UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LETÍCIA DA SILVA PIRES

EFEITO COMBINADO DE AGONISTAS DE GLP-1R E GPR40 NO TRATAMENTO DA OBESIDADE EXPERIMENTAL

CAMPINAS

2022

LETÍCIA DA SILVA PIRES

EFEITO COMBINADO DE AGONISTAS DE GLP-1R E GPR40 NO TRATAMENTO DA OBESIDADE EXPERIMENTAL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na Área de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
LETÍCIA DA SILVA PIRES, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Morais e Oliveira - CRB 8/8985

Pires, Letícia da Silva, 1990-
P665e Efeito combinado de agonistas de *GLP-1R* e *GPR40* no tratamento da obesidade experimental / Letícia da Silva Pires. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Licio Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. GLP-1. 2. Liraglutida. 3. Hipotálamo. 4. Obesidade. I. Velloso, Licio Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Combined effect of GLP-1R and GPR40 agonists in the treatment of experimental obesity
Palavras-chave em inglês:
GLP-1
Liraglutide
Hypothalamus
Obesity
Área de concentração: Clínica Médica
Titulação: Doutora em Ciências
Banca examinadora:
Licio Augusto Velloso [Orientador]
Denise Engelbrecht Zantut Wittmann
Helena Cristina de Lima Barbosa
Joana Margarida Navalho Gaspar
Maria Lucia Bonfleur
Data de defesa: 26-08-2022
Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-2041-8741
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/6876342529561233

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LETÍCIA DA SILVA PIRES

ORIENTADOR: PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS

1. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

2. Profª. Drª. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

3. Profª. Drª. Helena Cristina de Lima Barbosa

4. Profª. Drª. Joana Margarida Navalho Gaspar

5. Profª. Drª. Maria Lucia Bonfleur

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data da defesa: 26/08/2022

Dedico este trabalho a todos que possam futuramente se beneficiar com os desdobramentos desta pesquisa e aos que acreditam na Ciência e no poder da educação.

“Todo recomeço, toda boa intenção

Toda ideia nova

Todas as noites que eu não dormi

Toda nova informação (...)

Vencer os contratempos (...)

Consciência e paciência

Intensas modificações

E a mais completa certeza

De que tudo vai dar certo.”

(Jota Quest, *Todas as janelas*)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar tudo possível e me fortalecer no caminho.

Aos meus pais, Jorge e Vera, minhas irmãs, Fernanda e Marina, e meu cunhado, Vítor, por serem apoio, carinho e segurança, por me incentivarem, acreditarem e viverem meus sonhos.

Ao meu marido, Igor, pelo amor, companheirismo, por acolher meus desabafos e minhas fragilidades, dando forças e alegria nos meus dias.

Ao professor Licio pela oportunidade, pela honra em fazer parte do time ímpar do LabSinCel e por ser exemplo de excelência, profissionalismo e humildade.

Ao professor Trond Ulven pela colaboração em sintetizar o agonista TUG-905 para realização deste trabalho.

À Erika Anne por toda empatia, preocupação e dedicação para comigo e meu trabalho. Por acreditar e não me fazer desanimar nas dificuldades, por caminhar junto e celebrar minhas conquistas.

Ao Pedro que não mediu esforços para me ajudar e tornar mais leve o percurso e pelo apoio e otimismo de sempre.

Ao Guilherme pela amizade, pelas conversas e pela dedicação, tranquilidade e qualidade em tudo que se propõe a fazer.

À Carina por toda ajuda, colaboração e disposição em todos os momentos que precisei.

A todos do LabSinCel por cada sugestão, palavra de apoio e troca de experiências que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos funcionários do LabSinCel, Erika, Joseane e Gerson pelo suporte.

Ao Márcio pelo cuidado com os camundongos e por ser tão solícito.

À UNICAMP, ao Departamento de Clínica Médica da FCM e ao OCRC por permitirem concluir mais uma etapa da minha carreira acadêmica.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das Bolsas de Doutorado Processos FAPESP 2017/14298-2 e 2020/08489-2.

RESUMO

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo que pode acometer 1 bilhão de pessoas em 2030. Estudos epidemiológicos indicam que o excesso de peso e a obesidade são fatores de risco para mais de 30 doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, hipertensão, doença renal e alguns tipos de câncer. Recentemente foi identificada uma alta correlação entre obesidade e mortes pela doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2. Mudanças no estilo de vida e intervenções farmacológicas ainda não se mostraram suficientes para prevenir ou conter a evolução da doença, promovendo uma perda de peso efetiva e duradoura. A nova classe de fármacos antiobesidade, os agonistas de GLP-1, avançam no sentido de reduzir até 15 % do peso corporal em um período de 68 semanas. Ainda que as perspectivas sejam promissoras, o controle da doença ainda está longe de ser o ideal. Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) têm sido amplamente estudados para potencial uso terapêutico, em especial o GPR40 é um receptor de ácidos graxos de cadeia média e longa que, como o GLP-1R, é expresso nas ilhotas pancreáticas e nos principais neurônios hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. Estudos pregressos demonstraram que o agonista de GPR40 promoveu redução da massa corporal em um modelo experimental de obesidade induzida por dieta. O presente trabalho aventa a hipótese de que a combinação dos agonistas de GLP-1 e de GPR40 pode ter um efeito positivo a longo prazo na obesidade, reduzindo o peso corporal e a inflamação induzida pela dieta. Camundongos machos swiss submetidos à 4 semanas de dieta hiperlipídica, receberam tratamento com agonistas de GLP-1, liraglutida, e de GPR40, TUG-905 durante 7 dias. Foram realizados controle de ingestão alimentar, peso corpóreo, glicemia de jejum, temperatura interescapular, teste de tolerância à glicose, respirometria e expressão por RT-PCR de genes de interesse. O sinergismo dos agonistas promoveu maior redução da massa corporal em relação ao obtido com ambos, quando administrados isoladamente. Além disso, a combinação dos compostos resultou em um aumento significativo na termogênese do tecido adiposo marrom. Assim, a combinação dos agonistas liraglutida e TUG-905 pode proporcionar avanço no tratamento da obesidade, buscando melhor prognóstico e maior qualidade de vida.

Palavras-chave: GLP-1; Liraglutida; Hipotálamo; Obesidade.

ABSTRACT

Obesity is one of the biggest public health problems in the world. Which could affect 1 billion people in 2030. Epidemiological studies indicate that overweight and obesity are risk factors for more than 30 non-communicable chronic diseases such as diabetes, hypertension, kidney disease and some types of cancer. Recently, a high correlation between obesity and deaths from the infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus has been identified. Lifestyle changes and pharmacological interventions have not yet been shown to be sufficient to prevent or contain the progression of the disease, promoting effective and lasting weight loss. The new class of anti-obesity drugs (GLP-1 agonists) advance towards reducing up to 15% of body weight in a period of 68 weeks. Although the prospects are promising, disease control is still far from ideal. G protein-coupled receptors (GPCRs) have been extensively studied for potential therapeutic use, in particular GPR40 is a medium and long-chain fatty acid receptor that, like GLP-1R, is expressed in pancreatic islets and major hypothalamic neurons involved in food intake regulation and energy expenditure. Previous studies had demonstrated that the GPR40 agonist promoted body mass reduction in an experimental model of diet-induced obesity. The present study has hypothesized that the combination of GLP-1 and GPR40 agonists may have a long-term positive effect on obesity, reducing body weight and diet-induced inflammation. Male Swiss mice submitted to 4 weeks on a high-fat diet were treated with agonists of GLP-1 (liraglutide) and GPR40 (TUG-905) for 7 days. Food intake; body weight; fasting glucose; interscapular temperature; glucose tolerance test; respirometry and RT-PCR genes expression of interest were measured. The synergism of the agonists promoted a greater reduction in body mass over that obtained using both compounds alone. Furthermore, the compounds combination resulted in brown adipose tissue thermogenesis significant increase. Thus, the combination of the agonists liraglutide and TUG-905 may provide advances in obesity treatment, aiming for a better prognosis and quality of life.

Keywords: GLP-1; Liraglutide; Hypothalamus; Obesity.

SUMÁRIO

1. Introdução 13

1.1 Obesidade e Índice de Massa Corporal (IMC) 13

1.2 Prevalência da Obesidade 14

1.3 Fisiopatologia da Obesidade 14

1.4 Controle endócrino da ingestão alimentar 15

1.5 Comorbidades da Obesidade 16

1.6 Tratamento da Obesidade 16

1.6.1 Alimentação 17

1.6.2 Atividade Física 18

1.6.3 Termogênese 19

1.6.4 Medicamentos 20

1.6.5 Cirurgia Bariátrica 24

1.7 Receptores acoplados à proteína G 25

1.7.1 Agonistas de GPCRs 26

1.8 Perspectivas para o tratamento da obesidade 27

2. Justificativa 28

3. Hipótese 28

4. Objetivos 29

4.1 Geral 29

4.2 Específicos 29

5. Materiais e Métodos 29

5.1 Modelo animal 29

5.2 Protocolos experimentais 30

6. Análise dos resultados 34

7. Resultados 35

7.1 Resumo dos experimentos realizados de outubro/17 a dezembro/19 35

7.2 A combinação de liraglutida e TUG-905 promoveu maior redução da massa corporal em comparação à administração isolada de liraglutida 36

7.3 Os tratamentos com TUG-905, mas não com liraglutida isoladamente, promoveram aumento da termogênese do tecido adiposo marrom 39

7.4 Efeitos das intervenções na expressão de neurotransmissores hipotalâmicos 41

7.5 Efeitos das intervenções na tolerância à glicose 42

7.6 Sob a técnica de pair feeding, o tratamento com TUG-905 correspondeu à redução da massa corporal promovida pela liraglutida isolada 42

7.7 A eficácia do tratamento com liraglutida foi evidenciada na dosagem de GLP-1 sérico por ELISA 43

8. Discussão 44

9. Conclusão 48

10. Referências 49

11. Anexos 55

11.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais 55

11.2 Aprovação do Adendo pela CEUA 56

11.3 Artigo para submissão 58

1. Introdução

1.1 Obesidade e Índice de Massa Corporal (IMC)

A obesidade é um distúrbio metabólico oriundo de múltiplas causas, sendo resultado de complexas interações entre fatores genéticos, psicológicos, socioeconômicos, culturais e ambientais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode afetar a saúde e é identificada em diferentes graus pelo Índice de Massa Corporal (IMC). Tal parâmetro é a razão entre o peso (kg) e a altura ao quadrado (m^2) de uma pessoa adulta. A classificação do IMC está representada na **Tabela 1**. (1).

Tabela 1. Classificação para adultos de acordo com o IMC (WHO, 2000 - adaptado).

Classificação	IMC (kg/m²)
Desnutrição	< 18,5
Peso normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25,0 – 29,9
Obesidade I	30,0 – 34,9
Obesidade II	35,0 – 39,9
Obesidade III	≥ 40

Um estudo realizado em 186 países, analisando as populações no período de 1975 a 2014, demonstrou que houve uma transição do baixo peso para sobrepeso e obesidade em todo o mundo. Tal fato se observa principalmente pelo aumento do Índice de Massa Corporal (IMC), aliado ao consumo elevado de alimentos ultraprocessados. Nos Estados Unidos, em particular, a partir da década de 1970 foi possível observar o crescimento do sedentarismo e as alterações no sistema alimentar, como o aumento da oferta de alimentos baratos, saborosos e com alto teor de energia; melhores formas de distribuição para tornar os alimentos muito mais acessíveis e convenientes; e um marketing de alimentos mais persuasivo e abrangente (2,3).

1.2 Prevalência da Obesidade

A prevalência global da obesidade para o ano de 2030 é que 1 em cada 5 mulheres e 1 em cada 7 homens terão um IMC ≥30kg/m², o que equivale a mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo. Enquanto que no Brasil haverá 29,7 % da população obesa, totalizando 50 milhões de adultos, classificando assim como um dos 20 países mais afetados pela obesidade no mundo (4).

1.3 Fisiopatologia da Obesidade

A obesidade consiste no acúmulo de gordura ocasionado por um desequilíbrio energético, que envolve sinais periféricos e sistema nervoso central. Em condições basais, nutrientes e hormônios oriundos de tecidos como pâncreas, tecido adiposo e estômago, predizem quanto ao estoque de energia. Estes sinalizadores permitem que populações neuronais no núcleo arqueado do hipotálamo, região que controla a ingestão alimentar e o peso corpóreo, respondam de formas distintas às diferentes condições nutricionais. No estado de jejum, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) estimulam o consumo de alimentos e diminuem o gasto energético, enquanto que em situação pós-prandial a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) inibem a ingestão alimentar e aumentam o dispêndio energético. Os hormônios circulantes, insulina e leptina, inibem os neurônios NPY/AgRP e estimulam os neurônios POMC/CART adjacentes, apresentando efeito fisiológico oposto quando em baixas concentrações. Por outro lado a grelina, peptídeo secretado pelo estômago durante o jejum, pode ativar os neurônios NPY/AgRP, estimulando assim a ingestão de alimentos (Figura 1) (5). Qualquer inadequação desse sistema de integração de sinais pode ser um fator perturbador da homeostase energética, podendo levar ao ganho de peso e alterações metabólicas. Estudos pregressos do nosso grupo identificaram, em modelo experimental, que o consumo de dieta hiperlipídica por apenas 12 horas resulta em uma regulação defeituosa da expressão hipotalâmica de POMC (6). Tal desregulação também ocorre em humanos, uma vez que em neurônios POMC gerados a partir de células-tronco pluripotentes humanas, o palmitato, um dos ácidos graxos saturados mais comuns, promoveu redução no processamento de POMC, resultando na diminuição da produção de β-endorfina e α-MSH (7). Em contrapartida, indivíduos saudáveis apresentam uma correlação inversa entre o

ganho de massa corporal após excessos e alterações nos níveis sanguíneos de β-endorfina derivada de POMC (6). Assim, a ingestão excessiva de gorduras pode ocasionar alterações precoces nos neurônios POMC e, consequentemente, aumentar a predisposição à obesidade (8).

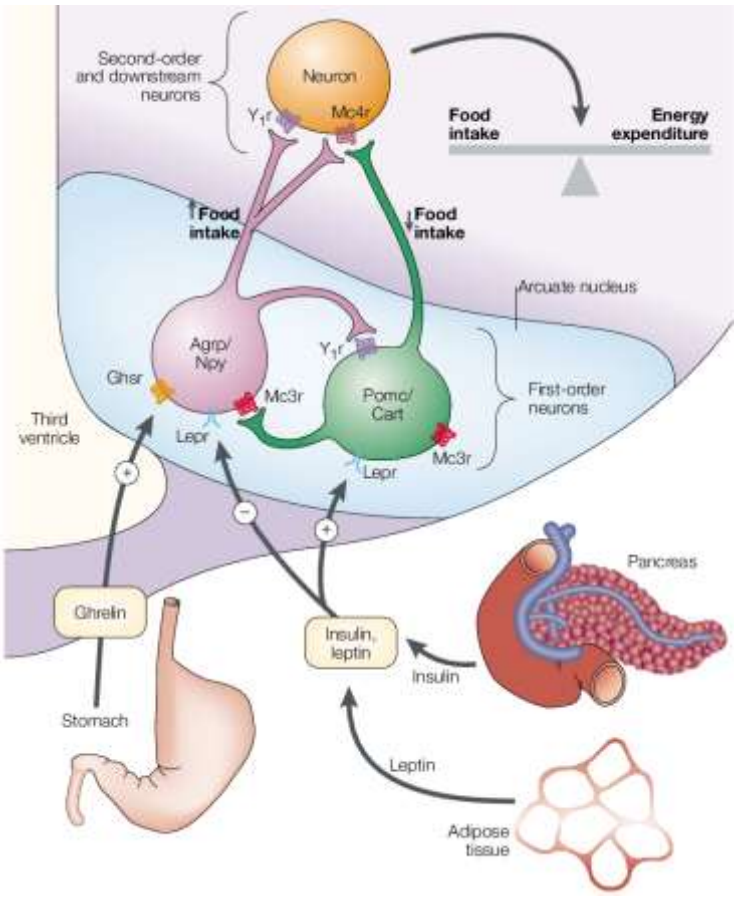


Figura 1. Controle da homeostase energética por neurônios de núcleo arqueado. Ghsr, receptor secretagogo do hormônio do crescimento; Lepr, receptor de leptina; Mc3r/Mc4r, receptor de melanocortina 3/4; Y1r, receptor do neuropeptídeo Y1 (5).

1.4 Controle endócrino da ingestão alimentar

Vários hormônios reguladores da ingestão de alimentos são secretados pelo trato gastrointestinal, fígado, pâncreas ou tecido adiposo e atuam conjuntamente no cérebro, em particular no hipotálamo, para modular a fome e a saciedade. Os hormônios intestinais podem ser classificados como reguladores de curto prazo da ingestão de alimentos, que são secretados em antecipação às refeições (grelina), em resposta a nutrientes [colecistocinina (CCK), peptídeo YY (PYY), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1), polipeptídeo insulinotrópico dependente de

glicose (GIP) e oxintomodulina (OXM)] ou na privação de nutrientes [glucagon, fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21)] e reguladores de longo prazo da ingestão alimentar, que sinalizam para o cérebro em proporção à a quantidade de gordura armazenada no corpo (leptina, insulina e amilina) (9).

1.5 Comorbidades da Obesidade

Para além da complexidade da doença *per se*, o aumento do IMC, bem como o acúmulo de gordura podem acarretar comorbidades que vão repercutir diretamente na qualidade e na expectativa de vida. Ressalta-se que há um risco elevado de mais de 30 doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), em diferentes graus, incluindo diabetes, hipertensão, doença renal e alguns tipos de câncer. Assim, o comprometimento não é somente na saúde individual, mas também na coletiva, tendo grandes implicações no sistema de saúde. Em 2019, o gasto direto com DCNT no Brasil atingiu R$ 6,8 bilhões, sendo 22 % desse valor (R$ 1,5 bilhão) atribuído ao excesso de peso e à obesidade. Ademais, houve 128,71 mil mortes, quase 496 mil hospitalizações e 31,72 milhões de procedimentos ambulatoriais realizados pelo SUS (10).

Recentemente, a pandemia de COVID-19 que ainda aflige o mundo, destacou uma alta correlação entre obesidade e mortes pela doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2. Essa associação pode ser até quatro vezes maior quando metade da população está em sobrepeso, chegando a totalizar 4,3 milhões de mortes. O esquema de vacinação proposto tem reduzido de forma bastante satisfatória os casos, a gravidade e os desfechos da infecção, entretanto, em países que têm ampla cobertura vacinal, ressaltaram que o excesso de peso permanece sendo um forte fator de risco e complicador do quadro (4).

1.6 Tratamento da Obesidade

Várias são as abordagens em nível político, social e educacional que visam reduzir os numerosos e preocupantes dados sobre o excesso de peso, de forma a atuar tanto na prevenção como no tratamento e, assim, garantir uma melhor qualidade de vida. Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) irá lançar neste ano um plano de ação para deter e combater a obesidade, incluindo recomendações preliminares para a prevenção e o manejo da doença ao longo da

vida. A OMS ainda aponta como estratégias eficazes a taxação de bebidas açucaradas, o subsídio de alimentos saudáveis e a disponibilidade de espaços que incentivem a atividade física (11).

Quando as medidas preventivas não são suficientes para controlar a doença, é proposto um algoritmo de tratamento para adultos obesos. A seleção para o manejo da obesidade é determinada pelo IMC e pelos riscos cardiovasculares do indivíduo. Se a faixa de IMC é entre 25 e 29,9 kg/m², na ausência de comorbidades, aconselha-se à prevenção do ganho de peso. Entretanto, havendo um ou mais fatores de risco, a indicação é aliar dieta, exercício e terapia comportamental para redução do peso corpóreo. Em se tratando de IMC acima de 27 com comorbidades ou acima de 30 kg/m², que não apresentaram resultados satisfatórios, os quais consistem em voltar à linha de base do risco para as comorbidades, apenas com mudanças no estilo de vida, recomenda-se o tratamento farmacológico. Enquanto que a cirurgia bariátrica é uma opção apenas para pacientes com IMC superior a 40 kg/m² ou acima de 35 com comorbidades (12).

1.6.1 Alimentação

Em contrapartida às dietas restritivas, o Guia Alimentar para a População Brasileira, elaborado pelo Ministério da Saúde em 2014, propõe uma alimentação equilibrada, variada, priorizando alimentos *in natura* em detrimento dos ultraprocessados e reduzindo as quantidades consumidas de açúcar, sal e óleo. A partir de um plano alimentar mais flexível, visando à reeducação, a velocidade da perda de peso geralmente é mais lenta, porém mais sustentável e com metas mais realistas (13).

A intervenção dietética no tratamento da obesidade visa melhorar a saúde do indivíduo com a adoção de hábitos alimentares mais saudáveis e que se mantenham por toda a vida. Para além da escolha da dieta mais adequada e a quantidade de calorias, deve-se levar em consideração as preferências alimentares, a condição socioeconômica, a cultura e a disponibilidade de acesso e de preparo dos alimentos. Existem diversas dietas e programas para induzir a perda de peso, mas o ponto comum é fornecer um déficit calórico que promova um balanço energético negativo (13).

As dietas de muito poucas calorias (VLCDs) fornecem menos de 800 kcal/dia e é possível haver uma redução de 15 a 20 % do peso inicial em 12 a 16 semanas. Tal abordagem poderia ser mais segura quando na presença de suplementação de vitaminas e minerais e frente a métodos que sustentem a perda de peso obtida. Enquanto que as dietas de poucas calorias (LCDs) contêm 800 a 1500 kcal/dia, geram uma perda de 8 a 10 % do peso inicial durante 16 e 26 semanas. Assim, é possível obter uma redução importante do peso corpóreo com as dietas anteriormente citadas, podendo ser um estímulo ao paciente muito obeso, porém que não se mantém a longo prazo. Dessa forma, são necessárias outras modalidades terapêuticas para manter a perda de peso (12).

Ainda que a alimentação saudável seja um dos alicerces para o controle do excesso de peso e da obesidade, muitos indivíduos têm dificuldade em aderir à ela, principalmente, e permanecerem nos programas de emagrecimento, o que resulta na recuperação do peso pré-tratamento em 1 a 5 anos e somente em 11 % dos casos é observado uma manutenção da perda de 5 kg ou mais. Assim, o tratamento dietético tem mais êxito quando associado à atividade física (13).

1.6.2 Atividade física

Todo movimento realizado seja em tarefas domésticas, trabalho diário, como parte de recreação e lazer ou como meio de transporte ou exercício (caminhada e ciclismo) é considerada uma atividade física. A magnitude dos benefícios, não só na perda de peso, mas também na saúde cardiovascular, na incidência de diabetes, câncer e outras doenças, depende da frequência, duração e intensidade dos exercícios executados. Para tal, a OMS publicou em 2020, recomendações direcionadas a diferentes grupos populacionais e faixas etárias. Em se tratando de adultos com 18 a 64 anos de idade é indicado fazer pelo menos 150-300 minutos de atividade física aeróbica de intensidade moderada ou pelo menos 75-150 minutos de intensidade vigorosa. Além de ser desejável realizar atividades de fortalecimento muscular em intensidade moderada em 2 ou mais dias por semana, pois proporcionam benefícios adicionais à saúde (14).

Considerando que o exercício físico, como medida preventiva a doenças, não associado a um programa de emagrecimento resulta em uma modesta perda de peso e ainda assim quando conciliado com uma LCD reduz de 2 a 3 kg em 16 a 26

semanas, ressalta-se que a principal contribuição da atividade física é o auxílio na manutenção de um peso saudável (12). No tratamento da obesidade, exercitar-se visa melhorar a saúde geral e não apenas perder peso. É recomendável que se procure profissionais qualificados, aptos a individualizar e adequar os programas de exercício físico, principalmente quando há a presença de comorbidades cardíacas, pulmonares e com risco ortopédico (15).

Ao iniciar a prática de exercícios, ressalta-se que a intensidade deve começar em nível leve e por períodos mais curtos, aumentando progressivamente até atingir o ideal de 150 a 300 minutos de atividade física moderada por semana ou 75 minutos de atividade física vigorosa, a fim de prevenir a recuperação do peso, aumentar a perda ponderal e melhorar o condicionamento físico (16,15).

1.6.3 Termogênese

Além do dispêndio energético proporcionado no exercício físico, é possível que haja gasto de energia por meio da termogênese. Este processo consiste em gerar calor para manter a temperatura corporal ou para realizar a digestão e o processamento dos alimentos oriundos da dieta (efeito térmico dos alimentos). O tecido adiposo marrom (BAT) está localizado na área interescapular de roedores e nas regiões supraclavicular, suprarrenal, pericárdica e para-aórtica, e também ao redor do pâncreas, rim e traqueia em humanos. Nestes, a princípio o BAT foi detectado somente em recém-nascidos para termorregulação, mas em 2009, foi identificado por 18F-FDG PET–CT em adultos sugerindo uma possível participação no metabolismo, alterando a sensibilidade à insulina e modificando a suscetibilidade ao ganho de peso (17,18).

Os adipócitos marrons têm em sua composição pequenas gotículas lipídicas multiloculares e abundância de mitocôndrias, as quais contém em sua estrutura uma proteína específica do BAT, a proteína desacopladora 1 (UCP1). Quando há exposição ao frio, principalmente, o sistema nervoso simpático libera norepinefrina que irá se ligar aos receptores β3 adrenérgicos nos adipócitos, levando à ativação da adenilil ciclase, ao aumento nos níveis de AMPc e à ativação da proteína quinase A (PKA). Assim, há a indução de lipólise nos adipócitos marrons. Portanto, é de grande valia investigar nutrientes, estímulos ambientais e medicamentos que

possam recrutar e ativar o BAT como estratégia para o tratamento da obesidade e suas comorbidades (19,20).

1.6.4 Medicamentos

Quando a abordagem comportamental ou a busca por compostos eficazes para estimular o BAT é insuficiente para conter a evolução da doença e os fatores de risco, ou ainda, as metas alcançadas estão aquém das estipuladas para os casos severos de obesidade, o tratamento medicamentoso pode complementar a terapêutica para pacientes obesos ou em sobrepeso com comorbidades (13).

Atualmente, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 5 medicamentos antiobesidade: orlistate, fentermina-topiramato, naltrexone-bupropiona, liraglutida e semaglutida (Tabela 2) . Enquanto que no Brasil, a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é válida para sibutramina, orlistate, liraglutida e naltrexone-bupropiona, este último ainda não está sendo comercializado no Brasil. A partir desse arsenal farmacoterapêutico, a escolha mais adequada deve ser resultado de uma análise individualizada, correspondendo às demandas clínicas e monetárias do paciente, com supervisão médica constante (21,22).

Os medicamentos aprovados atuam em vias do sistema nervoso central, a fim de reduzir o apetite ou aumentar a saciedade, exceto o orlistate que diminui a absorção de gordura. Para a aprovação da FDA, o novo medicamento deve induzir perda de peso, ajustada por placebo, maior que 5 % em 1 ano ou garantir que mais de 35 % dos pacientes atinjam perda de peso acima de 5 %, sendo pelo menos duas vezes aquela induzida por placebo. Além disso, a FDA também exige que o medicamento mostre evidências de melhora nos biomarcadores metabólicos, incluindo pressão arterial, níveis de lipídios e controle glicêmico (23).

O orlistate é um inibidor de lipases gastrintestinais, indicado para pacientes que não desejam fazer uso de um medicamento sistêmico e que tenha consumo moderado a alto de dietas ricas em gorduras. Aprovado em 1999, inclusive para crianças a partir dos 12 anos, atua impedindo a digestão e absorção de triglicerídeos, sendo eliminados nas fezes. Embora tenha benefícios no déficit calórico, na pressão arterial, insulinemia e glicemia, esse fármaco pode acarretar uma deficiência de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), além de esteatorreia,

incontinência fecal e flatulência, o que dificulta a adesão e manutenção do paciente no tratamento (13).

Tabela 2. Medicamentos aprovados para o tratamento a longo prazo da obesidade (21 - adaptado).

Drugs approved for long-term treatment of obesity

Drug and class	Ideal candidates	Adverse effects
Orlistat (lipase inhibitor) 1999	Patients who do not want to take a systemic drug, or patients who eat a moderate- or high-fat diet	Flatulence, oily spotting, decreased absorption of medications and fat-soluble vitamins
Naltrexone-bupropion (opioid receptor antagonist and DNRI) 2010	Patients with depression, those interested in smoking cessation	Headache, nausea, constipation, vomiting, dry mouth
Phentermine-topiramate ER (sympatho-mimetic amine and GABA receptor modulator) 2012	Patients with chronic migraines	Dizziness, neuropathy, insomnia, and dry mouth
Liraglutide Semaglutide (GLP-1 receptor agonist) 2014 (L) 2021 (S)	Patients with coronary artery disease, prediabetes, and diabetes	Diarrhea, nausea, headache Increased incidence of diabetic retinopathy

A fentermina-topiramato, aprovada em 2012, é uma combinação de anorexígeno e antiepiléptico, indicada para pacientes com enxaqueca crônica, que inibe o apetite de forma a diminuir a fome ou aumentar a sensação de saciedade. O exato mecanismo ainda não é bem compreendido, mas há uma modulação de vários neurotransmissores e a comprovação de que esse medicamento duplo supera a monoterapia por proporcionar melhor perda de peso e atenuação dos efeitos adversos. Estes podem caracterizar uma neuropatia periférica, geralmente transitória, que inclui insônia, boca seca e constipação (23).

O fármaco naltrexone-bupropiona com aprovação da FDA em 2010 e da ANVISA em 2021 atua no hipotálamo, aumentando a saciedade e a atividade de POMC para reduzir a ingestão de alimentos, e no sistema de recompensa, sendo indicado para pacientes com depressão e dependência de nicotina e/ou álcool. Os efeitos colaterais relatados são náuseas, constipação, dor de cabeça, vômitos, tontura, boca seca e diarreia (23).

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) é um hormônio endógeno incretínico, clivado do pró-glucagon no intestino e secretado pelas células L do íleo e do cólon, frente ao consumo de nutrientes. O GLP-1 tem efeitos sobre o metabolismo glicêmico, uma vez que estimula a secreção de insulina, suprime a secreção de glucagon, retarda o esvaziamento gástrico, diminui o apetite, melhora a sensibilidade à insulina e reduz a glicose circulante. Entretanto, pacientes diabéticos têm um efeito incretínico deteriorado e uma liberação prejudicada de GLP-1, o que leva à necessidade de ampliar a estimulação e a ação desse hormônio. Para tanto, substâncias que mimetizem a incretina, podendo atuar tanto no metabolismo da glicose quanto na regulação da ingestão alimentar, são potenciais estratégias terapêuticas para o diabetes e a obesidade. Neste contexto, os análogos de GLP-1 mais pesquisados atualmente são a liraglutida e semaglutida (24,25).

A liraglutida é um agonista de receptor de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) injetável, usado primeiramente para tratar diabetes mellitus tipo 2 e a partir de 2014 também para tratar a obesidade. Essas finalidades são possíveis devido ao fato desse medicamento atuar nas vias de receptores periféricos e centrais, afetando a homeostase da glicose, ingestão alimentar e saciedade. O agonista em questão tem 97 % de homologia com o GLP-1 nativo e consegue estender a meia-vida de circulação do GLP-1 de 1-2 minutos para 13 horas. Indicado para adultos e crianças acima de 12 anos, com doença arterial coronariana, pré-diabetes ou diabetes, possui alguns efeitos adversos transitórios e com intensidade de leve a moderada, como náuseas, vômitos e diarreia (13).

A semaglutida pertence a mesma classe da liraglutida, porém é recomendada somente para adultos, a injeção é semanal e não diária, tem 94 % de homologia com o GLP-1 nativo e ainda não se encontra no mercado brasileiro, apenas foi aprovada pela FDA em 2021. Este fármaco tem como alvo áreas do cérebro que

regulam o apetite e a ingestão alimentar. A dose deve ser escalonada para reduzir os efeitos colaterais gastrointestinais e os estudos realizados até o momento indicam uma perda de peso de aproximadamente 15 % em 68 semanas, para pacientes não diabéticos (26,27).

A sibutramina, aprovada pela FDA em 1997 e pela ANVISA em 1998, reduz a ingestão alimentar por bloquear a recaptação de noradrenalina e de serotonina, permitindo a perda de peso de 5 a 10 %. Entretanto, esse medicamento pode acarretar uma elevação de 3-5 mmHg na pressão arterial diastólica e de 2 a 4 bpm na freqüência cardíaca. Tais observações foram melhor analisadas no estudo SCOUT (*Sibutramine Cardiovascular Outcomes Trial*), o qual mostrou um aumento de 16 % do risco de eventos cardiovasculares em indivíduos de muito alto risco. Assim, a sibutramina foi suspensa no mercado internacional em 2010, enquanto que no Brasil a ANVISA manteve o uso com ressalvas. Em 2007, o fármaco recebeu tarja preta, alertando que o abuso pode causar dependência, embora sem evidências e, a partir de 2011, é exigido um “Termo de Responsabilidade do Prescritor” (13).

Ao selecionar o medicamento mais adequado, é imprescindível o acompanhamento médico e de outros profissionais que possam avaliar a perda de peso, a segurança e a tolerabilidade, bem como adequar o nível de atividade física e fazer o controle da ingestão alimentar. Recomenda-se realizar as avaliações mensalmente, nos primeiros 3 meses, e depois pelo menos a cada 3 meses (21).

A magnitude da eficácia dos medicamentos mencionados frente à redução do peso corporal pode ser representada a seguir:

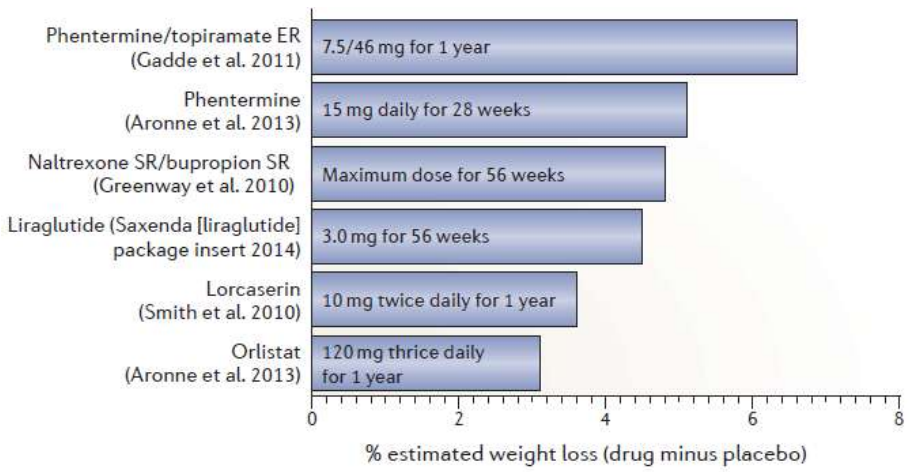


Figura 2. Eficácia das drogas antiobesidade. A porcentagem de perda de peso estimada (droga menos placebo) para seis medicamentos antiobesidade. ER, liberação prolongada; SR, liberação sustentada (23).

OBS: a lorcaserina foi descontinuada em 2020 por potencial risco de câncer.

O sucesso do tratamento da obesidade consiste em sustentar uma perda de peso de, no mínimo, 5 % do constatado no início da intervenção, além da melhora do estado geral da saúde. É possível haver uma evolução clínica de alguns fatores de risco cardiovascular com a redução de 3 a 5 % do peso, entretanto as altas taxas de recorrência, aliada à cronicidade da doença, requer benefícios maiores (13).

1.6.5 Cirurgia Bariátrica

Em última instância, a cirurgia bariátrica pode ser indicada para pacientes de 18 a 65 anos, com IMC > 40 kg/m² ou IMC > 35 kg/m² com uma ou mais comorbidades, que não tiveram êxito suficiente com as mudanças no estilo de vida e com a farmacoterapia e, portanto, têm sua expectativa de vida comprometida e aumento da mortalidade. As técnicas cirúrgicas existentes devem ser discutidas com a equipe multiprofissional e o paciente, assim como o pré-operatório deve ser minucioso e bem elaborado a fim de evitar qualquer intercorrência. Os benefícios da cirurgia bariátrica vão além da perda de peso, uma vez que é possível reduzir a inflamação crônica envolvida na obesidade, melhorar as comorbidades, alterar os biomarcadores e a microbiota intestinal. Todavia, os efeitos adversos podem incluir fístulas, infecções, hemorragia, tromboembolismo pulmonar, deficiência de vitaminas, entre outros, sendo imprescindível o acompanhamento regular no pós-operatório. Para constatar o procedimento bem sucedido, é necessária a perda ponderal de no mínimo 50 % do excesso de peso e não mais o estado nutricional de obesidade severa, mantendo-se por 5 anos, já que o reganho pode ocorrer até esse período (13).

Compreender a complexidade da doença, incluindo a possibilidade de reganhar o peso perdido, bem como a resposta dos pacientes às terapias propostas, revela a inter-relação de múltiplos mecanismos e, portanto, é necessário produzir agentes com ação máxima, envolvendo o sistema nervoso central e a periferia, e minimizando os efeitos colaterais. Atualmente, a pesquisa é direcionada para o desenvolvimento de tratamentos combinados baseados nos hormônios intestinais de

uma forma que imita as alterações que se seguem após a perda de peso induzida cirurgicamente (28,29).

1.7 Receptores acoplados à proteína G

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) têm sido amplamente estudados para potencial uso terapêutico, uma vez que estão expressos em vários tecidos, regulam muitos processos fisiológicos (Figura 3) e possuem sítios de ligação acessíveis na superfície celular. Os GPCRs possuem 7 domínios transmembrana, sendo o N terminal extracelular e o C terminal intracelular, representando a maior família de proteínas alvo de medicamentos com aproximadamente 34 % de todos os fármacos aprovados pela FDA atuando em um GPCR específico. Dentre as indicações de doenças que podem se beneficiar com tais agentes estão hipertensão, diabetes, neoplasias, doença de Alzheimer e obesidade (30,31).

Um importante GPCR, além dos 800 membros, é o GPR40 identificado em 1997, codificado pelo gene FFAR1 (receptor de ácidos graxos livres 1). O GPR40 está altamente expresso no pâncreas, intestino e cérebro, em especial no hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral e núcleo caudado. A ativação desse GPCR ocorre por meio de ácidos graxos livres de cadeias médias e longas, como os poliinsaturados ácido araquidônico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA). Uma vez ativado, o GPR40 promove um aumento na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS), seja pela estimulação da secreção de insulina das células β pancreáticas ou pela produção de hormônios incretínicos, como GLP-1 e GIP, a partir de células enteroendócrinas. Tais efeitos deste receptor tornaram-no alvo potencial para o tratamento do diabetes tipo 2 (33,34).

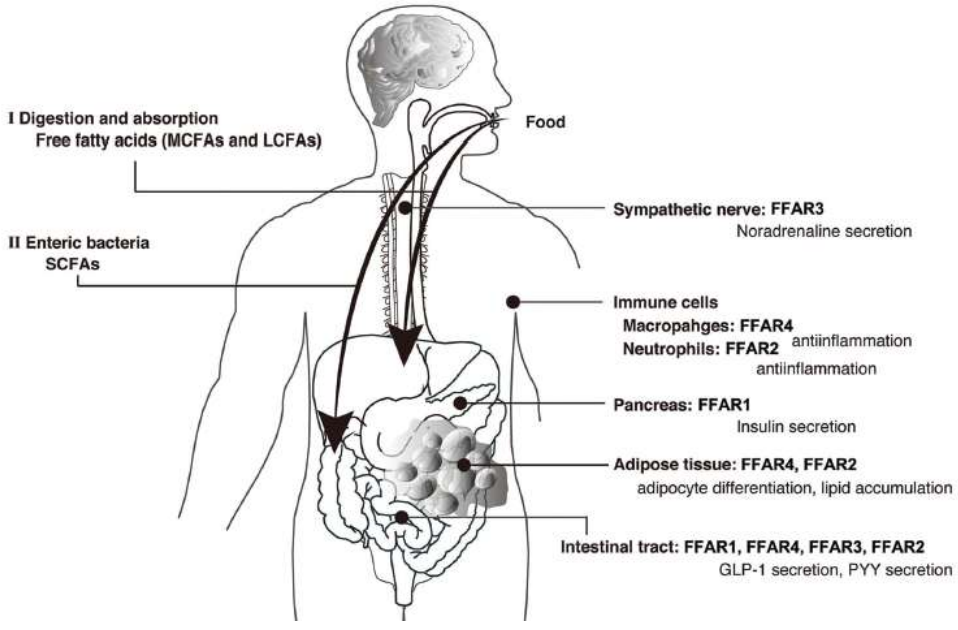


Figura 3. Funções fisiológicas dos receptores de ácidos graxos livres (FFARs). Os ácidos graxos de cadeia média e longa derivados da gordura da dieta atuam como ligantes para FFAR1 ou FFAR4 (I). Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos por bactérias intestinais a partir de fibras alimentares não digeríveis atuam como ligantes para FFAR3 ou FFAR2 (II) (32).

1.7.1 Agonistas de GPCRs

Em 2010, o composto TAK-875 foi identificado como um agonista de GPR40 potente, seletivo e biodisponível por via oral, reduzindo a glicemia e com ação insulinotrópica em um modelo de ratas que desenvolve obesidade e características relacionadas, como tolerância diminuída à glicose, hiperinsulinemia e hiperlipidemia. Esse agonista possui um perfil farmacocinético que permite a eficácia de ação prolongada e, portanto, foi utilizado em ensaios clínicos para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Nas fases I e II, foram observadas redução na glicemia de jejum e pós-prandial e na hemoglobina glicada (HbA1c) com eficácia igual à da sulfoniluréia glimepirida sem induzir hipoglicemia ou evidência de toxicidade de células β. Embora tenha alcançado ensaios clínicos de fase III para o tratamento do diabetes, foi necessário interromper o estudo devido à toxicidade hepática (32,35).

Mais recentemente, o agonista de GPR40 identificado em 2015, SCO-267 está sendo utilizado em estudo de fase I com adultos saudáveis e pacientes diabéticos, no qual demonstrou ser seguro e bem tolerado. Os efeitos destacados até o momento incluem a estimulação da secreção de insulina, glucagon, GLP-1, GIP e peptídeo YY em adultos saudáveis. Enquanto que, em pacientes com diabetes, é possível diminuir a hiperglicemia de jejum e melhorar o controle glicêmico, sem induzir hipoglicemia, durante um teste de tolerância oral à glicose. Tais benefícios conduzem o agonista SCO-267 para o ensaio clínico de fase II, sendo um potencial medicamento para o tratamento do DM2 (37).

Devido à importância da família dos GPCRs nos processos fisiológicos, a busca por agonistas e ligantes seletivos e de alta afinidade é de grande interesse não só para explorar as funções farmacológicas dos ácidos graxos livres, mas também para desenvolver potenciais candidatos para uso clínico, principalmente relacionados à obesidade e ao diabetes. Assim, novas pesquisas têm sido

conduzidas e outros agonistas têm ganhado destaque, como o TUG-905, agonista seletivo e potente de GPR40 humano e de camundongo, identificado e sintetizado em 2012 (32,38).

Estudos recentes, desenvolvidos pelo nosso grupo, utilizaram agonistas seletivos para o GPR120 (TUG-1197), GPR40 (TUG-905) e para ambos (GW-9508) em camundongos swiss para avaliar a expressão e a função desses receptores no hipotálamo. Os receptores de ácidos graxos poliinsaturados GPR40 e GPR120 são expressos em neurônios NPY e POMC e na micróglia, respectivamente, e exercem uma série de efeitos sistêmicos benéficos para doenças metabólicas e inflamatórias. Foi possível reduzir o peso corpóreo e a inflamação hipotalâmica, diminuindo TNF-α e IL-1β (marcadores inflamatórios) e aumentando IL-6 e IL-10 (marcadores anti-inflamatórios). Além de ter maior expressão gênica de neurônios POMC e, com o agonista duplo, houve diminuição da eficiência energética e da inflamação associada à obesidade, corroborando o potencial terapêutico no tratamento da obesidade (39).

Outro trabalho relevante do nosso grupo demonstrou que a ativação farmacológica do GPR40 aumenta a neurogênese no hipotálamo. O TUG-905 aumentou a proliferação e a sobrevivência de células hipotalâmicas em camundongos adultos. Ao atuar em sinergia com o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a interleucina 6 nas neuroesferas pós-natais, a ativação de GPR40 aumentou a expressão de dupla cortina (proteína de migração neuronal) durante a fase de diferenciação precoce e do marcador neuronal maduro, proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP2), durante a fase de diferenciação tardia. Enquanto que, na linhagem celular proliferativa Neuro-2a, o TUG-905 aumentou a expressão de BDNF e ativou a proteína p38. Assim, o GPR40 atua através da p38 e do BDNF para induzir a neurogênese hipotalâmica e, portanto, suscita o desenvolvimento de compostos que possam restaurar a atividade hipotalâmica no envelhecimento, na obesidade e nas doenças metabólicas (40).

1.8 Perspectivas para o tratamento da obesidade

O futuro da farmacoterapia da obesidade deve consistir em agentes de ação máxima que compreendam o sistema nervoso central e a periferia, minimizando os efeitos colaterais e que garantam segurança e eficácia a longo prazo. Ademais, buscam-se opções de tratamento menos invasivas e baseadas em moléculas que

induzam a lipólise, aumentem o gasto energético e restaurem a homeostase energética sem afetar outras funções sistêmicas. Até o momento, as formas injetáveis apresentam melhor biodisponibilidade e farmacocinética e podem ser mais eficientes quando em esquemas de coquetéis ou injeções múltiplas de agentes de ação curta e longa (29).

O presente trabalho propõe a combinação do agonista de GPR40, TUG-905, e o agonista de GLP-1, liraglutida, com o intuito de potencializar os efeitos benéficos de ambos no tratamento da obesidade experimental. Tendo em vista que os neurônios POMC, os quais fornecem sinais anorexigênicos importantes no hipotálamo, expressam o receptor de GLP-1 e também o receptor de ácidos graxos poliinsaturados GPR40, é possível que a combinação dos dois agonistas (TUG-905 e liraglutida) tenha um efeito positivo a longo prazo na obesidade, reduzindo a ingestão alimentar e a inflamação induzida pela dieta. Uma melhor compreensão dessas vias pode levar a novos alvos terapêuticos, estratégias de prevenção mais efetivas e, portanto, medicamentos personalizados.

2. Justificativa

As expectativas para o tratamento farmacológico antiobesidade ainda não foram atendidas em termos de segurança, eficácia e manutenção de perda de peso a longo prazo. Utilizar ligantes de alta afinidade e seletividade permite explorar funções farmacológicas e desenvolver potenciais alvos terapêuticos.

3. Hipótese

A combinação do agonista de GPR40, TUG-905, com o agonista de GLP-1R, Liraglutida, pode potencializar os efeitos isolados de cada um dos compostos no tratamento da obesidade experimental.

4. Objetivos

4.1 Geral

Avaliar o efeito da combinação de agonistas de GPR40 e GLP-1 para o tratamento da obesidade experimental.

4.2 Específicos

4.2.1 Avaliar o hipotálamo dos camundongos com obesidade induzida pela dieta, no que se refere à expressão de neuropeptídeos anorexigênicos e orexigênicos e de marcadores inflamatórios frente à administração dos agonistas propostos.

4.2.2 Avaliar o potencial efeito da ativação do GPR40 no peso corpóreo, na ingestão alimentar e nos metabolismos energético e glicêmico.

4.2.3 Avaliar a possível relação com o tecido adiposo marrom e a termogênese.

5. Materiais e Métodos

5.1 Modelo animal

A linhagem utilizada foi de camundongos Swiss, machos, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), com quatro semanas de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, acondicionados em ambiente mantido a 22°C–24°C, com ciclo fixo claro / escuro (12/12 horas), recebendo água potável e ração *ad libitum* até a quinta semana de vida. A partir da sexta semana foi introduzida a dieta hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados, correspondendo a 60 % do valor energético total) a todos os camundongos e assim permaneceram por 4 semanas. A composição das dietas está apresentada na Tabela 3. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, sob os protocolos 4639-1/2017 e 4639-1(A)/2020.

Tabela 3. Composição das dietas controle e hiperlipídica utilizadas nos experimentos.

Ingrediente	Controle (Ração)	Hiperlipídica (60 %)
Sacarose		100
Dextrina		132
Amido de milho	550	115,5
Caseína	225	200
Óleo de Soja	45	40
Banha animal		312
Mix Minerais	50	35
Mix Vitaminas	50	10
Fibras	80	50
L-cistina		3
Bitartarato de Colina		2,5
TOTAL (g)	1000	1000
kCal CHO	2400	1430
kCal PTN	765	680
kCal LIP	405	3168
kCal total	3570	5278
% CHO	67,23	27,09
% PTN	21,43	12,88
% LIP	11,34	60,02
ENERGIA (Kcal/g)	3,57	5,28

5.2 Protocolos experimentais

O desenho experimental está representado na figura 4:

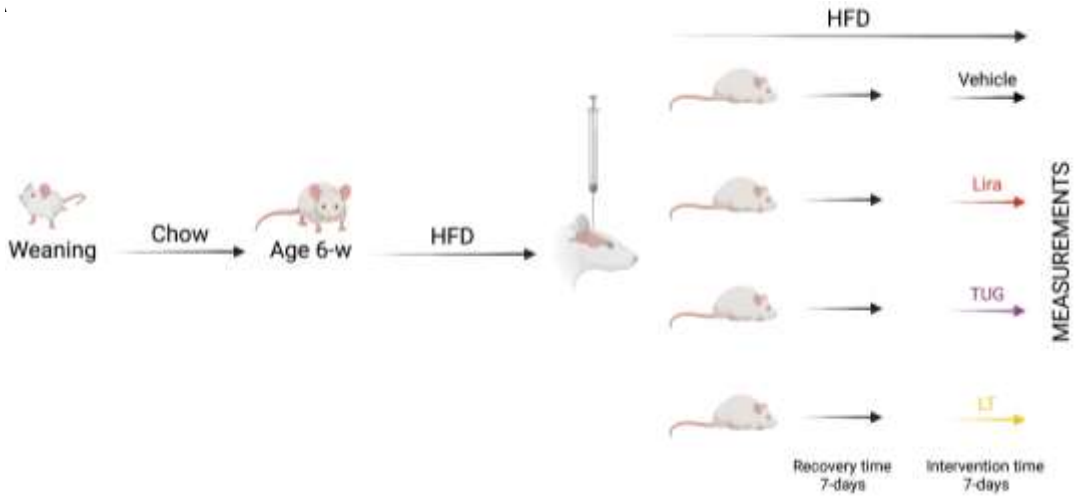


Figura 4. Esquema do desenho experimental. Os animais foram obtidos com 4 semanas de vida, recebendo dieta ração até a quinta semana. Em seguida, foi introduzida dieta hiperlipídica por 4 semanas, quando foi realizada a cirurgia estereotáxica. Após o período de recuperação e confirmação da posição correta da cânula, os animais foram divididos nos grupos de estudo e submetidos às análises de interesse antes, durante e após a intervenção.

5.2.1 Implantação de Cânulas no Ventrículo Lateral

Ao completar 4 semanas em dieta hiperlipídica, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no ventrículo lateral do hipotálamo com as seguintes coordenadas: anteroposterior, 0.34 mm; lateral, 1.0 mm; e profundidade, 2.2 mm. Após cinco dias, o posicionamento correto da cânula foi testado por avaliação da resposta dipsogênica provocada por angiotensina II intracerebroventricular (ICV) (10^{-6} M).

5.2.2 Tratamento com agonistas

Todos os camundongos foram pesados, numerados e submetidos à separação do escore Z de massa corporal em quatro grupos: veículo (HFD), liraglutida (LIRA), TUG-905 (TUG) e liraglutida + TUG-905 (LT). Os tratamentos foram administrados pelas vias ICV (TUG-905, 2 µL, 1 mM) e intraperitoneal (IP) (liraglutida, 100 µL, 1,0 mg/kg) uma vez por dia durante 7 dias. A liraglutida foi adquirida da Novo Nordisk (Bagsværd, Dinamarca), o TUG905 foi sintetizado na Universidade de Copenhague pelos colaboradores dinamarqueses deste trabalho e o veículo foi uma solução de DMSO com PBS e etanol (38,41,42).

5.2.3 Evolução Ponderal e Ingestão Alimentar

Os animais tiveram o peso corpóreo e a ingestão alimentar mensurados diariamente, pela manhã, e após a eutanásia foi coletado o tecido adiposo epididimal para determinação da massa.

5.2.4 Temperatura Interescapular

Antes do início e ao final do tratamento foram registradas imagens dos camundongos, no período da tarde, por meio de câmera termográfica (FLIR T430sc, FLIR Systems), e analisadas em software específico (ResearchIR 4.0) com delimitação da região de interesse e com contraste rainbow, disponível na paleta de cores do programa.

5.2.5 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Glicemia de jejum

Ao 5° dia de tratamento, os animais foram submetidos ao GTT. Após protocolo de jejum já estabelecido em nosso laboratório, foi feita a coleta de sangue para dosagem de glicemia basal (tempo 0). Em seguida, os animais receberam glicose a 25 % intraperitonealmente na dose de 1 g/kg. Amostras de sangue da veia da cauda foram utilizadas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose para a determinação das concentrações de glicose. Os valores obtidos durante o teste permitiram a construção gráfica da área sob a curva (AUC). Antes da coleta de tecidos no final do tratamento, a glicemia de jejum foi aferida em camundongos após jejum de 4 horas. Os níveis de glicose no sangue foram medidos com um glicosímetro portátil OptiumTM mini (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, EUA) usando as tiras de teste apropriadas.

5.2.6 Respirometria

Nos 5° e 6° dias de tratamento, os animais tiveram seu consumo de O_2, produção de CO_2 e Quociente Respiratório (RQ) determinados através do analisador de gases *LE405 Gas Analyser (Panlab – Harvard Apparatus)*. Os camundongos foram alojados individualmente em câmaras respiratórias claras e o ar ambiente passou pelas câmaras a uma taxa de fluxo de 10 vezes o peso corporal de cada animal. As análises foram realizadas em um período de 24 horas, os dados foram gerados no software *Metabolism 2.2v* e o quociente respiratório foi calculado como $VCO_2/V\ O_2$.

5.2.7 Pair Feeding

Foi realizado o protocolo de alimentação em pares com o intuito de determinar até que ponto o efeito do tratamento no peso corporal ocorreu de forma independente de mudanças na ingestão alimentar. Para a técnica de *pair feeding*, o grupo de estudo com menor consumo alimentar (LIRA) recebeu dieta hiperlipídica *ad libitum* e, a cada 24 horas, o total realmente ingerido era mensurado e a mesma quantidade de dieta era oferecida aos demais grupos para garantir ingestão calórica semelhante de todos os camundongos.

5.2.8 Extração de tecidos e hipotálamo

Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) e xilazina(10 mg/kg) e, quando os reflexos corneanos e a reação da pata à dor foram abolidos, sucedeu-se à eutanásia por decapitação. Foram extraídos hipotálamo, fígado e tecidos adiposos branco e marrom, além da coleta de sangue para dosagem de hormônios. Os tecidos foram utilizados para a realização da técnica de PCR, a fim de analisar a expressão gênica de neuropeptídeos anorexígenos e orexígenos, citocinas inflamatórias, GPRs de interesse e genes relacionados à termogênese e à lipogênese.

5.2.9 Extração de RNA e Real Time PCR

O RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen Corp.) comercialmente disponível e depois centrifugado a 10.500 rpm para isolamento do RNA total. A concentração de RNA foi determinada espectrofotometricamente usando um Eon Microplate Spectrofotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA), que conta com o Gen5 2.0 Data Analysis Software. Alíquotas de RNA foram submetidas à transcrição reversa utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems). Primers para neuropeptídeo Y (NPY) (Mm00445771_m1), peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) (Mm00475829_g1), pró-opiomelanocortina (POMC) (Mm00435874_m1), transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Mm04210469_m1), hipocretina (orexina) (Mm01185776_m1)), hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Mm01293920_s1), hormônio concentrador de melanina (MCH) (Mm01242886_g1), hormônio liberador de tireotropina (TRH) (Mm01963590_s1), membro da família ZIC1 (ZIC1) (Mm00656094_m1), coativador gama 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1α) (Mm00447183_m1), proteína desacopladora-1 (UCP1) (Mm01244861_m1), lipoproteína lipase (LPL) (Mm00434764_m1), ácido graxo sintase (FAS) (Mm00662319_m1) e diacilglicerol O-aciltransferase1 (DGAT1) (Mm00515643_m1) foram obtidos da Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (Applied Biosystems), que foi constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (#4352339E) (TaqManTM - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serviu para

normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda GAPDH estava marcada com o fluoróforo VIC. Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de 3,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,25 µL da solução de oligonucleotídeo e sonda, 0,25 µL de água e 4,0 µL de cDNA (40 ng). Os ciclos utilizados no termociclador foram: 95 ºC por 2 minutos, 40 ciclos de 95 ºC por 5 segundos e 60 ºC por 30 segundos. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa StepOne Plus System Software (Applied Biosystems).

5.2.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para a realização dos ELISAs de marcadores séricos, o sangue total foi coletado da artéria jugular, após decapitação, e centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O soro foi imediatamente separado em alíquotas e armazenado a -80 °C até análise. Para a quantificação de insulina, leptina e GLP-1 séricos foram utilizados os kits ELISA Rat/Mouse Insulin ELISA Kit 96-Well Plate, Mouse Leptin Elisa Kit 96-Well Plate e Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Total ELISA KIT 96-Well Plate (#EZRMI-13K, #EZML-82K, #EZGLP1T-36K, respectivamente, EDM Millipore Corporation, Billerica, MA), seguindo as orientações do fabricante. As médias dos valores de absorbância das amostras de cada teste foram utilizadas para calcular as concentrações dos analitos, a partir das equações geradas pelos valores das curvas dose-resposta padrões, definidos por 4 ou 5 parâmetros.

6 Análise dos resultados

Todos os valores obtidos foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram avaliados por teste T (quando 2 grupos) ou análise de variância (One-way ANOVA) seguida por teste de significância (Bonferroni test), comparando grupos experimentais (GraphPad Software). O nível de significância utilizado para analisar os resultados foi $p<0,05$.

7 Resultados

7.1 Resumo dos experimentos realizados de outubro/2017 a dezembro/2019

O desenvolvimento deste projeto perpassou por limitações, intercorrências e adaptações (Tabela 4). Ressalta-se a dose e diluição dos reagentes, bem como a recorrente aderência ao plástico; atraso na entrega dos produtos importados; e diminuição do número de animais no momento da anestesia prévia à cirurgia estereotáxica, na recuperação, por perda do capacete que sustenta a cânula ou pelo período do tratamento, o que poderia comprometer a fidedignidade dos resultados.

A fim de superarmos as dificuldades relatadas e promover avanços no trabalho científico, foram estabelecidas algumas alterações nos protocolos, a saber: i) Adotamos os diluentes DMSO, PBS e água de injeção, os quais demonstraram boa solubilidade e sendo menos prejudicial aos animais; ii) Diminuimos o tempo de consumo da dieta hiperlipídica para 4 semanas, garantindo uma melhor condição de vida e baixa mortalidade dos animais obesos. Tal modificação foi sustentada pela literatura que comprova o aumento dos marcadores inflamatórios já com 3 a 4 semanas de dieta hiperlipídica e também por resultados anteriores do nosso grupo que já demonstravam diferença estatística no ganho de peso de animais submetidos à dieta hiperlipídica por 4 semanas quando comparados aos controles (6,43,44) e iii) Adquirimos uma cola de fixação da 3M (Cimento Resinoso Adesivo Dual - 3M ESPE) que permitiu adesão dos capacetes por um período maior do que o material utilizado anteriormente.

Inicialmente trabalhamos com 6 grupos de animais, mas em virtude da limitação do n, além de análises de resultados e discussão com o orientador, optamos por seguir com os grupos que demonstraram maior potencial de tratamento. Estes foram: controle (HFD), agonista de GLP-1 (LIRA), agonista de GPR40 (TUG) e o tratamento combinado (LT).

Os resultados a seguir contemplam as adaptações mencionadas e propiciam achados mais robustos e fidedignos.

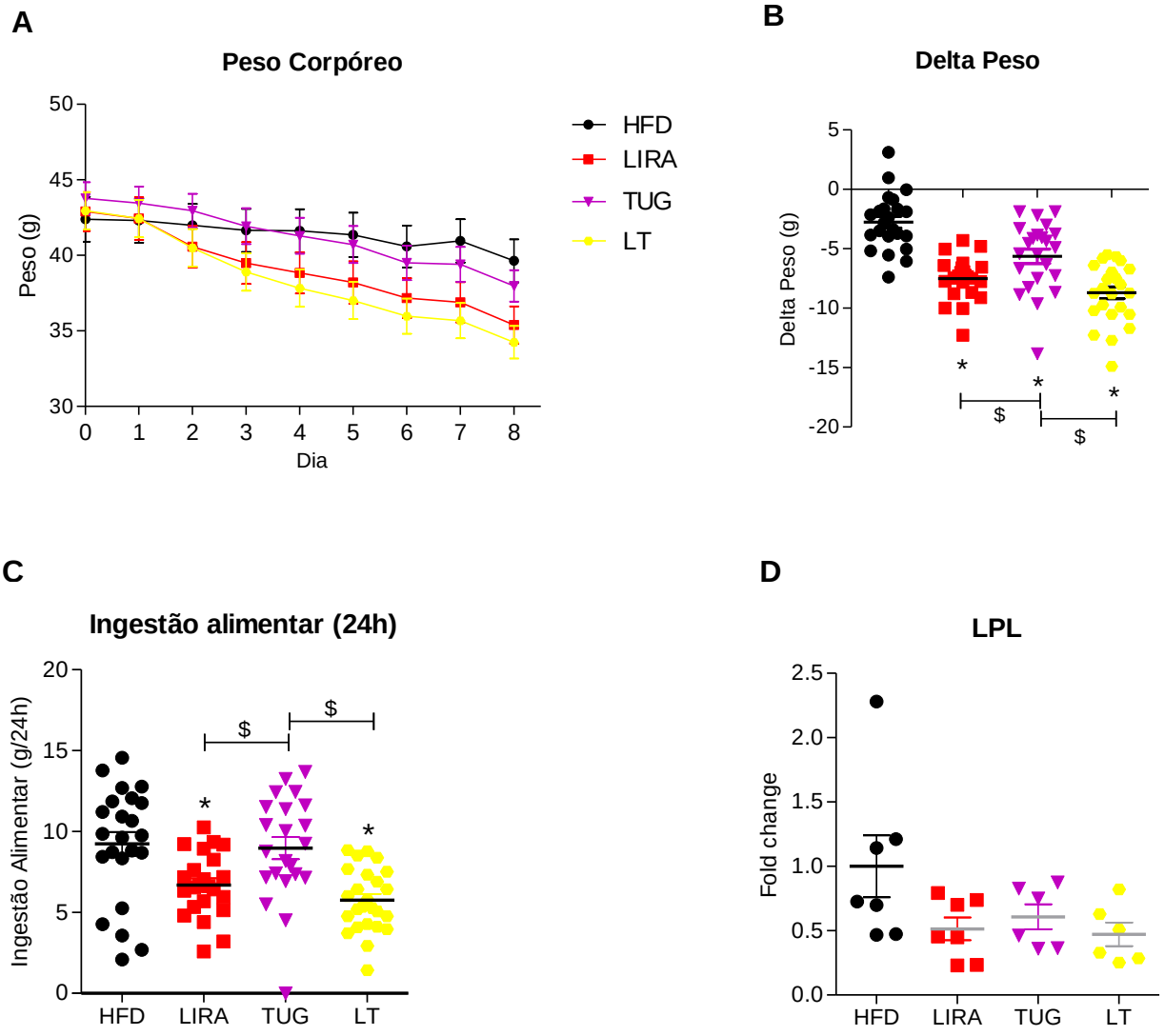
Tabela 4. Resumo das condições dos experimentos anteriores.

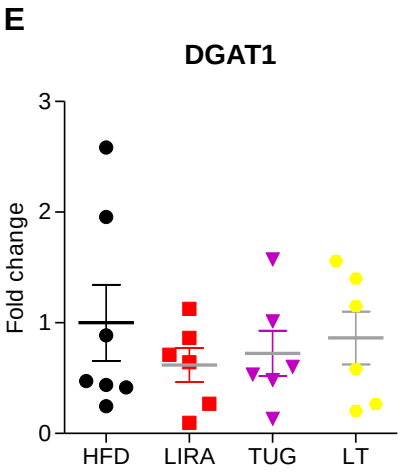
Experimento	HFD (semanas)	Via	Agonista (diluente)	Grupos	n inicial/ n final	Técnicas	Limitações
1	Ração	ICV e IP	GW (álcool + salina) LIRA	4	5 / 2-4	Respirom. Câmera PCR	Capacetes caíam n reduzido (extração no 6º dia – 5 doses)
2	Ração	IP	GW (álcool + salina) LIRA	4	5 / 5	Câmera Glicemia PCR	Precipitação
3	HFD (14 semanas)	IP	Veículo=álcool+salina LIRA	2	10 / 9-10	ITT GTT PCR	Entrega atrasada GW Grupos não juntos
4	HFD (14 semanas)	IP	GW (álcool + salina) LIRA	2	10 / 8	ITT GTT PCR	Precipitação Grupos não juntos
5	HFD (8 semanas)	IP	GW (DMSO + álcool) LIRA	4	5 / 5	GTT Câmera PCR	Câmera travou antes da extração Álcool: ruim para swiss
6	HFD (8 semanas)	IP	GW (DMSO + água de injeção) LIRA	4	5 / 5	GTT Câmera PCR	Grupo LG (maior ação da LIRA)
7	C57 (doação) HFD (8 semanas)	IP	TUG905 (DMSO + PBS) LIRA	4	5-6 / 5-6	GTT Câmera PCR	TUG precisa de administração central
8	HFD (8 semanas)	ICV e IP	TUG905 (DMSO + PBS)	2	5 / 4	GTT Câmera PCR	Grupos não juntos n reduzido
9	HFD (8 semanas)	ICV e IP	TUG905 (DMSO + PBS) LIRA	2	5 / 4	GTT Câmera PCR	Grupos não juntos n reduzido
10	HFD (7 semanas)	ICV e IP	GW (DMSO + água de injeção)	4	3-5 / 2-4	Câmera PCR	Animais debilitados n reduzido (extração no 6º dia – 5 doses)

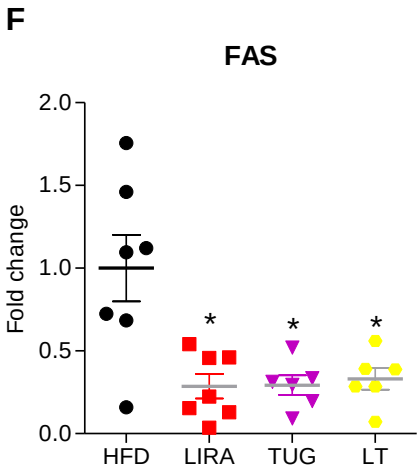
7.2 A combinação de liraglutida e TUG-905 promoveu maior redução da massa corporal em comparação à administração isolada de liraglutida.

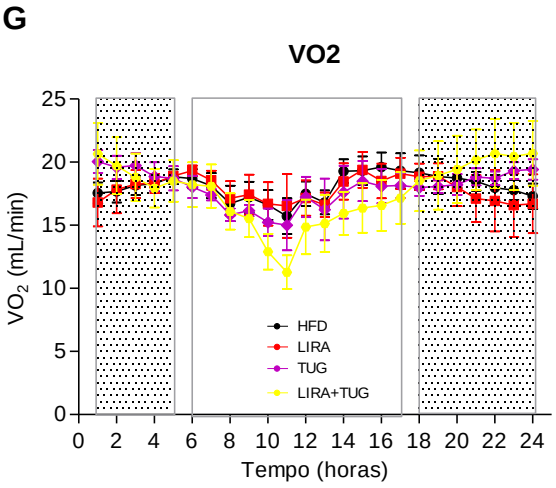
Os camundongos com 6 semanas de vida, alimentados com dieta hiperlipídica durante 4 semanas, foram submetidos à implantação da cânula no ventrículo lateral e, após recuperação, foram divididos nos grupos de estudo. Assim, tiveram por 7 dias a administração intracerebroventricular, concomitante à administração intraperitoneal de seus respectivos agonistas ou veículo. Ao comparar com o grupo controle, foi possível observar uma redução no peso corpóreo de todos os animais tratados, estando ainda mais evidenciado no grupo que recebeu o tratamento combinado de liraglutida com TUG-905 (Figuras 5A e 5B). Este grupo e o

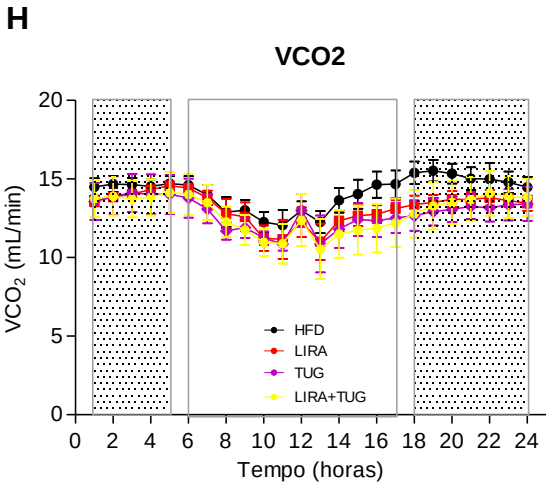
que teve a administração isolada de liraglutida apresentaram uma menor ingestão alimentar (Figura 5C). Ao final do tratamento, o tecido adiposo epididimal foi coletado e submetido à análise gênica por RT-PCR. Houve redução significativa tanto dos genes que codificam enzimas lipolíticas (LPL, Figura 5D) quanto das relacionadas à lipogênese (DGAT1 e FAS, Figuras 5E e 5F, respectivamente). No que se refere ao gasto energético, não foram identificadas alterações importantes, pelo menos no espaço de tempo observado (Figuras 5G-5J). Todavia, os animais tratados apenas com TUG-905 demonstraram redução do quociente respiratório durante o período escuro do ciclo, condizente com maior oxidação lipídica (Figuras 5K e 5L).

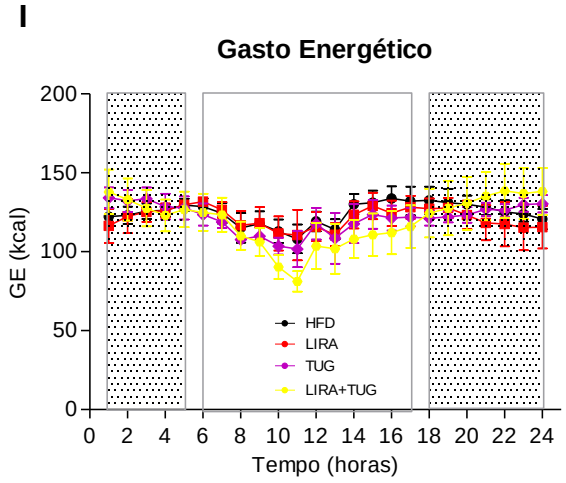


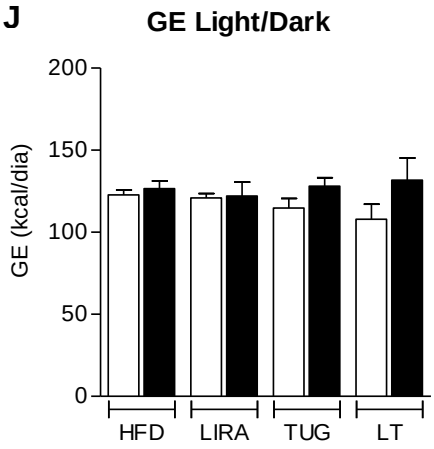

E
DGAT1
Fold change
3
2
1
0
HFD
LIRA
TUG
LT

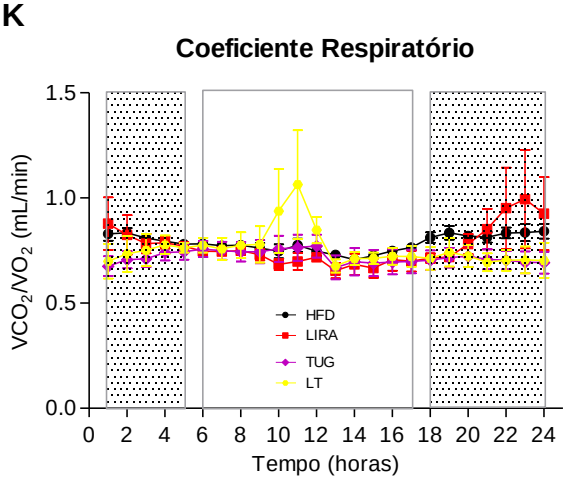

F
FAS
Fold change
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
HFD
LIRA
TUG
LT


G
VO2
VO2 (mL/min)
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)
HFD
LIRA
TUG
LIRA+TUG


H
VCO2
VCO2 (mL/min)
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)
HFD
LIRA
TUG
LIRA+TUG


I
Gasto Energético
GE (kcal)
200
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)
HFD
LIRA
TUG
LIRA+TUG


J
GE Light/Dark
GE (kcal/dia)
200
150
100
50
0
HFD
LIRA
TUG
LT


K
Coeficiente Respiratório
VCO2/VO2 (mL/min)
1.5
1.0
0.5
0.0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)
HFD
LIRA
TUG
LT

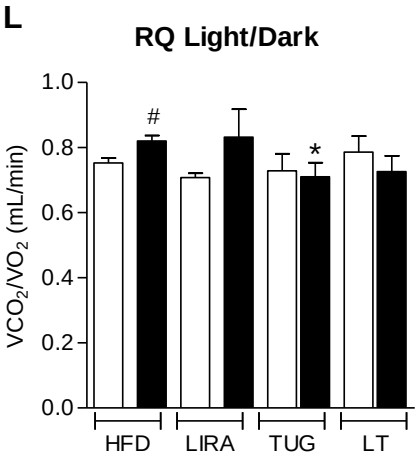
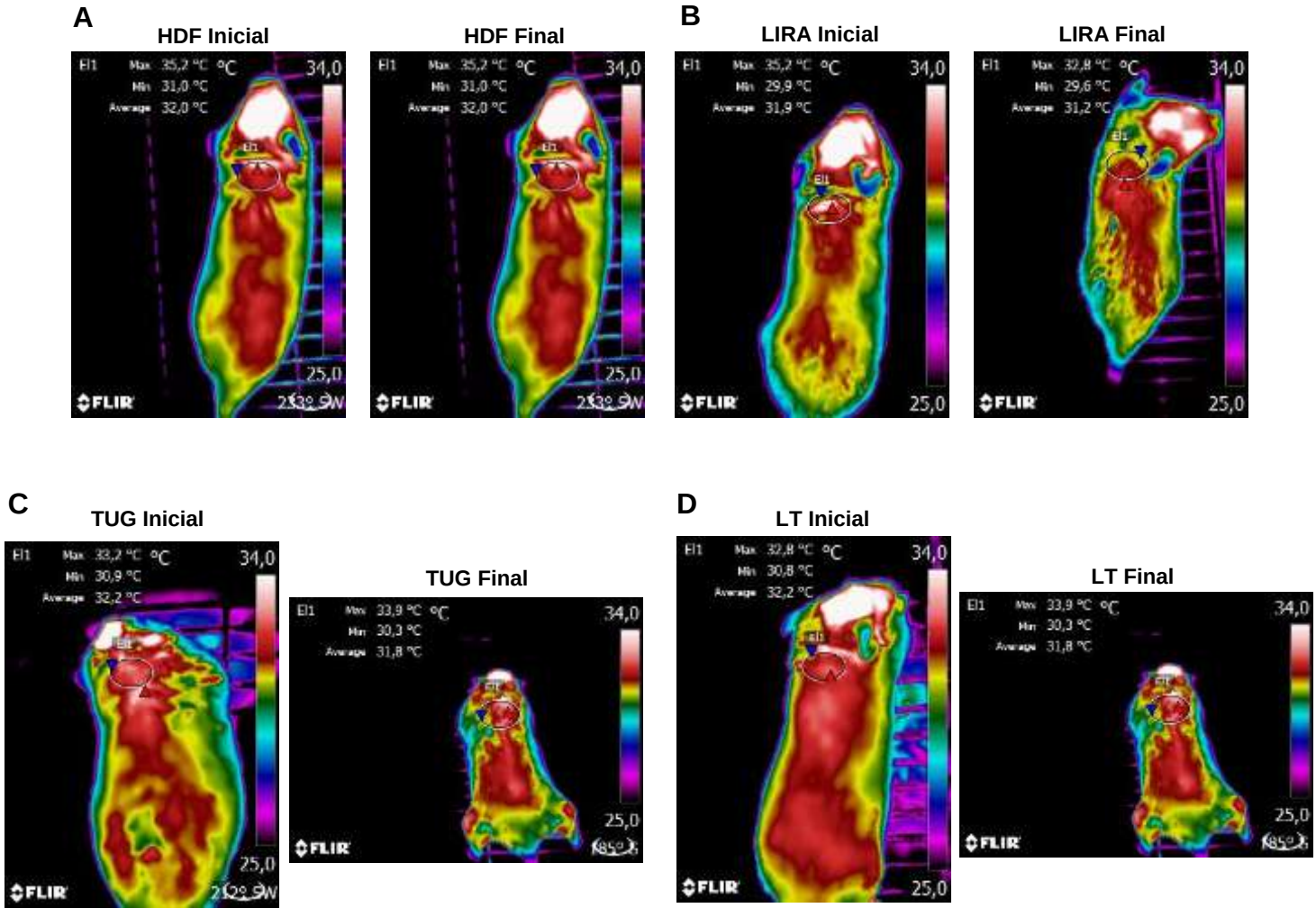

L
RQ Light/Dark
VCO2/VO2 (mL/min)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
#
*
HFD
LIRA
TUG
LT

Figura 5. Efeitos das intervenções nos parâmetros metabólicos e na expressão de genes lipolíticos e lipogênicos. A,B. Redução da massa corporal. **C.** Ingestão alimentar mensurada no quarto dia de tratamento. **D-F.** Transcritos de LPL, DGAT1 e FAS determinados no hipotálamo de camundongos. **G-L.** Respirometria com valores para consumo de O_2 (**G**), produção de CO_2 (**H**), gasto energético (**I,J**) e quociente respiratório (**K,L**). n = 22–25 (**A-C**); n = 5–7 (**D-F**); n = 6 (**G-L**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo; #p < 0.05 vs. Light.

7.3 Os tratamentos com TUG-905, mas não com liraglutida isoladamente, promoveram aumento da termogênese do tecido adiposo marrom.

O tecido adiposo marrom, sendo um alvo potencial interessante para o tratamento da obesidade e doenças metabólicas, foi analisado neste estudo por meio de imagens termográficas para determinação da temperatura interescapular, a qual é um marcador substituto da atividade do BAT.



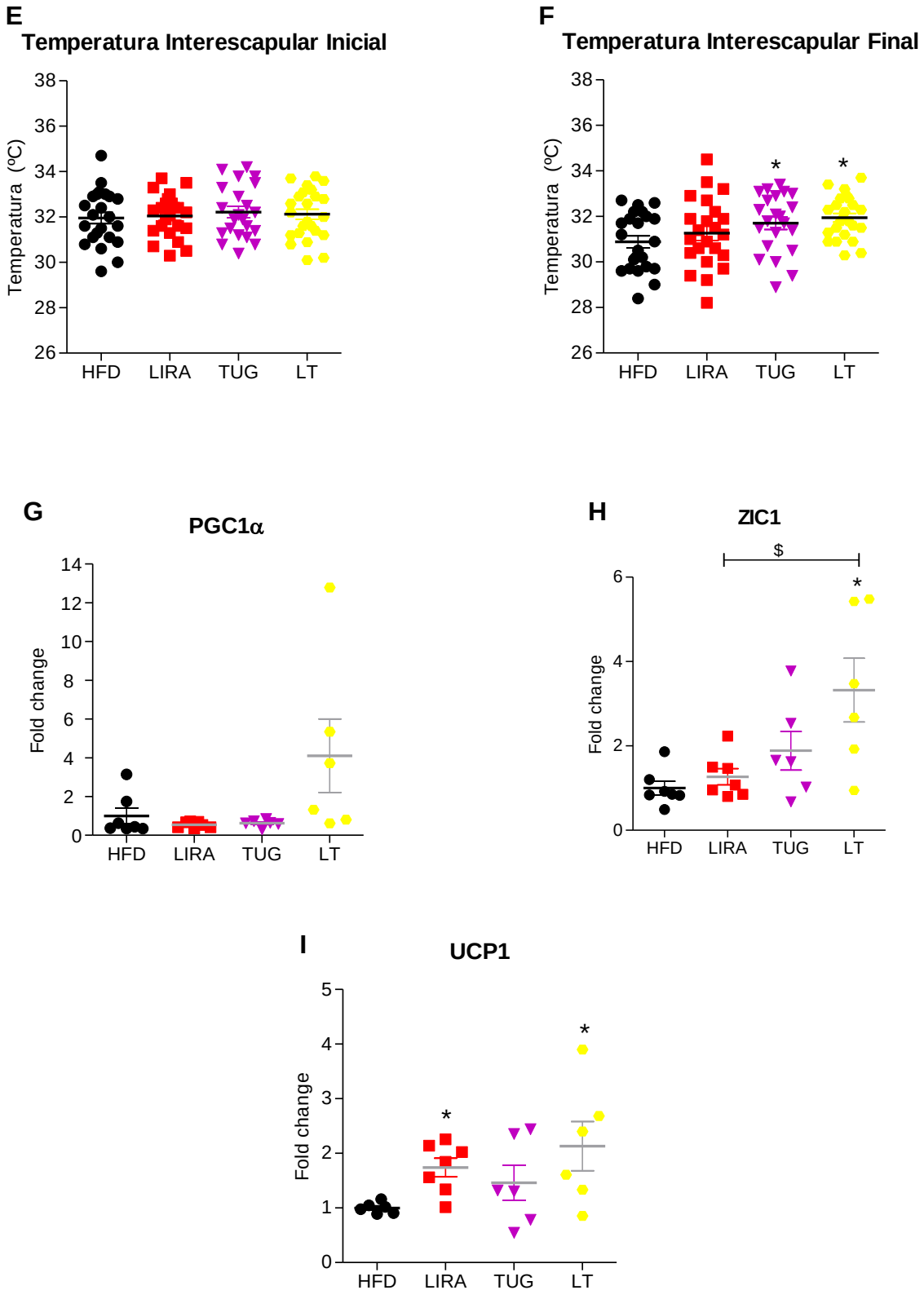


Figura 6. A termogênese do tecido adiposo marrom aumenta com o tratamento com TUG-905. A-D. Imagens representativas de cada grupo com temperaturas interescapulares inicial e final, veículo (HFD) (**A**), liraglutida (LIRA) (**B**), TUG-905 (TUG) (**C**) e liraglutida + TUG-905 (LT) (**D**). **E, F.** Temperatura do BAT antes (**E**) e após (**F**) intervenção. **G-I**. Expressão dos marcadores termogênicos PGC1α (**G**), ZIC1 (**H**) e UCP1 (**I**). n = 22–25 (**A-F**); n = 5–7 (**G-I**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo.

Conforme mostrado nas Figuras 6A-6F, os tratamentos com TUG-905 isolado ou com a liraglutida promoveram aumentos significativos na temperatura interescapular. Ademais, houve aumento da expressão dos marcadores termogênicos ZIC (Figura 6H) e UCP1 (Figura 6I) nos grupos liraglutida e liraglutida + TUG-905.

7.4 Efeitos das intervenções na expressão de neurotransmissores hipotalâmicos.

Foi avaliado o impacto das intervenções na expressão de neurotransmissores que estão envolvidos na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. A liraglutida de forma isolada promoveu um aumento na expressão do neurotransmissor anorexígeno POMC (Figura 7A) e uma redução na expressão do orexígeno AgRP (Figura 7D). Enquanto que o grupo que recebeu apenas TUG-905 aumentou a expressão do neurotransmissor orexígeno NPY (Figura 7C). A combinação de liraglutida com TUG-905 propiciou aumentos na expressão dos neurotransmissores TRH (Figura 7E) e MCH (Figura 7H).

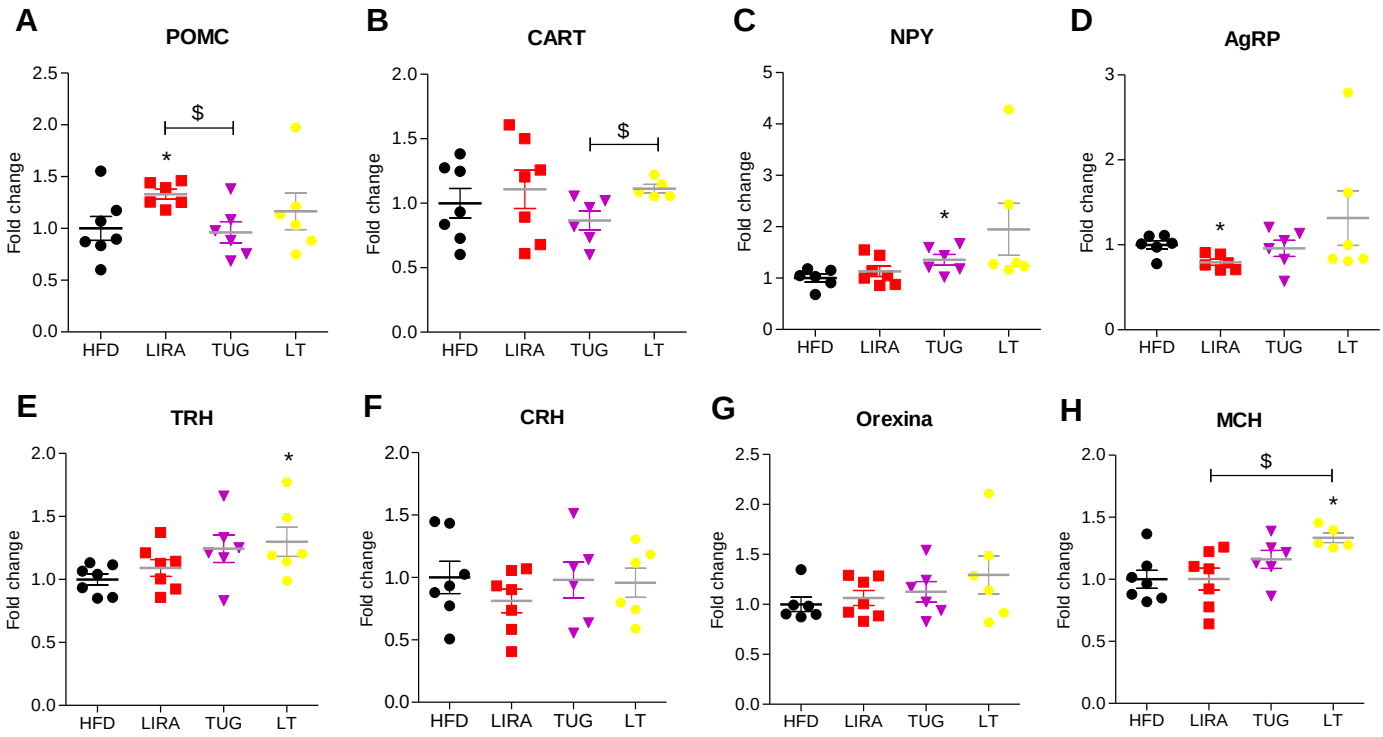


Figura 7. Efeitos das intervenções na expressão de neurotransmissores hipotalâmicos. POMC (**A**), CART (**B**), NPY (**C**), AgRP (**D**), TRH (**E**), CRH (**F**), orexina (**G**) e MCH (**H**). n = 5–7; *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo.

7.5 Efeitos das intervenções na tolerância à glicose.

Os camundongos tratados com liraglutida, somente ou com TUG-905, apresentaram menor glicemia de jejum (Figura 8A) e redução da área sob a curva do GTT (Figuras 8B e 8C).

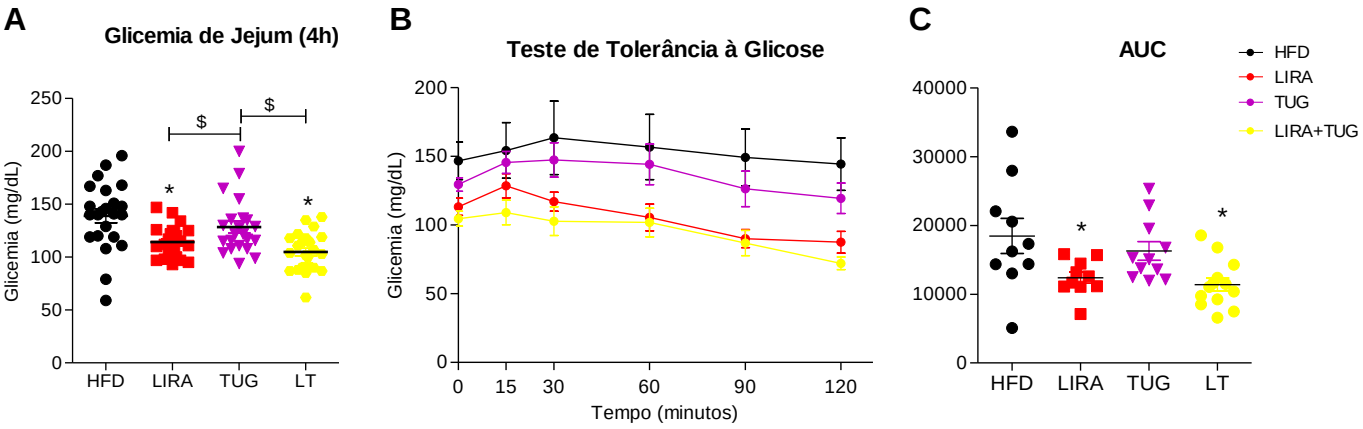


Figure 8. Efeitos das intervenções na tolerância à glicose. Glicemia de jejum (4 h) (**A**). Teste de Tolerância à Glicose (GTT) (**B**). Área sob a curva (AUC) (**C**). n = 23–25 (**A**), n = 10–13 (**B,C**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo.

7.6 Sob a técnica de *pair feeding*, o tratamento com TUG-905 correspondeu à redução da massa corporal promovida pela liraglutida isolada.

Quando o TUG-905 é utilizado isoladamente, a redução da massa corporal é menor do que a apresentada frente ao tratamento da liraglutida sozinha ou com o TUG-905. Assim, nos questionamos sobre a contribuição da ingestão alimentar na redução do peso corpóreo e realizamos o *pair feeding*. Neste experimento, todos os grupos foram pareados aos camundongos tratados apenas com liraglutida e os parâmetros foram determinados ao longo dos sete dias. A redução da massa corporal mais expressiva foi obtida com a combinação de liraglutida + TUG-905 (Figura 9A). Entretanto, não houve diferenças no consumo de O_2 (Figura 9B), na produção de CO_2 (Figura 9C), no gasto energético (Figuras 9D e 9E) e no quociente respiratório (Figuras 9F e 9G). Em relação à glicemia de jejum, esta se apresentou reduzida nos camundongos que receberam liraglutida (Figura 9H).

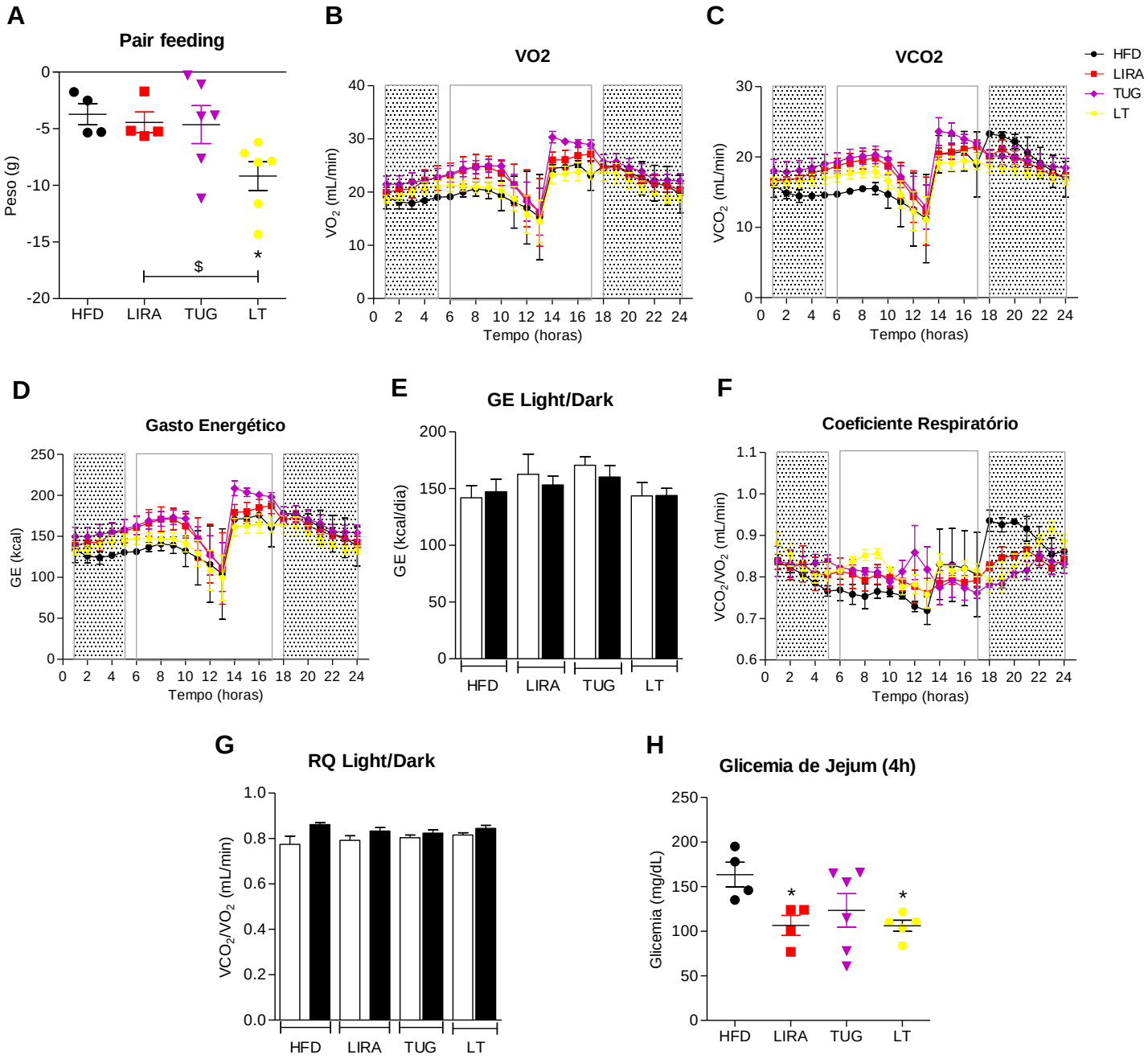


Figura 9. *Pair feeding*. Massa corporal (**A**). Respirometria com valores para consume de O_2 (**B**), produção de CO_2 (**C**), gasto energético (**D,E**) e quociente respiratório (**F,G**). Glicemia de jejum (4 h) (**H**). n = 4–6 (**A,H**); n = 2–6 (**B-G**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo.

7.7 A eficácia do tratamento com liraglutida foi evidenciada na dosagem de GLP-1 sérico por ELISA.

Com o soro coletado após a intervenção proposta, foi realizada a quantificação de insulina, leptina e GLP-1 séricos por meio de kits ELISA. Uma vez que a liraglutida é um GLP-1 exógeno, o kit para GLP-1 identifica o análogo como o próprio hormônio, justificando os valores irrisórios dos grupos HFD e TUG (Figura 10C) e confirmando a atuação e eficácia do tratamento com a liraglutida. Não houve

diferença para a insulina (Figura 10A), enquanto que a leptina se apresentou menos expressa nos grupos que receberam liraglutida somente ou com TUG-905 (Figura 10B).

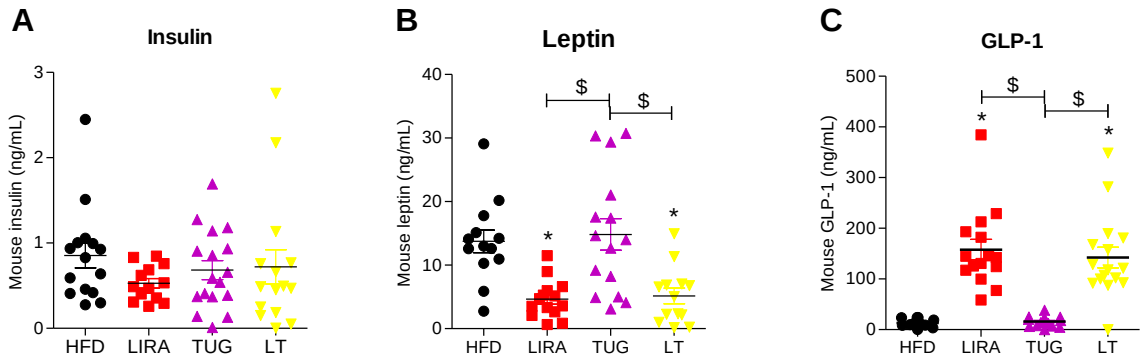


Figura 10. Dosagem de hormônios séricos. Insulina (**A**). Leptina (**B**), GLP-1 (**C**). n = 13–18; *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. outro grupo.

8 Discussão

O presente estudo mostrou que a combinação dos agonistas de GLP-1 e GPR40 resultou em uma maior redução de massa corporal do que a observada frente ao tratamento apenas com liraglutida. Essa diminuição foi acompanhada por um aumento na atividade termogênica do BAT.

Os agonistas de GLP-1, em especial a liraglutida e a semaglutida, fazem parte da classe mais moderna e promissora de medicamentos eficazes e seguros para o tratamento do diabetes e da obesidade. Nas ilhotas pancreáticas, esses agonistas têm ação incretínica, aumentando a secreção de insulina estimulada pela glicose, enquanto que no cérebro têm a capacidade de aumentar a atividade dos neurônios anorexígenos e diminuir a dos orexígenos no núcleo arqueado do hipotálamo. Ainda que haja grande avanço farmacológico, as reduções de massa corporal obtidas em longos períodos de intervenção se aproximam de apenas 15 kg, o que já promove muitos benefícios metabólicos, mas permanece aquém das expectativas em retornar o paciente a um estado de saúde normal e estável. Dessa forma, a busca por terapias mais adequadas se torna necessária para o tratamento ideal da obesidade (45,46,47).

A estratégia de utilizar mais de um medicamento para tratar de uma mesma doença se justifica pela complexidade e pelas múltiplas causas que podem comprometer diferentes tecidos, órgãos ou sistemas. Para o diabetes mellitus tipo 2, a *American Diabetes Association* recomenda 7 classes de medicamentos que podem estar em monoterapia ou em combinação dupla para melhor controle glicêmico e metabólico. Outras doenças que lançam mão dessa estratégia são a hipertensão e a dislipidemia. A *International Society of Hypertension* permite a combinação de até quatro medicamentos pertencentes a 11 classes distintas, enquanto que para a dislipidemia existem 10 classes de fármacos que podem ser usados isoladamente ou em combinação para maior eficácia e prognóstico (48,49).

O sinergismo entre agonistas de GPR40 e GLP-1 como potencial alvo terapêutico para o diabetes remonta ao ano de 2014. O composto DS-1558, agonista de GPR40, foi utilizado em animais de experimentação saudáveis e diabéticos, juntamente com o exendina-4. Observou-se que a combinação desses agonistas melhorou a tolerância à glicose e a secreção de insulina, alcançando um controle glicêmico superior ao obtido com a monoterapia desses agentes no DM2 (50).

Considerando que no sistema nervoso central, o hipotálamo expressa GPR40, é influenciado pelos sinais periféricos, como o GLP-1, e é a região que controla a ingestão alimentar e o gasto energético, acredita-se que os neurônios hipotalâmicos podem ser alvos interessantes para o tratamento da obesidade. Estudos pregressos demonstraram que o TUG-905, via ICV, promoveu redução da massa corporal, com tendência a diminuir a ingestão alimentar, sendo uma estratégia farmacológica satisfatória para tratar a obesidade (39).

No trabalho apresentado é proposta a combinação de liraglutida com TUG-905, mostrando ser possível reduzir a massa corporal além da observada em qualquer agonista sozinho. Os tratamentos, por período descrito anteriormente, não promoveram mudança significativa no gasto energético; entretanto, em ambos os grupos que receberam TUG-905, a temperatura interescapular aumentou, bem como a expressão de marcadores termogênicos do BAT. Talvez a alteração nestes marcadores seja um indicativo de eventual aumento no gasto energético se os tratamentos fossem prolongados.

Em humanos adultos, o BAT tem a capacidade de dissipar energia e está inversamente correlacionado com adiposidade e aos índices da síndrome metabólica. Assim, sugere-se que o aumento da massa e/ou atividade do BAT pode ser um alvo para intervenções farmacológicas e nutricionais que modulam o gasto energético para tratar ou prevenir a obesidade e suas comorbidades. Embora a exposição ao frio seja o estímulo mais fisiológico e eficaz para ativar e recrutar o BAT, aumentando o gasto energético, diminuindo a gordura corporal, melhorando o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina, é uma estratégia desconfortável e de baixa adesão. Uma alternativa para promover a termogênese no BAT é a inclusão de compostos bioativos na dieta, como capsaicina, resveratrol, curcumina, chá verde e ácidos graxos EPA e DHA, todavia os estudos até o momento foram realizados em células *in vitro* e camundongos ou ratos, necessitando de maiores avanços na pesquisa clínica (51,52).

A administração de agonistas do receptor β3-adrenérgico (β3-AR) é uma opção que contribui para aumentar o gasto energético, melhorar a tolerância à glicose e a oxidação de ácidos graxos. Ademais, o GPR40 pode contribuir para a liberação de insulina após a ativação dos β3-AR, sugerindo que os receptores de FFAs oferecem uma ligação mecanicista entre a sinalização adrenérgica no tecido adiposo e a função das células pancreáticas, podendo contribuir para os efeitos dos agonistas β3-AR no metabolismo glicêmico. Contudo, ajustes no desenvolvimento dessa classe farmacológica, a fim de alcançar maior seletividade e segurança, são quesitos a serem explorados (53,54).

Com o advento dos agonistas de GLP-1 no tratamento da obesidade, muito se especulou sobre a possível ação no BAT. Em um estudo experimental, a administração central de liraglutida promoveu perda ponderal, no entanto, esse efeito não foi resultado de uma redução na ingestão alimentar, mas sim, na ativação do BAT. Ainda, a estimulação da termogênese é um mecanismo dependente da AMPK hipotalâmica. Entretanto, a magnitude da diminuição do peso corporal propiciada pela liraglutida em tratamento periférico crônico, não requer o aumento da atividade do BAT (55,56).

No modelo experimental do trabalho em questão, o tratamento com apenas a liraglutida aumentou a expressão de UCP1 em BAT mas não houve aumento

detectável na temperatura interescapular. Todavia, os grupos que receberam TUG-905 tiveram aumento na temperatura interescapular, de forma mais expressiva no grupo que recebeu o tratamento combinado. Neste houve aumento na expressão dos marcadores termogênicos do BAT, UCP1 e ZIC1, e uma tendência à maior expressão de PGC-1α. Ressalta-se que em todos os grupos que receberam intervenção farmacológica, não houve redução compensatória no gasto energético, corroborando o fato de que mesmo frente a uma restrição calórica é possível manter o gasto energético, o que auxilia na perda de peso prolongada ou na manutenção que é uma proposta do tratamento com agonistas de GLP-1 (47).

A regulação hipotalâmica do balanço energético é resultado de uma complexa integração de neurônios que respondem a múltiplos sinais endócrinos, nutricionais e neurais. A liraglutida e a semaglutida atuam principalmente controlando os neurônios anorexígenos (POMC) e no presente estudo foi reproduzido esse aumento na expressão hipotalâmica de POMC e redução de AgRP em camundongos tratados apenas com liraglutida. Ademais, o tratamento de liraglutida com TUG-905 demonstrou atuar no sistema neuronal hipotalâmico, aumentando os neurotransmissores TRH e MCH (47,57).

Para além da redução da massa corporal, as intervenções farmacológicas visam corrigir a intolerância à glicose e neste estudo, tanto a liraglutida sozinha quanto com o TUG-905 melhoraram a tolerância à glicose. Isso pode ocorrer pelos agonistas de GLP1 e GPR40 agirem diretamente nas ilhotas pancreáticas para aumentar a secreção de insulina induzida pela glicose. O fato de os grupos que receberam liraglutida terem apresentado maior efeito na glicemia, deve-se à administração sistêmica, permitindo atuação direta no pâncreas, em quanto que o TUG-905 teve uma ação mais central. Embora pesquisas mostram que a ativação de neurônios POMC também é capaz de promover uma melhora da tolerância sistêmica à glicose (45,58). Assim, avanços nessa área podem responder se os benefícios glicêmicos ocorrem da ação combinada de liraglutida e TUG-905 no controle direto da secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas ou como resultado da interação entre pâncreas e hipotálamo.

9 Conclusão

No modelo experimental de obesidade induzida por dieta, a associação farmacológica de agonistas de GLP-1 e GPR40 promoveu efeitos benéficos, levando a uma maior redução da massa corporal do que a obtida apenas pela liraglutida. Este efeito parece ser devido, pelo menos em parte, ao aumento da atividade do BAT. Uma vez que os agonistas de GLP-1 estão aprovados e disponíveis para o tratamento da obesidade e os agonistas do GPR40 já foram testados e provados seguros em ensaios clínicos, estudos futuros poderão testar essa associação na obesidade humana e oferecer uma alternativa promissora na busca pelo melhor prognóstico e maior qualidade de vida.

10 Referências

1. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. Geneva; 1999.

2. NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. Lancet. 2016;387:1377–96.

3. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet. 2011;378(9793):804-14.

4. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2022. Mar 2022; [acesso em abril 16, 2022];[289p.] Disponível em https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022.

5. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. Nat Rev Genet. 2002; 3(8):589-600.

6. Souza GFP, Solon C, Nascimento LF, De-Lima-Junior JC, Nogueira G, Moura R et al. Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. Scientific Reports. 2016; 6(1):29290.

7. Razolli DS, de Araújo TM, Sant'Ana MR, Kirwan P, Cintra D, Merkle FT et al. Proopiomelanocortin processing in the hypothalamus is directly regulated by saturated fat: implications for the development of obesity. Neuroendocrinology. 2020; (1-2):92-104.

8. Engel DF, Velloso LA. The timeline of neuronal and glial alterations in experimental obesity. Neuropharmacology. 2022; 208:108983.

9. Müller TD, Blüher M, Tschöp MH, DiMarchi RD. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2022; 21(3):201-223.

10. Rezende LFM, Giannichi BV, Resende BS, Carvalho JB, Santos BS, Pereira JX et al. A epidemia de obesidade e as DCNT: causas, custos e sobrecarga no SUS. Jan 2022; [acesso em abril 20, 2022];[40p.] Disponível em https://rezendelfm.github.io/obesidade-e-as-dcnt/.

11. Organização Pan-Americana da Saúde. Dia Mundial da Obesidade 2022: acelerar ação para acabar com a obesidade. Mar 2022; [acesso em abril 18, 2022];

[1p.] Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/4-3-2022-dia-mundial-da-obesidade-2022-acelerar-acao-para-acabar-com-obesidade.

12. Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. Nutrição moderna na saúde e na doença. 10ª ed. Barueri: Editora Manole LTDA; 2009.

13. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4ª ed. São Paulo: ABESO; 2016.

14. World Health Organization. WHO guidelines on physical activity and sedentary behavior. [104p.] 2020.

15. Niemiro GM, Rewane A, Algotar AM. Exercise and Fitness Effect On Obesity. Free Books & Documents. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

16. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Guia Prático Exercício Físico e Obesidade. São Pulo: ABESO; 2021.

17. Roh E, Kim MS. Brain Regulation of Energy Metabolism. Endocrinol Metab. 2016;31:519-24.

18. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360:1509-17.

19. Pan R, Zhu X, Maretich P, Chen Y. Combating obesity with thermogenic fat: current challenges and advancements. Front. Endocrinol. 2020;11(185).

20. Ang QY, Goh HJ, Cao Y, Li Y, Chan SP, Swain JL et al. A new method of infrared thermography for quantification of brown adipose tissue activation in healthy adults (TACTICAL): a randomized trial. J Physiol Sci. 2017; 67:395–406.

21. Mauer Y, Parker M, Kashyap SR. Antiobesity drug therapy: an individualized and comprehensive approach. Cleve Clin J Med. 2021; 88(8):440-8.

22. SBEM, ABESO. Posicionamento sobre uso de chás e suplementos para o tratamento da obesidade. Mar 2022; [acesso em maio 13, 2022];[2p.] Disponível em

https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2022/03/Posicionamento-SBEM-e-ABESO.01pdf.pdf.

23. Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. Nat Rev Endocrinol. 2018;14(1):12-24.

24. Chacra AR. Efeito fisiológico das incretinas. Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine, 2006;6(7B), p. 613-17.

25. Costa IM, Almeida, JD, Costa KM, Jardim LFS, Rosa MJS, Pifano PP et al. Uso de análogos de GLP-1 no tratamento da obesidade: uma revisão narrativa. BJHR, 2021; 4(2):4236-47.

26. Ozempic. [Bula]. Dinamarca: Novo Nordisk. Disponível em https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordisk-br/Profissionais_da_Saude/Bulas-profissionais-de-saude/2019-06%20Ozempic%201.5mL_%200.25mg_0.5mg_Bula%20do%20Profissional.pdf.

27. Wilding JPH, Batterham RL, Calanna S, Davies M, Van Gaal LF, Lingvay I et al. Once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity. N Engl J Med 2021;384(11):989-1002.

28. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. 12(706978).

29. Valsamakis G, Konstantakou P, Mastorakos G. New Targets for Drug Treatment of Obesity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2017;6(57):585-605.

30. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. Nat Rev Drug Discov 2017;16(12):829-42.

31. Soave M, Briddon SJ, Hill SJ, Stoddart LA. Fluorescent ligands: Bringing light to emerging GPCR paradigms. Br J Pharmacol 2020;177(5):978–91.

32. Ichimura A, Hasegawa S, Kasubuchi M, Kimura I. Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes. Front Pharmacol 2014; 5(236).

33. Falomir-Lockhart LJ, Cavazzutti GF, Giménez E, Toscani AM. Fatty Acid Signaling Mechanisms in Neural Cells: Fatty Acid Receptors. Front Cell Neurosci 2019;13(162).

34. Miyamoto J, Kasubuchi M, Nakajima A, Kimura I. Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Free Fatty Acid Receptors. Handb Exp Pharmacol 2016;236:221-31.

35. Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Suzuki M, Tsujihata Y et al. Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. ACS Med Chem Lett 2010;1(6):290–4.

36. Burant CF. Activation of GPR40 as a Therapeutic Target for the Treatment of Type 2Diabetes. Diabetes Care 2013;36(suppl 2):S175-9.

37. Nishizaki H, Matsuoka O, Kagawa T, Kobayashi A, Watanabe M, Moritoh Y. SCO-267, a GPR40 Full Agonist, Stimulates Islet and Gut Hormone Secretion and Improves Glycemic Control in Humans. Diabetes 2021;70:2364–76.

38. Christiansen E, Due-Hansen ME, Urban C, Grundmann M, Schröder R, Hudson BD et al. Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40) Agonists: Mesylpropoxy Appendage Lowers Lipophilicity and Improves ADME Properties. J Med Chem 2012;55:6624−28.

39. Dragano N, Solon C, Ramalho AF, de Moura RF, Razolli DS, Christiansen E et al. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. J Neuroinflammation 2017;14(1):91.

40. Engel DF, Bobbo VCD, Solon CS, Nogueira GA, Moura-Assis A, Mendes NF et al. Activation of GPR40 induces hypothalamic neurogenesis through p38‐and BDNF ‐dependent mechanisms. Sci Rep 2020;10:11047.

41. Ou HY, Wu HT, Hung HC, Yang YC, Wu JS, Chang CJ. Multiple mechanisms of GW-9508, a selective G protein-coupled receptor 40 agonist, in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2013;304 (6):E668–76.

42. Xin-Yi Z, Zhang LL, Suolang QZ, Yang GY, Li L, Li SB et al. Liraglutide protects against nonalcoholic fatty liver disease in ApoE knockout mice with high-fat diet and silenced Acrp30 by increasing AMPK. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2014;22(11):849-53.

43. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest 2012; 122(1):153-62.

44. Morari J, Anhe GF, Nascimento LF, de Moura RF, Razolli D, Solon C et al. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. Diabetes 2014; 63(11):3770-84.

45. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes e state-of-the-art. Mol Metab 2021;46:101102.

46. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sørensen J, Cowley MA, Dalbøge LS et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. J Clin Invest 2014;124(10):4473–88.

47. Gabery S, Salinas CG, Paulsen SJ, Ahnfelt-Rønne J, Alanentalo T, Baquero AF et al. Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways. JCI Insight 2020;5(6):e133429.

48. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. Diabetes Care 2022;45(Suppl. 1):S125–43.

49. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. Hypertension 2020;75(6):1334-57.

50. Nakashima R, Yano T, Ogawa J, Tanaka N, Toda N, Yoshida M et al. Potentiation of insulin secretion and improvement of glucose intolerance by combining a novel G protein-coupled receptor 40 agonist DS-1558 with glucagon-like peptide-1 receptor agonists. Eur J Pharmacol 2014;737:194-201.

51. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010;17(2):143–9.

52. Saito M, Matsushita M, Yoneshiro T, Okamatsu-Ogura Y. Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. Front Endocrinol (Lausanne) 2020;11:222.

53. O'Mara AE, Johnson JW, Linderman JD, Brychta RJ, McGehee S, Fletcher LA et al. Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. J Clin Invest 2020;130(5):2209-19.

54. Pang Z, Wu N, Zhang X, Avallone R, Croci T, Dressler H et al. Mol Cell Endocrinol 2010;325(1-2):18-25.

55. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villaroya F et al. GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning Through Hypothalamic AMPK. Diabetes 2014;63(10):3346-58.

56. Heppner KM, Marks S, Holland J, Ottaway N, Smiley D, Dimarchi R et al. Contribution of brown adipose tissue activity to the control of energy balance by GLP-1 receptor signalling in mice. Diabetologia 2015;58(9):2124-32.

57. Moura-Assis A, Friedman JM, Velloso LA. Gut-to-brain signals in feeding control. Am J Physiol Endocrinol Metab 2021;320(2):E326-32.

58. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. Nature 2007;449(7159):228-32.

11 Anexos

11.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito combinado de agonistas GLP-1 e GPRs 40 e 120 no tratamento da obesidade experimental**, registrada com o nº **4639-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Licio Augusto Velloso e Leticia Da Silva Pires**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) 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**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, 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)**, **tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **08 de agosto de 2017**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	**14/08/2017 -31/08/2021**
Vigência da autorização para manipulação animal:	**14/08/2017 -31/08/2021**
Espécie / linhagem/ raça:	**Camundongos heterogênico / Unib:SW (Swiss)**
No. de animais:	**400**
Peso / Idade:	**04 semanas / 15g**
Sexo:	**machos**
Origem:	**CEMIB/UNICAMP**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 08 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Preste atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

11.2 Aprovação do Adendo pela CEUA

CERTIFICADO CEUA nº 1/2020

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito combinado de agonistas GLP-1 e GPRs 40 e 120 no tratamento da obesidade experimental**, registrada com o nº **4639-1(A)/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Licio Augusto Velloso e Laticia da Silva Pires**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) 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**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, 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)**, **tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/08/2020**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	30/10/2020 a 31/08/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/08/2020 a 31/08/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código D32C7CEC 4E98403C B7CE7C82 D987D6C3

CERTIFICADO CEUA nº 1/2020

Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	2
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 15.00 Gramas
Sexo:	2 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Sinalização Celular, NMCE, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**,**SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **13 de outubro de 2020**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: [illegible]

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código D32C7CEC 4E98403C B7CE7C82 D987D6C3

CERTIFICADO CEUA nº 1/2020

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 20/10/2020, às 10:11 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **Wagner Jose Favaro**, **PROFESSOR DOUTOR I**, em 22/10/2020, às 15:43 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **D32C7CEC 4E98403C B7CE7C82 D987D6C3**

UNICAMP
SIGAD

11.3 Artigo para submissão

11.3.1 Texto

Hypothalamic GPR40 agonism increases body mass reduction promoted by liraglutide and activates brown adipose tissue thermogenesis

Letícia S. Pires[1], Erika A. Roman[1], Pedro A. S. Nogueira[1], Guilherme A. S. Nogueira[1], Carina Solon[1], Athanasios Papangelis[2], Trond Ulven[2], Licio A. Velloso[1,3]

[1]Laboratory of Cell Signaling-Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

[2]Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen, 2100 Copenhagen, Denmark.

[3]National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation

* Corresponding Author:

Lício A. Velloso. Electronic address: lavellos@unicamp.br

Laboratory of Cell Signaling-Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, 13083-864 Campinas, Brazil

Abstract

Obesity affects more than 600 million people worldwide, and lifestyle and pharmacological interventions have proven insufficient to promote effective and long-lasting reductions in body mass. The introduction of glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP1RA) has provided an advance in the field, leading to body mass reductions of up to 16 kg over a period of 68 weeks. Despite the undisputed metabolic benefit promoted by this intervention, control of the disease is still far from optimal. GPR40 is a medium- and long-chain fatty acid receptor that, like GLP1R, is expressed in pancreatic islets and in key hypothalamic neurons involved in the regulation of food intake. It was previously shown that, used alone, a GPR40 chemical agonist promoted body mass reduction in a rodent model of diet-induced obesity. Here, we hypothesized that the combined use of a GLP1RA and an agonist of GPR40 could improve the body mass reduction obtained using either compound alone. We show that the combination of both agonists promoted an increase in body mass reduction over that obtained with the GLP1RA liraglutide alone. In addition, the combination of compounds resulted in a significant increase in brown adipose tissue thermogenesis. We conclude that the combination of a GLP1RA and an agonist of GPR40 could provide advance in the treatment of obesity.

Keywords: GLP1, liraglutide, hypothalamus, proopiomelanocortin, leptin, insulin

Introduction

Obesity is one of the most prevalent non-communicable diseases in the world (1). In the last 40 years, its prevalence has doubled in more than 70 countries worldwide, contributing to an increase in the prevalence of type 2 diabetes (T2D), cardiovascular diseases and some types of cancer (1-3). In addition, obesity is one of the most important risk factors for severe COVID-19 (4). Thus, the development of new and efficient strategies to prevent and treat obesity will have a considerable impact on public health all over the world.

The development of glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP1RA), such as liraglutide and semaglutide, has provided a great advance in the pharmacological treatment of obesity, leading to body mass reductions of up to 16 kg over a period of 68 weeks (5,6). GLP1RAs act in key neurons of the hypothalamus, promoting a reduction of food intake (7,8). Their use in humans has proven safe and currently provides an interesting intervention in patients that have both obesity and diabetes because, in addition to its hypothalamic effect of controlling hunger, GLP1RAs act on the pancreatic islets to increase glucose-stimulated insulin secretion (9,10).

Although the introduction of GLP1RAs represents a considerable advance, there is still a long way to go before we achieve an optimal approach to the treatment of obesity. In other complex, multifactorial diseases such as hypertension, diabetes and dyslipidaemia, the combination of distinct classes of drugs has proven efficient to improve the clinical control of patients (11-13) and provided great advances in therapeutics. With this concept in mind, we hypothesized that the combination of a GLP1RA with an agonist of GPR40 (FFAR1) could improve body mass reduction in a rodent model of obesity.

GPR40 (encoded by the FFAR1, Ffar1 gene) is a 31-kDa transmembrane protein that belongs to the class A G-protein coupled receptor (GPCR) family (14). It is activated by medium- and long-chain fatty acids, transducing signals mostly, but not exclusively, through Gq (15). Early studies have identified GPR40 in pancreatic islets, and its functional characterization revealed an important role in the amplification of glucose-induced insulin secretion (15). In 2017, we identified GPR40 in key hypothalamic neurons involved in the regulation of food intake and energy expenditure (16). In a short intervention, we showed that the hypothalamic injection of a chemical agonist of GPR40, TUG-905, promoted body mass reduction (16). Here, we hypothesized that the combined use of liraglutide and TUG-905 could promote a greater reduction in body mass than the use of either compound alone. We show that the combination of liraglutide and TUG-905 promotes superior body mass reduction, compared with liraglutide alone. In addition, the combination of both compounds promotes a significant increase in brown adipose tissue thermogenesis.

Materials and Methods

GLP1R and GPR40 agonists. Liraglutide was purchased from Novo Nordisk (Bagsværd, Denmark), and TUG905 was synthesized by one of us, as previously described (17).

Reagents. Reagents for real-time polymerase chain reaction (PCR) were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Primers for neuropeptide Y (NPY) (Mm00445771_m1), agouti-related peptide (AgRP) (Mm00475829_g1), proopiomelanocortin (POMC) (Mm00435874_m1), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) (Mm04210469_m1), hypocretin (orexin) (Mm01185776_m1), corticotropin releasing hormone (CRH) (Mm01293920_s1), melanin-concentrating hormone (MCH) (Mm01242886_g1), thyrotropin releasing hormone (TRH) (Mm01963590_s1), zinc finger protein of the cerebellum 1 (ZIC1) (Mm00656094_m1), peroxisome proliferator activator gamma coactivator 1 alpha (PGC1α) (Mm00447183_m1), uncoupling protein-1 (UCP1) (Mm01244861_m1), lipoprotein lipase (LPL) (Mm00434764_m1), fatty acid synthase (FAS) (Mm00662319_m1), diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) (Mm00515643_m1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) (#4352339E) were obtained from Applied Biosystems.

Experimental animals. Male Swiss mice were bred at the animal facility of the University of Campinas and maintained in individual cages with a 12-h photoperiod at 22°C–24°C and ad libitum food (chow diet) and water. Beginning at the sixth week of life, mice were fed a high-fat diet (HFD, 60% of energy value from fat, **Table 1**) for 4 weeks. All experimental procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Campinas (4639-1/2017 and 4639-1(A)/2020).

Experimental protocols. At the end of the experimental period, mice were anesthetized and positioned in a Stoelting stereotaxic apparatus to place a cannula in the lateral ventricle set on the following coordinates: anteroposterior, 0.34 mm; lateral, 1.0 mm and depth, 2.2 mm. Correct positioning of the cannula was tested five days after cannulation by evaluation of the thirst response elicited by intracerebroventricular (ICV) angiotensin II (10^{-6} M). All mice were weighed, numbered and submitted to body mass Z-score separation into four groups as follows: vehicle (HFD), liraglutide (LIRA), TUG-905 (TUG) and liraglutide + TUG-905 (LT). Treatments were administered via the ICV (TUG-905, 2 µL 1 mM) and intraperitoneal (IP) (liraglutide, 100 µL 1.0 mg/kg) routes once a day for 7 days. Food intake and body mass were determined during the intervention period. In each group, some mice were randomly selected for indirect calorimetry measurements. At the end of the experiment, the hypothalamus and epididymal and brown adipose tissues (BAT) were collected for real-time PCR analysis.

RNA extraction and quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted using the commercially available acid-phenol reagent TRIzol (Invitrogen Corp.) and then centrifuged at 10,500 rpm for total RNA isolation. The RNA concentration was determined spectrophotometrically using an Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), which runs on Gen5 2.0 Data Analysis Software. Aliquots of RNA were submitted to reverse transcription using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time PCRs were performed by using the TaqMan system (Applied Biosystems). The GAPD gene was chosen as an endogenous reaction control to normalize the expression of genes of interest. Quantitative PCR was performed to determine the expression of NPY, AgRP, POMC, CART, orexin, CRH, MCH and TRH in the hypothalamus. In the adipose tissues, qPCR was performed to determine the expression of ZIC1, PGC1α and UCP1 in the BAT and LPL, FAS and DGAT1 in the epididymal tissues. For the relative quantification of the gene under study, real-time PCRs were performed in duplicate using 3.5 μl of TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0.25 μl of oligonucleotide solution and probe, 0.25 μl of water and 4.0 μl cDNA (40 ng). The thermal cycling program was 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. The relative gene expression values were obtained by analysing the results in the StepOne Plus System Software program (Applied Biosystems).

Glucose Tolerance Test and Fasting Blood Glucose*.* On the fifth day of the intervention, an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) was performed on non-anesthetized mice. Blood glucose levels were measured with an OptiumTM mini (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, USA) handheld glucometer using the appropriate test strips. A solution of 25% glucose (1.0 g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail vein at 15, 30, 60, 90 and 120 min post-glucose administration for the determination of glucose concentrations. The area under the curve (AUC) was calculated using these values. Before tissue collection at the end of treatment, fasting blood glucose was measured in mice after a 4-h fast.

Indirect calorimetry. Oxygen consumption, carbon dioxide production and energy expenditure were recorded for 24 h (light and dark cycles) by using an indirect open-circuit calorimeter (LE405 gas analyser, Panlab/Harvard Apparatus). Mice were single housed in clear respiratory chambers, and room air passed through the chambers at a flow rate of 10 times the body weight of each animal. The analyses were measured by Metabolism version 2.2, and the respiratory quotient was calculated as VCO2/VO2.

Interscapular temperature. For determination of interscapular BAT, a thermal imaging camera (FLIR T450sc, FLIR Systems) was used before and after treatment. Images are presented in the rainbow high-contrast mode that is available in the colour palette of the FLIR Tools software.

Statistical analysis. All results are presented as the mean ± SEM. Differences between treatment groups were evaluated using an unpaired Student's t-test or a one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a Bonferroni post hoc test was performed (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

The combination of liraglutide and TUG-905 promoted superior body mass reduction, compared with liraglutide alone. Six-week-old mice were fed on a HFD for four weeks and then randomly divided into four groups treated with vehicle, liraglutide, TUG-905 (icv) or a combination of liraglutide + TUG-905 (icv) (Fig. 1A). As compared to vehicle, all three interventions resulted in increased body mass reduction over a period of eight days (Fig. 1B-1C). However, mice submitted to the combined treatment with liraglutide + TUG-905 presented the greatest reduction of body mass (Fig. 1B-1C). Only the liraglutide and the liraglutide + TUG-905 groups presented reduction of food intake (Fig. 1D). There was no significant reduction of body white adipose tissue depots (not shown); however, there were reductions in the expression of genes encoding both lipolytic (lipoprotein lipase, LPL, Fig. 1E) and lipogenesis-related (diacylglycerol O-acyltransferase 1, DGAT1, Fig. 1F; and fatty acid synthase, FAS, Fig. 1G) enzymes. The interventions promoted no significant changes in whole-body energy expenditure (Fig. 1H-1K); whereas only treatment with TUG-905 alone promoted a reduction of the respiratory quotient during the dark phase of the day cycle (Fig. 1L-1M).

Treatments with TUG-905 but not liraglutide alone promoted increased brown adipose tissue thermogenesis. Brown adipose tissue has emerged as an interesting potential target for the treatment of obesity and metabolic disease (18-20). Here, we used a thermographic camera to determine interscapular temperature as a surrogate marker of BAT activity. As shown in Figures 2A-2F, treatments with TUG-905 alone and liraglutide + TUG-905 promoted significant increases in the interscapular temperature. This was accompanied by increased expression of the thermogenic markers Zic1 (Fig. 2H) and Ucp1 (Fig. 2I) in the liraglutide and liraglutide + TUG-905 groups.

Effects of the interventions on the expression of hypothalamic neurotransmitters. Selected subpopulations of hypothalamic neurons are involved in the regulation of food intake and energy expenditure (21-23). Here, we evaluated the impact of the interventions on the expression of transcripts encoding neurotransmitters that play important roles in these functions. Liraglutide alone promoted an increase in the expression of the anorexigenic neurotransmitter POMC (Fig. 3A) and a reduction in the expression of the orexigenic neurotransmitter AgRP (Fig. 3D). TUG-905 alone promoted an increase in the expression of the orexigenic neurotransmitter NPY (Fig. 3C). The

combination of liraglutide + TUG-905 promoted increases in the expression of the neurotransmitters TRH (Fig. 3E) and MCH (Fig. 3H).

Effects of the interventions on glucose tolerance. Interventions with liraglutide alone and liraglutide + TUG-905, but not with TUG-905 alone, resulted in reduced fasting glucose (Fig. 4A) and reduced area under the curve in a glucose tolerance test (Fig. 4B-4C).

Under pair-feeding, mice treated with TUG-905 match body mass reduction promoted by liraglutide alone. When used alone, TUG-905 promoted a smaller body mass reduction than either liraglutide alone or liraglutide + TUG-905. We asked if the differences in body mass reduction could be due to differences in food intake alone. Thus, all groups were pair-fed with mice treated with liraglutide alone, and parameters were determined over a seven-day period. Under pair-feeding, mice treated with TUG-905 alone matched the body mass reduction promoted by liraglutide alone; however, the body mass reduction was obtained with the combination of liraglutide + TUG-905 (Fig. 5A). There were no differences in O2 consumption (Fig. 5B), CO2 production (Fig. 5C), energy expenditure (Fig. 5D-5E) and the respiratory quotient (Fig. 5F-5G). Blood glucose was reduced in the groups treated with liraglutide (Fig. 5H).

Discussion

This study shows that combining the GLP1RA liraglutide with an agonist of GPR40, TUG-905, results in greater body mass loss than liraglutide alone, and this effect is accompanied by an increase in the thermogenic activity of BAT.

GLP1RAs, particularly liraglutide and semaglutide, have emerged as efficient and safe interventions to treat both T2D and obesity. In the pancreatic islets, they act as incretins, increasing glucose-stimulated insulin secretion (24), whereas in the brain, they act predominantly, but not exclusively, by increasing the activity of anorexigenic and suppressing the activity of orexigenic neurons of the hypothalamic arcuate nucleus (7,8). Despite the advance provided by the introduction of this class of drug, body mass reductions obtained over long intervention periods only approach 15 kg (7). This is undisputedly effective for promoting metabolic control but is still below the magnitude needed to provide a return to normal or near-normal body mass in most patients. Thus, further advances are needed in order to achieve optimal pharmacological therapy for obesity.

In complex, multifactorial diseases such as T2D, hypertension and dyslipidaemia, great therapeutic advances have been obtained by the combination of different drugs (11-13). For T2D, the American Diabetes Association recommends the use of seven distinct classes of drugs that can be, under certain conditions, combined to offer optimal metabolic control (25). Likewise, for hypertension, the International Society of Hypertension has defined strategies that employ the combination of up to

four drugs belonging to 11 distinct classes (26), whereas for dyslipidaemia there are 10 classes of drugs that can be used alone or in combination to produce optimal control (27).

The early identification of GPR40 in pancreatic islets and the characterization of its role stimulating glucose-induced insulin secretion (15) motivated the development of pharmacological agonists that were eventually tested in clinical trials and proved safe and efficient for the treatment of patients with T2D (28-30).

The hypothalamus is yet another region that expresses GPR40 (16,31-33). Hypothalamic neurons sense the energy stores in the body and respond by producing signals that control food intake and energy expenditure (34,35). Because of their central role in the regulation of whole-body energy balance, hypothalamic neurons have emerged as important targets for the treatment of obesity. In a previous study, we showed that icv TUG-905 promoted body mass reduction and tended to reduce food intake (16), thus revealing that hypothalamic GPR40 could be an interesting target as a pharmacological strategy to treat obesity.

Here, using a combination of liraglutide + TUG-905, we showed that this combination reduced body mass by more than either agonist alone. There was no significant change in energy expenditure; however, in both groups receiving TUG-905, there were increases in interscapular temperature and the expression of BAT thermogenic markers.

BAT is regarded as a promising target for the development of drugs that could be employed in the treatment of obesity and other metabolic disorders (36-38). Under stimulus, brown adipocytes increase energy expenditure by undergoing uncoupled respiration, which bypasses ATP production, leading to an increased release of heat (39). Cold exposure is undisputedly the most studied physiological mechanism that induces BAT activity (40). It has been tested in clinical studies and shown to increase oxidative capacity (41), triglyceride lipolysis (42) and glucose tolerance (43). However, as a therapeutic intervention to be used on a large scale, cold exposure is not practical and would certainly result in low adhesion. Physical activity is yet another physiological intervention that promotes increased BAT activity (44). Combined training, which is recommended by major diabetes and cardiovascular medical societies (45,46), promotes increased glucose uptake in BAT, which is correlated with increased systemic levels of irisin and adiponectin (47). Even though motivating the regular practice of physical activity is a key component of the lifestyle changes proposed to patients with obesity and metabolic disorders, only a fraction of them can actually adopt this intervention for life. Thus, developing drugs that could stimulate BAT activity is expected to result in therapeutic advances in the field.

Mirabegron, a β3-adrenergic agonist, has been tested in clinical trials and shown to promote a great increase in BAT activity (48,49). However, its adverse cardiovascular effects are considerable and could be a factor limiting clinical use (48). Nevertheless, these studies provide evidence for the potential therapeutic advances that could be obtained by the development of safer β3-adrenergic agonists.

When GLP1RAs were approved for the treatment of obesity, there were lofty expectations regarding their action in BAT. In an experimental study, liraglutide was shown to stimulate BAT activity through a mechanism dependent on the activation of hypothalamic AMPK (50). However, it has been argued that this mechanism may not play a leading role in body mass reduction promoted by the drug (51).

In our experimental model, liraglutide alone promoted an increase in the expression of UCP1 in BAT; however, there was no detectable increase in the interscapular temperature. Conversely, in both groups receiving TUG-905, there were increases in interscapular temperature, and, particularly in the group treated with liraglutide + TUG-905, there were increases in the expression of the thermogenic BAT markers UCP1 and ZIC1, and this was accompanied by an increasing trend in PGC-1α. Moreover, in all three groups that received pharmacological intervention, there were no reductions in whole body energy expenditure. This is important because under calorie restriction there is a compensatory reduction in energy expenditure, and the maintenance of whole body energy expenditure has been proposed as one of the mechanisms contributing to body mass reduction in experimental models treated with GLP1RA (7). Here, we propose that this beneficial outcome is reproduced when mice are treated either with TUG-905 or with liraglutide + TUG-905.

The hypothalamic regulation of whole-body energy balance results from the combined actions of a complex network of neurons that respond to multiple endocrine, nutritional and neural signals (52-54). Liraglutide and semaglutide have been shown to act primarily by controlling anorexigenic POMC neurons (7,8). Here, we reproduced some of these findings, showing that in mice treated with liraglutide alone, there was an increase in the hypothalamic expression of POMC and a reduction of AgRP. In addition, we showed that, particularly in the liraglutide + TUG-905 group, there was a regulation of the hypothalamic neuronal system as both TRH and MCH were increased.

An important outcome that is expected from interventions aimed at reducing body mass is the correction of glucose intolerance. In this study, both liraglutide alone and liraglutide + TUG-905 resulted in improved glucose tolerance. Both GLP1RAs and agonists of GPR40 can improve glucose tolerance by acting directly on the pancreatic islets to increase glucose-induced insulin secretion (15,24). In this study, we used liraglutide via IP injections and TUG-905 via ICV injections; thus, the beneficial effect seen in glucose tolerance, which was significant only in the groups receiving

liraglutide, could be mostly attributed to the direct effect of the drug on the pancreas. However, studies have shown that activation of hypothalamic POMC neurons can also promote an improvement of systemic glucose tolerance (55). Thus, in future studies, it could be investigated if the benefits on glucose tolerance result from the combined actions of liraglutide and TUG-905 only in the direct control of insulin secretion in the pancreatic islets or as a result of combined action in the pancreas and hypothalamus.

In conclusion, in an experimental model of diet-induced obesity, the pharmacological association of a GLP1RA and an agonist of GPR40 promoted beneficial effects, leading to greater body mass reduction than that obtained by liraglutide alone. This effect seems to be due, at least in part, to the increase in BAT activity. As GLP1RAs are already approved for the treatment of obesity, and agonists of GPR40 have already been tested and proved safe in clinical trials, future studies could test this association in human obesity.

Relevant conflicts of interests:/financial disclosures. The authors declare that no conflicts of interests exist.

Funding agencies. LAV, São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2013/07607-8). LSP, São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2017/14298-2 and FAPESP – 2020/08489-2). Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico, INCT-Neuroimmunomodulation. Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Innovation Fund Denmark (ANFA, 5133-00007B).

Author's contribution statement. LSP and LAV conceptualized and designed the experiments; EAR contributed to methodological improvements and discussed results; PAN and EAR performed the majority of the experiments; GAN and CS performed the stereotaxic surgeries and the angiotensin tests; AP synthesized TUG905 under supervision of TU; LSP contributed to mouse experiments and analytical methods. LSP and LAV discussed and organized results; LSP and LAV wrote the paper; LSP was also responsible for funding acquisition. All authors contributed to the editing and discussion of the manuscript.

Acknowledgment. The authors thank Joseane Morari, Marcio Cruz and Gerson Ferraz for laboratory management.

Table 1. Macronutrient composition of the diets

Component	Chow (g)	HFD (g)
Starch	427.5	115.5
Protein (casein 85%)	200	200
Dextrinized corn starch	132	132
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Lard	0	312
Fiber (cellulose)	50	50
Mineral mix (AIN-93)	35	35
Vitamin mix (AIN-93)	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
Total	1000	1000

11.3.2 Figuras

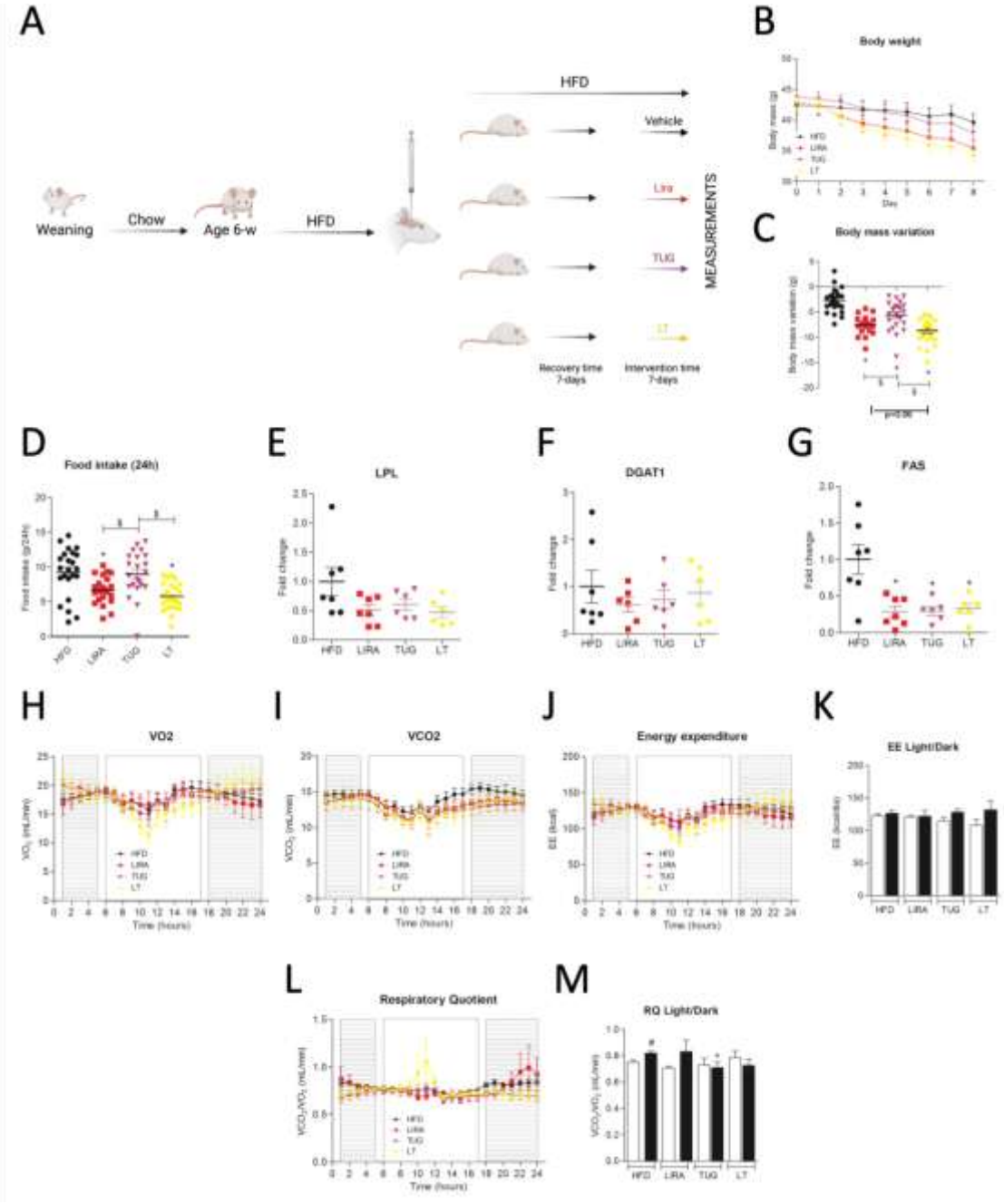


Figure 1. Effects of interventions on metabolic parameters and lipolytic and lipogenic gene expression. A. Schematic representation of the experimental design. **B,C.** Body mass reduction. **C.** Food intake measured on the fourth day of the intervention. **E-G.** Transcripts for LPL, DGAT1 and FAS were determined in the white adipose tissue of mice. **H-M.** Indirect calorimetry with values for O2 consumption (**H**), CO2 production (**I**), energy expenditure (**J,K**) and respiratory quotient (**L,M**). n = 22–25 (**B-D**); n = 5–7 (**E-G**); n = 6 (**H-M**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. another group; #p < 0.05 vs. Light.

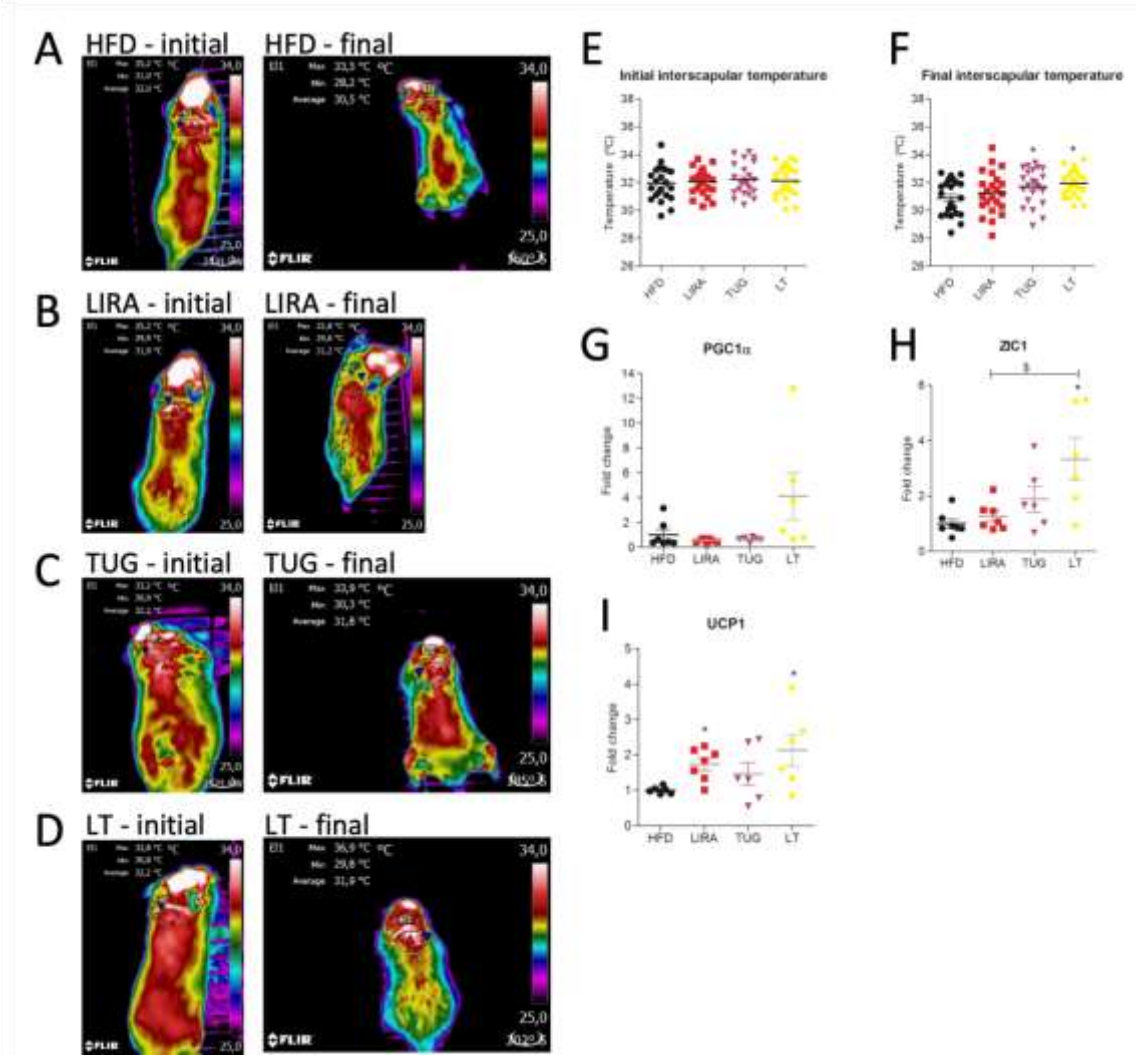


Figure 2. Brown adipose tissue thermogenesis increases with TUG-905 treatment. **A-D.** Representative images of each group with initial and final BAT temperatures, vehicle (HFD) (**A**), liraglutide (LIRA) (**B**), TUG-905 (TUG) (**C**) and liraglutide + TUG-905 (LT) (**D**). **E, F.** BAT temperature before (**E**) and after (**F**) intervention. **G-I.** Expression of the thermogenic markers PGC1α (**G**), ZIC1 (**H**) and UCP1 (**I**). n = 22–25 (**A-F**); n = 5–7 (**G-I**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. another group.

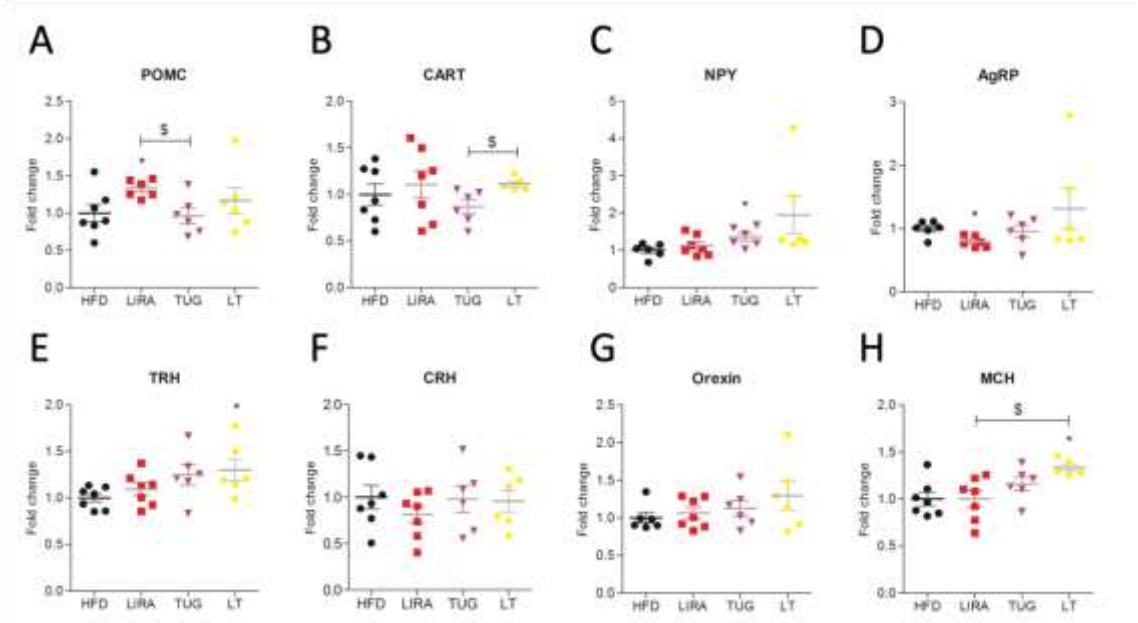


Figure 3. Effects of interventions on the expression of hypothalamic neurotransmitters. POMC (**A**), CART (**B**), NPY (**C**), AgRP (**D**), TRH (**E**), CRH (**F**), orexin (**G**) and MCH (**H**). n = 5–7; *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. another group.

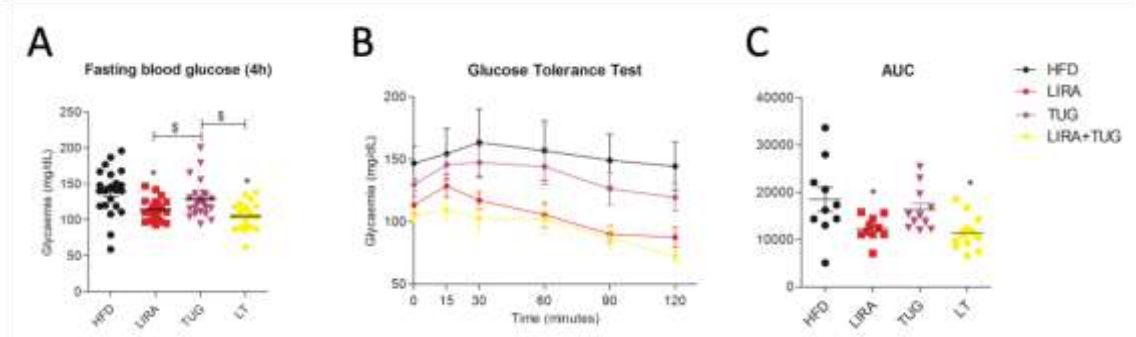


Figure 4. Effects of interventions on glucose tolerance. Fasting blood glucose (4 h) (**A**). Glucose Tolerance Test (GTT) (**B**). Area Under the Curve (AUC) (**C**). n = 23–25 (**A**), n = 10–13 (**B,C**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. another group.

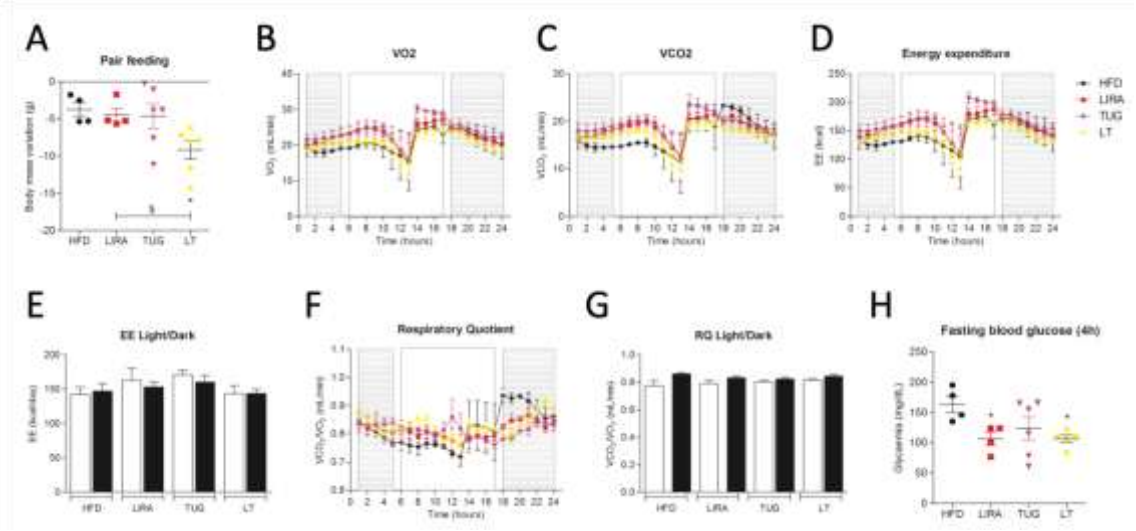


Figure 5. Pair feeding. Body weight (**A**). Indirect calorimetry with values for O2 consumption (**B**), CO2 production (**C**), energy expenditure (**D,E**) and respiratory quotient (**F,G**). Fasting blood glucose (4 h) (**H**). n = 4–6 (**A,H**); n = 2–6 (**B-G**); *p < 0.05 vs. HFD; $p < 0.05 vs. another group.