados do que a ovariectomia para reproduzir condições de menopausa de forma experimental (82). Alternativamente, o uso de 4-vinilciclohexeno-diepóxido para induzir depleção folicular ovariana em roedores é uma opção, embora resulte em outras consequências adversas (83, 84). A menopausa é um processo fisiológico gradual, enquanto a ovariectomia bilateral causa uma queda hormonal abrupta. Além disso, ratos e camundongos não apresentam perda completa dos folículos, dificultando a simulação do declínio hormonal observado em humanos (85). Investir no desenvolvimento e testes de novas abordagens preventivas direcionadas a mulheres na pós-menopausa pode ajudar a reduzir o risco de comorbidades associadas (86, 87).

Nossa hipótese ao testar a administração de tirzepatida em animais levou em conta suas principais indicações médicas para DM2 e obesidade. Como efeito adicional, observamos aumento na temperatura interescapular em animais obesos/diabéticos, com ou sem ovariectomia, possivelmente associado à diminuição do peso corporal e aumento da termogênese. A ativação do TAM surge como uma estratégia válida para mulheres na menopausa, ainda que o papel do TAM no controle de peso em humanos precise de mais comprovação. No entanto, o TAM pode melhorar a sensibilidade à insulina em humanos (88).

O estresse do retículo endoplasmático (RE), que resulta do desdobramento excessivo ou incorreto de proteínas, é frequentemente observado em doenças metabólicas, como DM2 e MASLD. Esse estresse promove a adiposidade ao reduzir o gasto energético, tornando-o um alvo terapêutico promissor para o tratamento da obesidade (89). Em nossos camundongos Od e OdO, os genes relacionados ao estresse do RE estavam mais expressos, e a administração de tirzepatida reduziu essa expressão de forma significativa. De forma similar, a cotadutida (um agonista duplo de GLP1 e glucagon) demonstrou benefícios na redução da inflamação e do estresse do RE tanto no tecido adiposo quanto no fígado de camundongos obesos (90).

A análise de componentes principais (PCA) foi fundamental para interpretar melhor os resultados dos genes, utilizando uma técnica estatística multivariada que avalia todos os genes simultaneamente (91). Nossos achados mostraram que os grupos Od e OdO ficaram próximos ao grupo CO, indicando que os genes associados a esses grupos estavam relacionados ao estresse do RE. Assim, DM2 e ovariectomia influenciaram de maneira semelhante a expressão de genes de estresse do RE. Em contraste, o tratamento com tirzepatida posicionou esses grupos em direção oposta, evidenciando uma influência dominante dos genes de termogênese.

CONCLUSÃO

O tratamento com tirzepatida demonstrou efeitos benéficos em camundongos fêmeas obesos e diabéticos, tanto aqueles que passaram por ovariectomia quanto os que não passaram. A administração de tirzepatida resultou na redução do peso corporal, aumento da temperatura interescapular e termogênese, além de diminuir o estresse do retículo endoplasmático no tecido adiposo marrom. A combinação de obesidade, DM2 e menopausa configura um modelo experimental valioso para o estudo da saúde feminina. O tratamento com tirzepatida nesse contexto não foi explorado, representando uma área promissora para futuras investigações.

REFERÊNCIAS

1. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obes Res.* 2001;9 Suppl 4:228S-33S.
2. Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res.* 2020;151(1):11-21.
3. Pepe RB, Lottenberg AM, Fujiwara CTH, Beyruti M, Cintra DE, Machado RM, et al. Position statement on nutrition therapy for overweight and obesity: nutrition department of the Brazilian association for the study of obesity and metabolic syndrome (ABESO—2022). *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2023;15(1):124.
4. 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;2(1):e00104-e.
5. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism.* 2019;92:6-10.
6. Pêgo-Fernandes PM, Bibas BJ, Deboni M. Obesity: the greatest epidemic of the 21st century? *Sao Paulo Med J.* 2011;129(5):283-4.
7. Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:221-45.
8. Zhang X, Ha S, Lau HC, Yu J. Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities. *Semin Cancer Biol.* 2023;92:16-27.
9. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet.* 2017;389(10085):2239-51.
10. Hu F, Qiu X, Bu S. Pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2020;126(3):235-41.
11. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, et al. Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2002;87(11):5098-103.
12. Silva LV, Abdalla PP, Bohn L, Araújo RG, Batalhão DF, Venturini ACR, et al. Association of minimally processed and ultra-processed food daily consumption with obesity in overweight adults: a cross-sectional study. *Nutr Hosp.* 2023;40(3):534-42.
13. Opoku AA, Abushama M, Konje JC. Obesity and menopause. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2023;88:102348.
14. Knight MG, Anekwe C, Washington K, Akam EY, Wang E, Stanford FC. Weight regulation in menopause. *Menopause.* 2021;28(8):960-5.
15. Fenton A. Weight, Shape, and Body Composition Changes at Menopause. *J Midlife Health.* 2021;12(3):187-92.
16. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56.
17. Chernukha IM, Fedulova LV, Kotenkova EA. White, beige and Brown adipose tissue: structure, function, specific features and possibility formation and divergence in pigs. 2022.
18. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2001;60(3):329-39.
19. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011;17(2):200-5.
20. Martins FF, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue as an endocrine organ: updates on the emerging role of batokines. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation.* 2023;44(2):219-27.
21. Rui L. Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. *Compr Physiol.* 2017;7(4):1281-306.
22. Rangel-Azevedo C, Santana-Oliveira DA, Miranda CS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2022;105:109002.
23. Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Current Obesity Reports.* 2015;4(2):224-9.

24. Carpentier AC, Blondin DP, Haman F, Richard D. Brown Adipose Tissue—A Translational Perspective. *Endocrine Reviews*. 2022;44(2):143-92.
25. Mandarim-de-Lacerda CA, del Sol M, Vásquez B, Aguila MB. Mice as an Animal Model for the Study of Adipose Tissue and Obesity. *International Journal of Morphology*. 2021;39:1521-8.
26. Jung SM, Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Brown Adipose Tissue Development and Metabolism. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;251:3-36.
27. Teixeira PJ, Carraça EV, Marques MM, Rutter H, Oppert JM, De Bourdeaudhuij I, et al. Successful behavior change in obesity interventions in adults: a systematic review of self-regulation mediators. *BMC Med*. 2015;13:84.
28. Deng Y, Park A, Zhu L, Xie W, Pan CQ. Effect of semaglutide and liraglutide in individuals with obesity or overweight without diabetes: a systematic review. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2022;13:20406223221108064.
29. de Boer SA, Lefrandt JD, Petersen JF, Boersma HH, Mulder DJ, Hoogenberg K. The effects of GLP-1 analogues in obese, insulin-using type 2 diabetes in relation to eating behaviour. *International Journal of Clinical Pharmacy*. 2016;38(1):144-51.
30. Ansari S, Khoo B, Tan T. Targeting the incretin system in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2024;20(8):447-59.
31. Drucker DJ, Holst JJ. The expanding incretin universe: from basic biology to clinical translation. *Diabetologia*. 2023;66(10):1765-79.
32. Zarei M, Sahebi Vaighan N, Farjoo MH, Talebi S, Zarei M. Incretin-based therapy: a new horizon in diabetes management. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2024.
33. Regmi A, Aihara E, Christe ME, Varga G, Beyer TP, Ruan X, et al. Tirzepatide modulates the regulation of adipocyte nutrient metabolism through long-acting activation of the GIP receptor. *Cell Metabolism*. 2024;36(7):1534-49.e7.
34. Souza VR, Mendes E, Casaro M, Antiorio A, Oliveira FA, Ferreira CM. Description of Ovariectomy Protocol in Mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:303-9.
35. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
36. Samms RJ, Christe ME, Collins KA, Pirro V, Droz BA, Holland AK, et al. GIPR agonism mediates weight-independent insulin sensitization by tirzepatide in obese mice. *J Clin Invest*. 2021;131(12).
37. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet*. 1995;346(8967):120-1.
38. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.
39. Sinha R, Papamargaritis D, Sargeant JA, Davies MJ. Efficacy and Safety of Tirzepatide in Type 2 Diabetes and Obesity Management. *J Obes Metab Syndr*. 2023;32(1):25-45.
40. Chavda VP, Ajabiya J, Teli D, Bojarska J, Apostolopoulos V. Tirzepatide, a New Era of Dual-Targeted Treatment for Diabetes and Obesity: A Mini-Review. *Molecules*. 2022;27(13).
41. Frías JP, Davies MJ, Rosenstock J, Manghi FCP, Landó LF, Bergman BK, et al. Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(6):503-15.
42. Samms RJ, Christe ME, Collins KAL, Pirro V, Droz BA, Holland AK, et al. GIPR agonism mediates weight-independent insulin sensitization by tirzepatide in obese mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(12).
43. Hropot T, Herman R, Janez A, Lezaic L, Jensterle M. Brown Adipose Tissue: A New Potential Target for Glucagon-like Peptide 1 Receptor Agonists in the Treatment of Obesity. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10).
44. Spezani R, Marcondes-de-Castro IA, Marinho TS, Reis-Barbosa PH, Cardoso LEM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Cotadutide improves brown adipose tissue thermogenesis in obese mice. *Biochem Pharmacol*. 2023;217(11):115852.

45. Gaspar RS, Delafiori J, Zuccoli G, Carregari VC, Prado TP, Morari J, et al. Exogenous succinate impacts mouse brown adipose tissue mitochondrial proteome and potentiates body mass reduction induced by liraglutide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2023;324(3):E226-E40.
46. Samms RJ, Zhang G, He W, Ilkayeva O, Droz BA, Bauer SM, et al. Tirzepatide induces a thermogenic-like amino acid signature in brown adipose tissue. *Mol Metab.* 2022;64(10):101550.
47. Pacini G, Ahren B. The dual incretin co-agonist tirzepatide increases both insulin secretion and glucose effectiveness in model experiments in mice. *Peptides.* 2024;171:171117.
48. Tan B, Pan X-H, Chew HSJ, Goh RSJ, Lin C, Anand VV, et al. Efficacy and safety of tirzepatide for treatment of overweight or obesity. A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Obesity.* 2023;47(8):677-85.
49. Zaazouee MS, Hamdallah A, Helmy SK, Hasabo EA, Sayed AK, Gbreel MI, et al. Semaglutide for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus: A systematic review and network meta-analysis of safety and efficacy outcomes. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2022;16(6):102511.
50. Frias JP, Davies MJ, Rosenstock J, Perez Manghi FC, Fernandez Lando L, Bergman BK, et al. Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2021;385(6):503-15.
51. El K, Douros JD, Willard FS, Novikoff A, Sargsyan A, Perez-Tilve D, et al. The incretin co-agonist tirzepatide requires GIPR for hormone secretion from human islets. *Nat Metab.* 2023;5(6):945-54.
52. Hammoud R, Drucker DJ. Beyond the pancreas: contrasting cardiometabolic actions of GIP and GLP1. *Nature Reviews Endocrinology.* 2023;19(4):201-16.
53. Asmar M, Simonsen L, Madsbad S, Stallknecht B, Holst JJ, Bulow J. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide may enhance fatty acid re-esterification in subcutaneous abdominal adipose tissue in lean humans. *Diabetes.* 2010;59(9):2160-3.
54. Boer GA, Keenan SN, Miotto PM, Holst JJ, Watt MJ. GIP receptor deletion in mice confers resistance to high-fat diet-induced obesity via alterations in energy expenditure and adipose tissue lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021;320(4):E835-E45.
55. Rudovich N, Kaiser S, Engeli S, Osterhoff M, Gögebakan Ö, Bluher M, Pfeiffer AFH. GIP receptor mRNA expression in different fat tissue depots in postmenopausal non-diabetic women. *Regulatory Peptides.* 2007;142(3):138-45.
56. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):25-37.
57. Marlatt KL, Pitynski-Miller DR, Gavin KM, Moreau KL, Melanson EL, Santoro N, Kohrt WM. Body composition and cardiometabolic health across the menopause transition. *Obesity (Silver Spring).* 2022;30(1):14-27.
58. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe PPSJ, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature Communications.* 2015;6(1):6356.
59. Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 2014;63(12):4089-99.
60. Yang FT, Stanford KI. Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review). *Curr Obes Rep.* 2022;11(1):1-9.
61. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
62. Wade G, McGahee A, Ntambi JM, Simcox J. Lipid Transport in Brown Adipocyte Thermogenesis. *Frontiers in Physiology.* 2021;12.
63. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature.* 1983;305(5936):712-3.
64. Rothwell NJ, Stock MJ. Effects of denervating brown adipose tissue on the responses to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. *J Physiol.* 1984;355:457-63.
65. Hawley JA, Lundby C, Cotter JD, Burke LM. Maximizing Cellular Adaptation to Endurance Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 2018;27(5):962-76.

66. Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Curr Obes Rep.* 2015;4(2):224-9.
67. Da Eira D, Jani S, Ceddia RB. An obesogenic diet impairs uncoupled substrate oxidation and promotes whitening of the brown adipose tissue in rats. *J Physiol.* 2023;601(1):69-82.
68. Alcala M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M. Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. *Front Physiol.* 2019;10(2):94.
69. Ahmad B, Vohra MS, Saleemi MA, Serpell CJ, Fong IL, Wong EH. Brown/Beige adipose tissues and the emerging role of their secretory factors in improving metabolic health: The batokines. *Biochimie.* 2021;184(5):26-39.
70. Anagnostis P, Stevenson JC. Cardiovascular health and the menopause, metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2024;38(1):101781.
71. Lambrinoudaki I, Paschou SA, Armeni E, Goulis DG. The interplay between diabetes mellitus and menopause: clinical implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2022;18(10):608-22.
72. Paschou SA, Marina LV, Spartalis E, Anagnostis P, Alexandrou A, Goulis DG, Lambrinoudaki I. Therapeutic strategies for type 2 diabetes mellitus in women after menopause. *Maturitas.* 2019;126:69-72.
73. Palacios S, Chedraui P, Sanchez-Borrego R, Coronado P, Nappi RE. Obesity and menopause. *Gynecol Endocrinol.* 2024;40(1):2312885.
74. Jaroenlapnopparat A, Charoenngam N, Ponvilawan B, Mariano M, Thongpiya J, Yingchoncharoen P. Menopause is associated with increased prevalence of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Menopause.* 2023;30(3):348-54.
75. Polyzos SA, Goulis DG. Menopause and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Maturitas.* 2024;186(8):108024.
76. Robeva R, Mladenovic D, Veskovic M, Hrnacic D, Bjekic-Macut J, Stanojlovic O, et al. The interplay between metabolic dysregulations and non-alcoholic fatty liver disease in women after menopause. *Maturitas.* 2021;151:22-30.
77. Thomas E, Verdonk P, Rhodius-Meester H, Muller M. Minding menopause in patients with cognitive impairment: a patient's perspective and reflections on clinical practice. *BMC Womens Health.* 2023;23(1):591.
78. Karamitrou EK, Anagnostis P, Vaitis K, Athanasiadis L, Goulis DG. Early menopause and premature ovarian insufficiency are associated with increased risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Maturitas.* 2023;176:107792.
79. Thurston RC, Maki P, Chang Y, Wu M, Aizenstein HJ, Derby CA, Karikari TK. Menopausal vasomotor symptoms and plasma Alzheimer disease biomarkers. *Am J Obstet Gynecol.* 2023.
80. Roy R, Yang J, Shimura T, Merritt L, Alluin J, Man E, et al. Escape from breast tumor dormancy: The convergence of obesity and menopause. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(41):e2204758119.
81. Von Holle A, Adami HO, Baglietto L, Berrington de Gonzalez A, Bertrand KA, Blot W, et al. BMI and breast cancer risk around age at menopause. *Cancer Epidemiol.* 2024;89:102545.
82. Acosta JJ, Mayer L, Talboom JS, Tsang CW, Smith CJ, Enders CK, Bimonte-Nelson HA. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. *Endocrinology.* 2009;150(9):4248-59.
83. Lorenzon F, Simas BB, Gregorio T, Anselmo-Franci JA, Lino de Oliveira C, Huber DA, Lima FB. Ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide worsens the autonomic cardiovascular response to chronic unpredictable stress in rats. *Life Sci.* 2019;226:130-9.
84. Abolaji AO, Adedara IA, Abajingini AO, Fatunmibi OJ, Ladipo EO, Farombi EO. Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure in female Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 2016;66:10-9.
85. Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod.* 1979;21(1):193-203.
86. El Khoudary SR, Nasr A. Cardiovascular Disease in Women: Does Menopause Matter? *Curr Opin Endocr Metab Res.* 2022;27.
87. Uddenberg ER, Safwan N, Saadedine M, Hurtado MD, Faubion SS, Shufelt CL. Menopause transition and cardiovascular disease risk. *Maturitas.* 2024;185:107974.

88. Marlatt KL, Chen KY, Ravussin E. Is activation of human brown adipose tissue a viable target for weight management? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018;315(3):R479-R83.
89. Ajoolahady A, Liu S, Klionsky DJ, Lip GYH, Tuomilehto J, Kavalakatt S, et al. ER stress in obesity pathogenesis and management. *Trends Pharmacol Sci*. 2022;43(2):97-109.
90. Marcondes-de-Castro IA, Oliveira TF, Spezani R, Marinho TS, Cardoso LEM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Cotadutide effect in liver and adipose tissue in obese mice. *J Mol Endocrinol*. 2023;70(3).
91. Jannat Ali Pour N, Zabihi-Mahmoudabadi H, Ebrahimi R, Yekaninejad MS, Hashemnia SMR, Meshkani R, Emamgholipour S. Principal component analysis of adipose tissue gene expression of lipogenic and adipogenic factors in obesity. *BMC Endocr Disord*. 2023;23(1):94.

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa

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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “**Agonismo de receptores duplos glp-1/gip (tirzepatida e obesidade induzida por dieta em camundongos)**” registrado com o nº 018/2022, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarin de Lacerda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 09/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/08/2026
Espécie / linhagem / raça	Camundongos da linhagem C57BL/6.
Nº de animais	360
Peso / Idade	20 gramas / 4 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 09 de agosto de 2022.

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

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

ANEXO B - Submissão artigo



Carlos Mandarim <mandarim.ca@gmail.com>

Manuscript submitted to Fundamental & Clinical Pharmacology

1 mensagem

Fundamental & Clinical Pharmacology <no-reply@atyponrex.com>
Para: Carlos Mandarim-de-Lacerda <mandarim@uerj.br>

17 de dezembro de 2024 às 10:06

Dear Carlos Mandarim-de-Lacerda,

Your manuscript "Brown Adipose Tissue in Menopausal Diabetic Obese Mice Treated with Tirzepatide (GIP/GLP-1 Agonist)" has been successfully submitted and is being delivered to the Editorial Office of *Fundamental & Clinical Pharmacology* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from the journal editorial office, typically within one business day. That message will confirm that the editorial office has received your submission and will provide your manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Fundamental & Clinical Pharmacology*.

Sincerely,
The Editorial Staff at Fundamental & Clinical Pharmacology