



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

RINALDO CESAR FERREIRA DE MELO FILHO

**AVALIAÇÃO DA SEMAGLUTIDA NO TRATAMENTO DA
DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA EM MODELO DE
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Recife
2024

RINALDO CESAR FERREIRA DE MELO FILHO

**AVALIAÇÃO DA SEMAGLUTIDA NO TRATAMENTO DA
DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA EM MODELO DE
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Me. Rodrigo Soares da Silva
Coorientadora: Dr^a Christina Alves
Peixoto

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Melo Filho, Rinaldo Cesar Ferreira de.

Avaliação da semaglutida no tratamento da doença hepática esteatótica em
modelo de obesidade induzida por dieta / Rinaldo Cesar Ferreira de Melo Filho.
- Recife, 2024.

43 p. : il., tab.

Orientador(a): Rodrigo Soares da Silva

Cooorientador(a): Christina Alves Peixoto

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Esteatose. 2. Fígado. 3. Obesidade. 4. GLP-1. I. Silva, Rodrigo Soares da.
(Orientação). II. Peixoto, Christina Alves. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

RINALDO CESAR FERREIRA DE MELO FILHO

**AVALIAÇÃO DA SEMAGLUTIDA NO TRATAMENTO DA
DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA EM MODELO DE
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Me. Rodrigo Soares da Silva
Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Mariana Aragão Matos Donato
Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Biociências

Me. Ingrid Prata Mendonça
Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz

Dedico este trabalho à Amélia, por ter me incentivado na escolha da Biomedicina e ter se alegrado comigo. À minha avó, Malvina, por ter sonhado primeiro. E à minha mãe, Susana, por me fazer acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Me. Rodrigo Soares, por todo apoio, discernimento, ajuda e conhecimento da ciência repassados a mim. Pela paciência no ensino e pela vontade de transmitir seu conhecimento e experiência. Agradeço também à Prof. Dr^a. Christina Peixoto, minha coorientadora, por ter me dado a oportunidade de colaborar com este projeto, do qual sou muito grato por ter participado.

Aos componentes da banca examinadora, minha profunda gratidão por terem aceitado o convite de participar deste momento importante em minha vida. Agradeço pelo tempo empregado na leitura e avaliação deste trabalho, assim como pelas considerações.

Aos membros do Laboratório de Ultraestrutura do Instituto Aggeu Magalhães, por todo conhecimento repassado, o companheirismo e a ajuda na pesquisa nos momentos necessários, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz Pernambuco e a todos os seus técnicos e colaboradores pela oportunidade de participar da comunidade científica brasileira e toda a estrutura disponibilizada para realização dos trabalhos. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

À Universidade Federal de Pernambuco, aos gestores do Centro de Biociências, à coordenação e aos professores do curso de Biomedicina, além dos colaboradores, pela estrutura e transmissão de conhecimento, demonstrando a excelência no ensino público, com respeito e carinho.

À Débora Rayane, Nathalia Lorena e Neila Caroline que também fizeram parte dessa jornada, pelo apoio e carinho, por transformarem o ambiente no qual convivemos em um lugar melhor.

Aos meus colegas de curso, e amigos para a vida, Álvaro Martiniano, Bruna Maria, Bruna Queiroz, Francielle Maria, Jonathan Guabiraba, Roberto Fernandes e Tayzes Hagabea, pelos momentos de alegria e descobertas ao longo do curso, as horas de estudos compartilhadas e o apoio emocional que tornaram a trajetória até aqui mais leve.

À Geise Hellen, por me acompanhar ao longo do curso, se alegrar comigo nas minhas conquistas, ser minha confidente nos momentos necessários e me fazer acreditar em quem eu sou.

À minha família, por me proporcionarem a oportunidade de estudar com tranquilidade e me apoiarem na escolha do curso. Por todo amor demonstrado ao longo da minha vida.

Agradeço também a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, principalmente, a Deus. Por ter me sustentado no momento em que caí e me dado saúde para enfrentar essa jornada. Por me orientar nas tomadas de decisões, ter me protegido e colocado pessoas maravilhosas ao meu redor. Sem Ele eu não teria chegado até aqui.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

(Hipócrates)

MELO FILHO, Rinaldo Cesar Ferreira de. **Avaliação da semaglutida em modelo experimental de doença hepática esteatótica metabólica induzida por dieta.** 2024. 43. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A prevalência da obesidade tem aumentado expressivamente em todo mundo, inclusive no Brasil. A Síndrome Metabólica (SM) é o conjunto de condições relacionadas à obesidade que podem causar doenças. A doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD) é uma doença assintomática e progressiva, sendo uma das manifestações hepáticas da SM e tem como principal fator o efeito combinado da resistência à insulina (RI), acúmulo de gordura nos hepatócitos e ativação de cascatas inflamatórias. A semaglutida é um agonista do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1 humano (GLP-1R), que atua aumentando a secreção e a sensibilidade à insulina, suprime a liberação do glucagon e desacelera o esvaziamento gástrico, diminuindo o apetite. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da semaglutida (análogo GLP-1) sobre a via metabólica, a morfologia e a inflamação hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL6 (n = 45), divididos aleatoriamente em três grupos (Controle, HFD e HFD + Semaglutida) para avaliações bioquímicas por ensaio imunoenzimático, histopatológicas utilizando as colorações HE e Oil Red O, e a expressão de marcadores inflamatórios através de Imuno-histoquímica e Western Blot. Os resultados evidenciaram que os animais expostos à dieta HFD apresentaram aumento significativo do peso corporal, demonstrando sucesso na indução da obesidade. Porém, na primeira semana após a administração da semaglutida, já se observou redução significativa no peso dos animais do grupo HFD+Semaglutida, o que se manteve até o final do tratamento. A terapia melhorou significativamente as alterações na glicemia, TG, LDL, CT e HOMA-IR. A semaglutida melhorou significativamente as alterações no fígado (esteatose, inflamação) e reduziu o acúmulo de lipídios, assim como diminuiu significativamente a expressão de marcadores inflamatórios, o que pode estar parcialmente envolvido com a inibição indireta do NF-κB. Em conclusão, nosso estudo indica que a semaglutida pode ser uma nova estratégia para o tratamento da MASLD.

Palavras-chave: Esteatose. Fígado. Obesidade. GLP-1.

MELO FILHO, Rinaldo Cesar Ferreira de. **Avaliação da semaglutida em modelo experimental de doença hepática esteatótica metabólica induzida por dieta.** 2024. 43. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The prevalence of obesity has increased significantly worldwide, including in Brazil. Metabolic Syndrome (MS) is a group of obesity-related conditions that can cause disease. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is an asymptomatic and progressive disease, one of the hepatic manifestations of MS, and its main factor is the combined effect of insulin resistance (IR), fat accumulation in hepatocytes, and activation of inflammatory cascades. Semaglutide is an agonist of the human glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R), which acts by increasing insulin secretion and sensitivity, suppressing glucagon release, and slowing gastric emptying, decreasing appetite. The aim of this study was to evaluate the effects of semaglutide (GLP-1 analogue) on the metabolic pathway, morphology, and hepatic inflammation in an experimental model of diet-induced obesity. For this purpose, C57BL6 mice (n = 45) were randomly divided into three groups (Control, HFD and HFD + Semaglutide) for biochemical evaluations by enzyme-linked immunosorbent assay, histopathological evaluations using HE and Oil Red O staining, and the expression of inflammatory markers through immunohistochemistry and Western Blot. The results showed that animals exposed to the HFD diet showed a significant increase in body weight, demonstrating successful induction of obesity. However, in the first week after administration of semaglutide, a significant reduction in the weight of animals in the HFD + Semaglutide group was observed, which remained until the end of treatment. The therapy significantly improved changes in blood glucose, TG, LDL, TC and HOMA-IR. Semaglutide significantly improved liver changes (steatosis, inflammation) and reduced lipid accumulation, as well as significantly decreased the expression of inflammatory markers, which may be partially involved with indirect inhibition of NF- κ B. In conclusion, our study indicates that semaglutide may be a novel strategy for the treatment of MASLD.

Key words: Steatosis. Liver. Obesity. GLP-1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro da MASLD	18
Figura 2 – Patogênese e progressão molecular da MASLD	20
Figura 3 – Efeitos da semaglutida no peso corporal e consumo médio de ração em camundongos C57BL/6	27
Figura 4 – Análises dos parâmetros metabólicos da resistência à insulina (glicose, insulina e índice HOMA-IR) entre os grupos experimentais	29
Figura 5 – Efeitos da semaglutida nas análises histopatológicas hepáticas de camundongos C57BL/6	30
Figura 6 – Análise de imuno-histoquímica para interleucina 1- β (IL-1 β) e COX-2 em camundongos alimentados com dieta HFD tratados com semaglutida	31
Figura 7 – Western Blot para análise da expressão de MCP-1, p-NF- κ B e IL-1 β , TNF- α e IL-6 no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) tratados com semaglutida	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição do perfil lipídico de acordo com os grupos experimentais 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
AGL	Ácidos Graxos Livres
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DC	Células Dendríticas
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DNL	Lipogênese “de novo”
DPP-4	Dipeptidil-peptidase-4
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FAS	Ácido Graxo Sintase
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon - 1
GLP-1R	Receptor do Peptídeo Semelhante ao Glucagon - 1
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina-Eosina
IEL	Linfócitos Intraepiteliais Intestinais
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
JNK	C-Jun N-terminal Quinase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MASH	Esteatohepatite Associada à Disfunção Metabólica
MASLD	Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica
MCP-1	Proteína Químioatraente de Monócito 1
NF- κ B	Fator Nuclear- κ B
NK	Célula Natural Killer
NKT	Célula Natural Killer T
RI	Resistência à Insulina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SM	Síndrome Metabólica
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA (MASLD).	17
2.2	ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA MASLD.....	17
2.3	ALVOS FARMACOLÓGICOS CONTRA MASLD.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
4.2	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	24
4.3	HISTOPATOLOGIA.....	25
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	25
4.5	WESTERN BLOT.....	25
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5	RESULTADOS.....	27
5.1	ANÁLISES ANTROPOMÉTRICAS.....	27
5.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	28
5.3	HISTOPATOLOGIA.....	29
5.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	30
5.5	WESTERN BLOT.....	32
6	DISCUSSÃO.....	34
7	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

ANEXOS.....43

ANEXO A – Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA/IAM)

1 Introdução

O sobrepeso e a obesidade são os distúrbios nutricionais mais comuns na civilização moderna e tornaram-se um grande problema de saúde mundial. De acordo com Estivaleti *et al.*, 2022, a prevalência da obesidade tem crescido em todo mundo, inclusive no Brasil. Dados epidemiológicos demonstram que, em 2019, 25,9% da população adulta brasileira se encontrava obesa (IBGE, 2020). As alterações metabólicas relacionadas à obesidade, como resistência à insulina (RI), hipertensão, dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo, têm sido reconhecidas e agrupadas para definir atualmente a síndrome metabólica (SM) (Fahed *et al.*, 2022). A SM consiste em um conjunto de condições inter-relacionadas, que podem levar ao desenvolvimento da Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (MASLD), uma condição clínico-patológica definida pelo acúmulo anormal de gordura no citoplasma dos hepatócitos, excedente a 5% do peso hepático total e pode ser diagnosticada por exames de imagem ou histológicos (De Brito e Silva *et al.*, 2021; Polyzos; Kountouras; Mantzoros, 2019; Younossi *et al.*, 2023).

A MASLD trata-se de uma patologia assintomática e progressiva que inclui esteatose simples e pode evoluir para esteatohepatite associada à disfunção metabólica (MASH), representando a forma inflamatória, e fibrose, com maior potencial de progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (Weiss; Rau; Geier, 2014). É sabido que os principais fatores para a patogênese e progressão da MASLD são os efeitos combinados da resistência à insulina, do estresse oxidativo, e da cascata inflamatória (Piazzolla; Mangia, 2020). A atual teoria (múltiplas etapas) proposta para o desenvolvimento da MASLD, descreve uma explicação mais sólida e complexa onde dieta, ambiente e obesidade podem provocar RI, hiperplasia da massa adiposa, alteração da microbiota intestinal (disbiose), entre outros fatores.

A RI é considerada como o principal fator, por estimular a lipólise e a produção de adipocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) no tecido adiposo. Além disso, RI no fígado induz a lipogênese hepática em níveis tóxicos e inibe a via da beta oxidação (β -oxidação) e do efluxo lipídico (VLDL). O acúmulo de ácidos graxos e seus metabólitos pode promover o estresse lipotóxico, que por sua vez ativa o estresse oxidativo que leva à síntese e ao acúmulo de mediadores pró-inflamatórios (Fotbolcu; Zorlu, 2016).

O GLP-1 é uma incretina produzida primariamente nas células L (enteroendócrinas) distribuídas ao longo do intestino em resposta à ingestão de alimentos. Seus efeitos no metabolismo se dão por estimular a secreção de insulina, promover redução de apetite e redução da ingestão de alimentos, efeitos cardio e neuroprotetores e diminuição da inflamação e da apoptose (Müller *et al.*, 2019; Diz-Chaves *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2015). O GLP-1R é um receptor acoplado à proteína G heterotrimérica que transduz os efeitos fisiológicos do GLP-1. Os GLP-1Rs são expressos nas células β e em algumas células α e δ no pâncreas, nos sistemas nervosos entérico e central, intestino, linfócitos intraepiteliais intestinais (IEL), células endoteliais e células musculares lisas vasculares, entre outros (McClean *et al.*, 2020).

O potencial farmacológico do GLP-1 endógeno é limitado, devido ao tempo de meia-vida muito curto (cerca de 2 minutos) em razão da degradação pela enzima endógena dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4) (Mentlein; Gallwitz; Schmidt, 1993). Assim, é necessária a utilização de agonistas do GLP-1R que são resistentes à degradação por DPP-4, e, conseqüentemente, mostram melhor biodisponibilidade e eficácia clínica (Müller *et al.*, 2019). Além disso, demonstraram ser eficazes no tratamento de pacientes com MASLD com diabetes e são capazes de influenciar significativamente o metabolismo hepático (Bifari *et al.*, 2018; Newsome *et al.*, 2019; Newsome *et al.*, 2021).

Portanto, este trabalho tem como objetivo explorar o efeito da semaglutida (agonista do GLP-1R) nos mecanismos moleculares que ligam a sinalização do GLP-1R sobre o metabolismo, a histopatologia e a inflamação hepática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (MASLD)

A MASLD, outrora chamada de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), é considerada a hepatopatia mais comum e, nos últimos anos, a sua prevalência está crescendo em todo o mundo, em paralelo com o aumento da obesidade e da Síndrome Metabólica (SM), e contribui significativamente para a morbidade e mortalidade relacionadas ao fígado (Vlad Dumitru Brata; Tacke, 2024; Angeliki Katsarou *et al.*, 2024).

Estudos epidemiológicos globais, relatam que a MASLD afeta 30% da população geral em todo mundo, tendo a maior taxa de incidência entre todas as doenças que acometem o fígado (Le *et al.*, 2021; Huh; Cho; Nam, 2022). A prevalência da MASLD aumentou de 22% para 37% de 1991 a 2019 na população adulta no mundo (Le *et al.*, 2021). Salienta-se que a prevalência da MASLD sofre influências tanto de variações geográficas quanto étnicas. Diante disso, após análise estratificada por região, observa-se uma maior prevalência no Oriente Médio e América do Sul e menor na África (Chan *et al.*, 2023; Younossi *et al.*, 2017; Younossi *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2021).

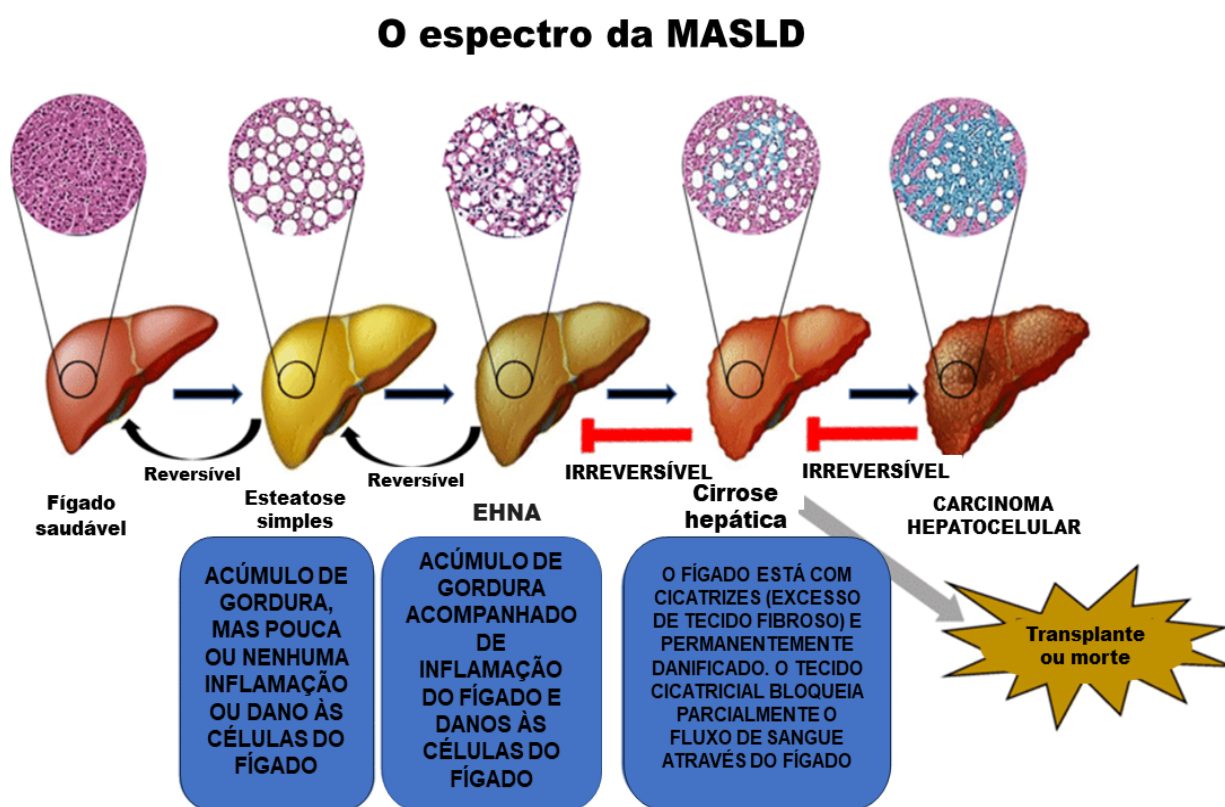
No Brasil tem crescido a prevalência de obesidade associada à SM, o que, por consequência, resulta em um aumento na frequência da MASLD. (Cotrim *et al.*, 2016). No entanto, são poucos os estudos sobre a prevalência da MASLD na população do país. Cabe destacar um estudo, realizado na Bahia com 217 mulheres obesas, que analisou por meio de ultrassonografia a presença de esteatose hepática e encontrou uma prevalência de esteatose hepática de 41,5% (Oliveira, 2020).

2.2 Aspectos da Fisiopatologia da MASLD

Conforme descrito anteriormente, a MASLD é uma doença complexa e de origem multissistêmica, estando fortemente associada a fatores ambientais, como as dietas, com grandes quantidades de calorias provindas dos carboidratos e lipídios, e ao sedentarismo. Os fatores ambientais e o sedentarismo, de forma direta ou indireta, aumentam a incidência de obesidade e SM, resultando no desenvolvimento da MASLD (He *et al.*, 2020). Devido à sua alta taxa de incidência e,

consequentemente, alto valor econômico despendido, a MASLD se tornou um problema de saúde pública global (Sun; Zhou; Zhu, 2024). Trata-se de uma doença progressiva que abrange um espectro de alterações que varia, de uma condição benigna à forma grave de esteato-hepatite metabólica (EHNA), fibrose avançada e cirrose, podendo evoluir para carcinoma hepatocelular (HCC) conforme a Figura 1 (Sun; Zhou; Zhu, 2024; Wang *et al.*, 2020). A diminuição de gotículas de lipídios juntamente com a progressão da doença se dá pelo fato do aumento de fibrose e de infiltrados inflamatórios.

Figura 1 - Espectro da MASLD.



Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, 2020.

Histologicamente, a MASLD é caracterizada pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos, excedendo 5% do peso do fígado e sem a presença de causas secundárias, tais como: uso de álcool de forma abusiva, hepatites virais ou mesmo distúrbios hereditários (Mogna-Peláez *et al.*, 2024). De fato, a deposição de lipídios no fígado é um processo metabólico normal. No entanto, a maior causa de acúmulo

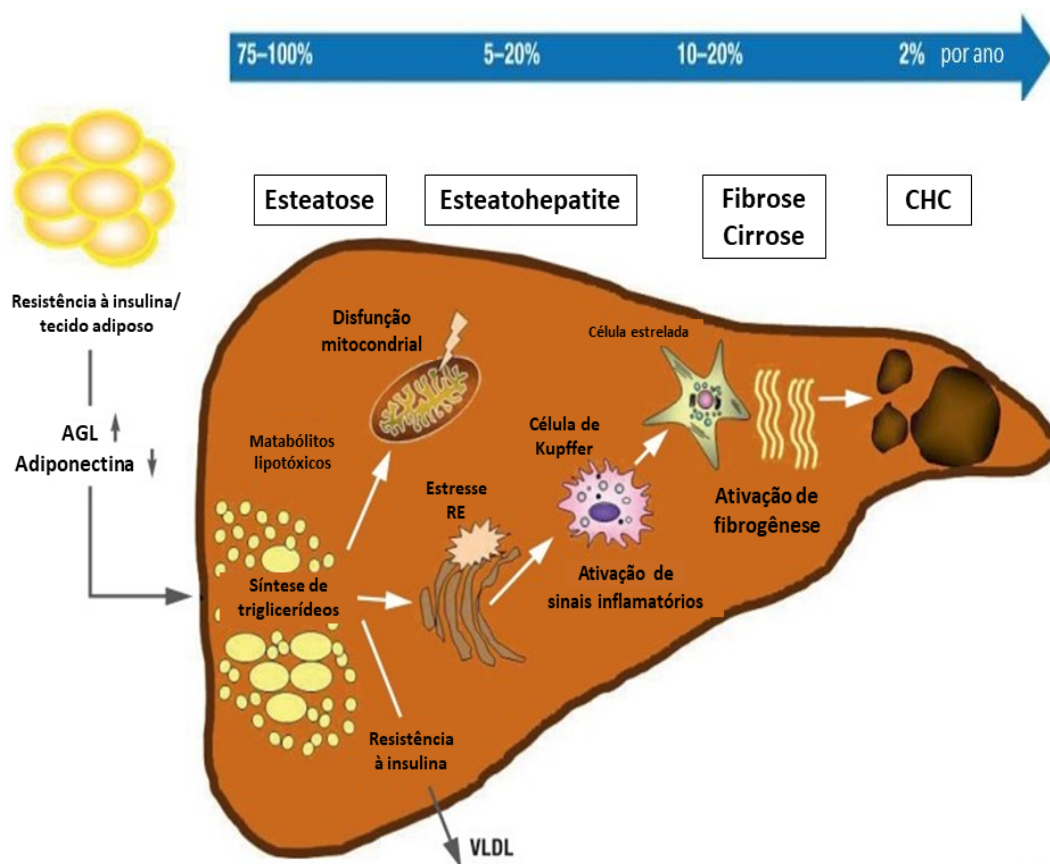
de gordura no parênquima hepático é a entrada de ácidos graxos livres (AGL) derivados da dieta, da lipólise do tecido adiposo em decorrência da RI e da lipogênese “de novo”, a via que gera lipídios a partir de carboidratos dentro dos hepatócitos (Hardy *et al.*, 2016; Friedman *et al.*, 2018; Dawood *et al.*, 2024; Scorletti; CARR, 2022).

O processo de lipogênese “de novo” (DNL), é uma via metabólica complexa através da qual substratos alimentares (carboidratos) são convertidos em TGs no fígado por meio de enzimas, incluindo a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) (Jensen-Urstad; Semenkovich, 2012, Lawitz *et al.*, 2022). A regulação positiva da DNL, principalmente em nível transcricional, está associada à ingestão excessiva de dietas hipercalóricas e a RI (Roumans *et al.*, 2020; Ferré; Foufelle, 2010; Zhu *et al.*, 2023), podendo contribuir para a progressão da MASLD (Tilg *et al.*, 2021).

É reconhecido que a obesidade é um fator de risco para RI e por sua vez, a RI no tecido adiposo leva ao aumento dos AGL circulantes (Hotamisligil, 2006; Wang *et al.*, 2020). Além disso, o fígado tem papel importante no metabolismo lipídico, participando da síntese de triglicerídeos (TGs) que podem ser armazenados ou secretados em forma de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Choi; Ginsberg, 2011). Entretanto, quando quantidades significativas de TGs superam sua capacidade de beta-oxidação mitocondrial, ou seja, um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de TGs pode levar ao desenvolvimento da esteatose hepática e induzir defeitos na sinalização da insulina (Delarue; Magnan, 2007; Wang *et al.*, 2020).

Esse aumento no armazenamento de gordura no fígado torna-o um ambiente suscetível à lipotoxicidade, que por sua vez favorece o estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo devido à disfunção mitocondrial e inflamação. Esses processos são, os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no início e progressão da doença (Figura 2) (Mogna-Peláez *et al.*, 2024; Emmanouil Korakas *et al.*, 2024; Huang, 2009; Polyzos *et al.*, 2023; Dawood *et al.*, 2024).

Figura 2 - Patogênese e progressão molecular da MASLD.



Fonte: Adaptado de Weiss; Rau; Geier, 2014.

Neste contexto, a lesão celular e ativação anormal de vias de sinalização intracelular levam ao recrutamento de células imunes e secreção de mediadores inflamatórios que possibilitam a progressão da esteatose hepática. Entre as células da imunidade inata que iniciam e mantêm a inflamação hepática incluem-se as células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado), monócitos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), e natural killer T (NKT) que produzem citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias, como a proteína quimioatraente monócito 1 (MCP-1), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Tosello-Tramont *et al.*, 2012; Kuchay; Choudhary; Mishra, 2020).

O TNF- α pode desencadear várias respostas inflamatórias através da ativação das vias do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e c-Jun N-terminal quinase (JNK)

(Marra *et al.*, 2008). A ativação NF- κ B dentro dos hepatócitos é suficiente para estimular inflamação hepática de baixo grau, esteatose, RI e a DNL (Heida *et al.*, 2021). Em contraste, os mecanismos moleculares que medeiam a inflamação e a lipogênese “de novo” permanecem no geral inexplorados (Gao *et al.*, [s.d.]).

O excesso de oxidação de AGL em mitocôndrias resulta no aumento do estresse mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, são capazes de causar danos crônicos nas organelas, o que interrompe a estrutura e a função dos hepatócitos (Marra *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2023). Notavelmente, os hepatócitos, apesar de possuírem um sistema antioxidante enzimático, sofrem com o efeito citotóxico do estresse oxidativo, levando à morte celular por necrose e apoptose, simultaneamente à inflamação (Feldstein *et al.*, 2003; Forman; Zhang, 2021; Li *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2022).

2.3 Alvos farmacológicos contra MASLD

Conforme mencionado anteriormente, vários fatores podem estimular coletivamente a patogênese da MASLD. Portanto, fármacos que possuam ações regulando o metabolismo lipídico e mitigando a inflamação e as lesões, devido ao estresse metabólico, se tornam terapias importantes para melhorar a MASLD.

A conexão da SM com fatores pró-inflamatórios está bem estabelecida na fisiopatogênese da MASLD (Kang *et al.*, 2021; Rinella *et al.*, 2023). Nos últimos anos, estudos pré-clínicos e clínicos em andamento visam a via metabolismo-inflamação-fibrogênese que indica que distúrbios metabólicos podem desencadear respostas inflamatórias que, de forma crônica, podem levar à lesão tecidual ao ativar fibroblastos ou, no caso hepático, células estreladas. (Tacke; Weiskirchen, 2018; Patouraux *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2014; Yong Ho Lee *et al.*, 2017; Sanyal *et al.*, 2019). Diante disso, evidências têm indicado que medicamentos antidiabéticos, como a metformina e as sulfoniluréias, foram capazes de melhorar a resistência à insulina, diminuir a inflamação e o acúmulo de gordura no fígado, eventos patológicos importantes na patogênese da MASLD (Al-Muzafar; Alshehri; Amin, 2021; Lin *et al.*, 2000; Rakoski *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2019; Promrat *et al.*, 2004; Soares e Silva *et al.*, 2015). Assim, fármacos que possam atuar na regulação

do metabolismo lipídico e reduzir a inflamação se tornam estratégias terapêuticas para a MASLD.

O peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) é uma incretina, produzido pelas células L enteroendócrinas do intestino, que foi identificado como um dos reguladores-chave do metabolismo energético (Hoffman; Khosrow Adeli, 2024; Subhodip Pramanik; Pal; Ray, 2024). O GLP-1 bioativo é rapidamente clivado pela dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), com tempo de meia vida na circulação menor que 2 minutos (Yabut; Drucker, 2022; Subhodip Pramanik; Pal; Ray, 2024). A ativação do GLP-1R está envolvida em diversos processos biológicos, principalmente em promover a proliferação de células β e a liberação de insulina (Zhu *et al.*, 2019). No fígado, a redução da inflamação hepática e da esteatose por ações indiretas, torna esse receptor um importante alvo para tratamento da MASLD (Yabut; Drucker, 2022).

Os GLP-1RAs, embora tenham sido desenvolvidos para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2, demonstraram ter efeitos significativos na redução do peso corporal de pessoas com obesidade (Aurélie Mailhac *et al.*, 2024). A semaglutida, um agonista do GLP1-R, é um fármaco aprovado para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 e da obesidade (Ciardullo *et al.*, 2023), que tem uma meia-vida significativamente maior do que o GLP-1 nativo por conta de várias modificações que aumentam sua resistência à degradação enzimática e melhoram sua ligação com proteínas plasmáticas, como a albumina (Hall; Isaacs; Clements, 2018). Recentemente, alguns estudos têm mostrado que a semaglutida apresenta ações benéficas na doença hepática esteatótica (Bandyopadhyay *et al.*, 2023; Yabut; Drucker, 2022; Rohit Loomba *et al.*, 2023), porém os mecanismos biológicos da semaglutida na MASLD ainda precisam ser elucidados (Kim; Lee, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da semaglutida na doença hepática associada à disfunção metabólica em modelo experimental de obesidade induzida por dieta.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação da semaglutida sobre os parâmetros bioquímicos (Colesterol total; Triglicerídeos; LDL-c; HDL-c; Glicose; Insulina e HOMA-IR) e antropométricos, observando seus efeitos na diminuição do peso e do consumo alimentar.
- Verificar as modificações histopatológicas no fígado através das colorações HE e Oil Red O.
- Analisar o potencial efeito da semaglutida na diminuição de marcadores inflamatórios através de Imuno-histoquímica (IL-1 β e COX-2) e Western Blot (MCP-1, p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , IL-6).

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Camundongos machos C57BL/6 (8-10 semanas, $n = 45$) foram fornecidos pelo Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ). O projeto e os procedimentos têm aprovação do Comitê de Ética para Uso Animal local sob número 190/2023 CEUA-FIOCRUZ. Os animais foram alojados e aclimatados por uma semana em gaiolas ventiladas com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$) e luz (ciclo claro/escuro de 12:12 h) com livre acesso a comida e água. Após esse período, foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais ($n = 15/\text{grupo}$): controle (dieta controle, produzida pela PragSolucões®, AIN-93G), HFD e HFD + Semaglutida (dieta rica em 60% de gordura, PragSolucões®, AIN-93M), alimentados por 18 semanas e, a partir da 12ª semana receberam a semaglutida (Ozempic® - 0,05mg/Kg – dose translacional) administrada por via intraperitoneal uma vez por semana e os demais animais receberam solução salina IP, uma vez por semana, durante seis semanas.

4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados sob anestesia usando Ketamina (240 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg). Em seguida, os vasos cervicais foram seccionados rapidamente, o sangue coletado por punção cardíaca (sem anticoagulante) e centrifugado a 5.000 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos, e os soros separados e armazenados a -20°C ($n = 6$) para análises bioquímicas, incluindo colesterol total (CT) (Labtest Diagnóstica SA®, MG, Brasil - Ref. 76), triglicerídeos (TG) (Labtest Diagnóstica SA®, MG, Brasil - Ref. 87), lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (Labtest Diagnóstica SA®, MG, Brasil - Ref. 13), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (Labtest Diagnóstica SA®, MG, Brasil - Ref. 146) e glicose (Labtest Diagnóstica SA®, MG, Brasil - Ref. 133) que foram determinados por sistema enzimático de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de insulina foram determinados usando kit de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com as instruções do

fabricante (Elabscience®, E-EL-M1382, Wuhan, China). O índice HOMA-IR foi calculado usando a seguinte fórmula: $\text{insulina (U}\mu\text{/mL)} \times \text{glicose (mmol/L)} / 22.5$ (Obadia *et al.*, 2022).

4.3 HISTOPATOLOGIA

Fragmentos de fígado foram fixados em formol tamponado a 4% por 24 horas antes de serem processados e embebidos em parafina. Seções de 5 μ m foram cortadas e montadas em lâminas de vidro. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Oil Red O e avaliados com as imagens capturadas em microscopia óptica (Leica ICC50-HD) com aumento de 400x.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cinco cortes de fígado (5 μ m de espessura) de cada grupo foram obtidos e aderidos a lâminas histológicas silanizadas. Os cortes foram desparafinados com xilol e reidratados em etanol graduado (100 a 70%), e, em seguida, foram submetidos a reações de imuno-histoquímica utilizando o kit Dako EnVision™ FLEX + (Dako, Código: K8002, EUA), conforme instruções do fabricante. Os anticorpos primários foram (IL-1 β 1:50 Abcam, Ab9722 Cambridge, UK), COX-2 (1:100 Abcam, Ab15191 Cambridge, UK) incubados por 12 horas a 4°C. As lâminas foram contrastadas em hematoxilina. A coloração positiva resultou em um produto de reação cor marrom. Cinco fotos na mesma ampliação 400x foram analisadas quantitativamente usando o software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Program plataformas UNIX).

4.5 WESTERN BLOT

As amostras foram homogeneizadas em tubo contendo coquetel de extração (EDTA 10 mM/l, fluoreto de fenilmetilsulfonil 2 mM/l, fluoreto de sódio 100 mM/l, 10 mM/l de sódio, ortovanadato de sódio 10 mM/l, aprotinina 10 μ m e 100 mM/l Tris-aminometano – pH 7,4) usando um macerador manual para quebra de tecido e liberação de proteínas. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado e o

sobrenadante coletado, obtendo-se um pool de amostras de cada grupo. No gel de eletroforese foram aplicados 20µg de proteína total por grupo. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad 162–0115), bloqueadas por 1 h com BSA a 5% (Miles, Naperville, IL, EUA) diluído em TBS-T e incubadas por 12 horas a 4°C com anticorpo primário MCP-1 1:1000 (Abcam, Ab7202 Cambridge, UK), p-NF-κB 1:1000 (CellSignaling Technology, #3033), IL-1β 1:1000 (Abcam, Ab9722 Cambridge, UK), TNF-α 1:1000 (Abcam, Ab6671 Cambridge, UK) e IL-6 (Abcam, Ab208113 Cambridge, UK). A técnica foi realizada em duplicata para confirmação dos resultados e a β -actina utilizada como controle pela relação proteína / β -actina em cada grupo. As bandas foram detectadas por um reagente quimioluminescente (substrato Immobilon Forte Western HRP WBLUF0500) e visualizadas por iBright CL1500 Imaging Systems (TermoFisher Scientific). O software ImageJ, versão 1.50i, foi utilizado para quantificar a densidade de pixels das bandas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa GraphPad Prism v 6.01. Os dados paramétricos foram analisados por meio de ANOVA-oneway, seguida de pós-teste de Tukey. Os dados foram representados por média ± DP, e valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Análises antropométricas

Os animais expostos à dieta HFD durante onze semanas apresentaram aumento do peso corporal, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Fig. 3 - A). Durante o período de intervenção 12^a semana - 18^a semana, os camundongos do grupo HFD tratados com solução salina, mantiveram aumento significativo no peso corporal quando comparado com o grupo controle ($p < 0,0001$) (Fig. 3 - B). Além disso, na primeira semana após a administração da semaglutida já se observou redução significativa no peso dos animais do grupo HFD+Semaglutida ($p < 0.01$), que se manteve até o final do tratamento (Fig. 3 - B). O consumo médio de ração na 18^a semana do grupo HFD foi maior do que o do grupo HFD+Semaglutida (Fig. 3 - C).

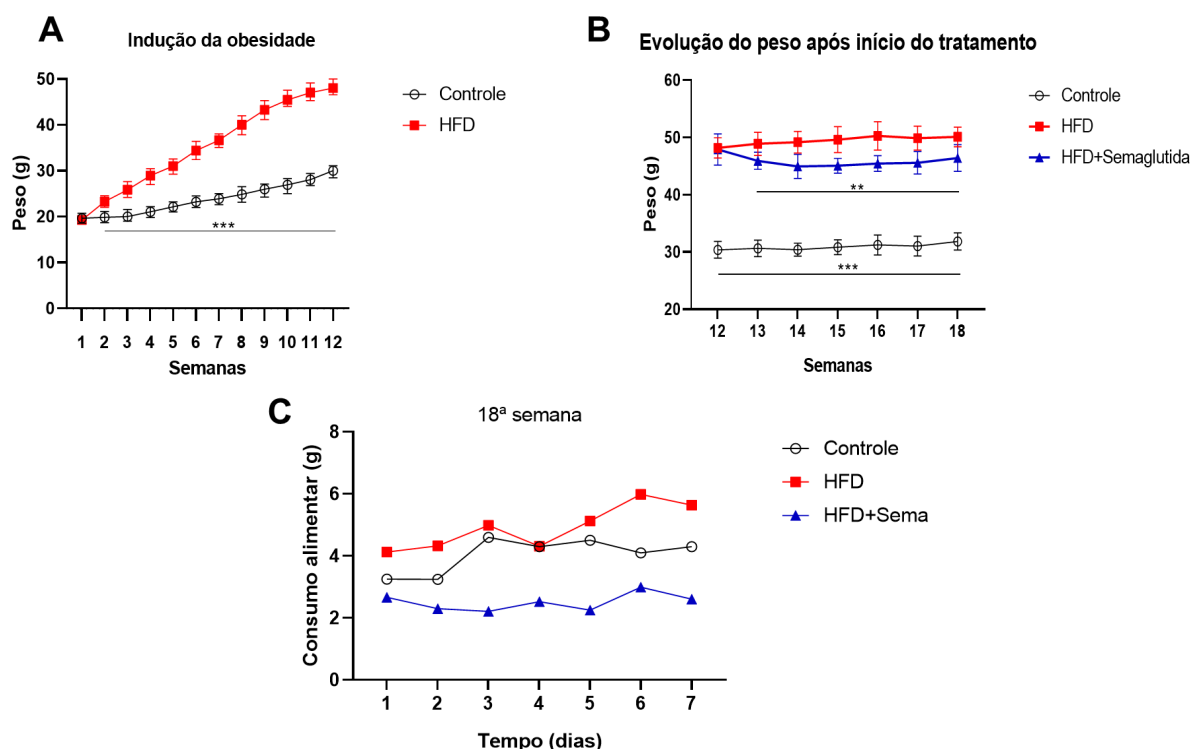


Figura 3: Efeitos da semaglutida no peso corporal e consumo médio de ração em camundongos C57BL/6. (A) Evolução do peso dos camundongos que receberam alimentação padrão e alimentação HFD nas primeiras 12 semanas. (B) Peso médio de camundongos nos diferentes grupos no período da 12^a - 18^a semana. (C) Consumo médio de ração na 18^a semana. Os dados mostram diferenças significativas entre os grupos *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0.01$ (ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

5.2 Análises bioquímicas

Após a execução do delineamento do desenho experimental, as análises dos parâmetros lipídicos mostraram que o grupo HFD apresentou aumento significativo nos níveis de colesterol total (CT) ($p < 0.0001$), triglicerídeos ($p < 0.0001$), HDL-c ($p < 0.0001$) e LDL-c ($p < 0.01$) quando comparado com o grupo controle, tais resultados confirmam a presença de síndrome metabólica. Entretanto, no grupo HFD + semaglutida houve uma redução significativa dos níveis de CT ($p < 0.0001$), triglicerídeos ($p < 0.0001$) e LDL-c ($p < 0.0001$) quando comparado ao grupo HFD (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição do perfil lipídico de acordo com os grupos experimentais

Parâmetros	Grupos		
	Controle	HFD	HFD + Semaglutida
Triglicerídeos	31,1 ± 7,71***	193,2 ± 13,3	94,3 ± 22,1***
Colesterol Total	105,7 ± 12,09 ***	179,9 ± 22,48	117,6 ± 12,73***
HDL-c	48,5 ± 4,43	114,8 ± 7,08***	81 ± 9,4
LDL-c	27,62 ± 6,5**	54,01 ± 7,9	14,98 ± 5,3***

Os resultados são representados pela média ± desvio padrão.

O valor da média está em mg/dL.

Dados mostram diferenças significativas entre os grupos *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ (ANOVA one-way).

Em relação ao perfil glicêmico, verificam-se aumentos significativos nos níveis de glicose ($p < 0,0001$), insulina ($p < 0.01$) e do índice HOMA-IR ($p < 0,0001$) no grupo HFD em comparação ao controle (Fig. 4 A, B e C). No entanto, houve uma redução significativa do índice de glicose ($p < 0.0001$), insulina ($p < 0.01$) e HOMA-IR ($p < 0.0001$) no grupo HFD + semaglutida em relação ao grupo HFD (Fig. 4 A, B e C).

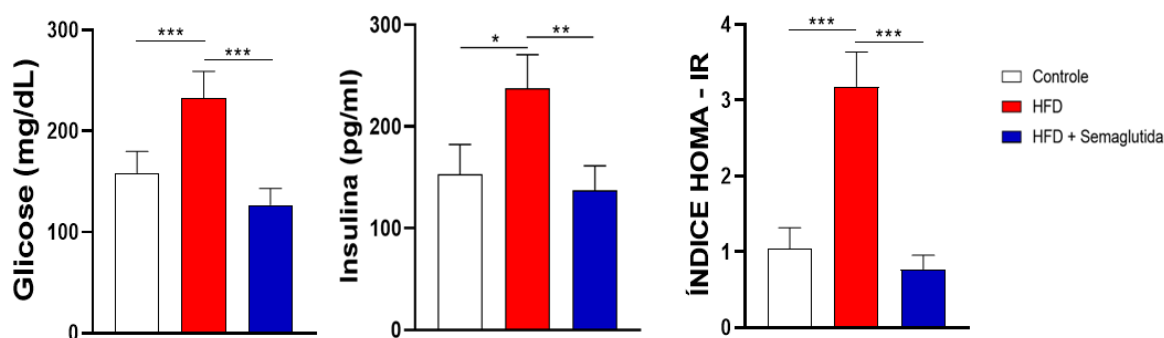


Figura 4. Análises dos parâmetros metabólicos da resistência à insulina (glicose, insulina e índice HOMA-IR) entre os grupos experimentais. Valores foram determinados em amostras de soro de camundongos sem jejum. As colunas representam média $\pm$ DP dos marcadores analisados. Dados mostram diferenças significativas entre os grupos *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ (ANOVA one-way).

5.3 Histopatologia

A análise histopatológica revelou que o grupo controle exibiu arquitetura bem preservada com hepatócitos característicos distribuídos homogeneamente por todo o parênquima hepático (Fig. 5 - A). Após a indução à dieta hiperlipídica, o grupo HFD apresentou alterações significativas, incluindo desorganização tecidual com esteatose macro e microvesicular no citoplasma dos hepatócitos e focos de infiltrados inflamatórios (Fig. 5 - B). O grupo HFD + semaglutida apresentou melhora significativa da arquitetura hepática, com redução da esteatose (observada em conjunto à melhora da arquitetura e diminuição da inflamação, o que indica uma regressão da doença) e também da inflamação (Fig. 5 - C). Na análise de deposição lipídica no tecido hepático pela coloração de Oil Red O, foi observado que o grupo controle apresentou quantidade basal de lipídios nos hepatócitos (Fig. 5 - D). O uso da dieta rica em gordura aumentou significativamente a deposição de lipídios no parênquima hepático do grupo HFD em comparação com controle ($p < 0,0001$) (Fig. 5 - E). Por outro lado, o grupo HFD + semaglutida apresentou redução significativa do acúmulo de gotículas lipídicas no tecido ($p < 0,0001$) (Fig. 5 - F). A análise

quantitativa das gotículas de lipídios foi realizada em todos os grupos usando o software Gimp e para a análise estatística ANOVA (Fig. 5 – G).

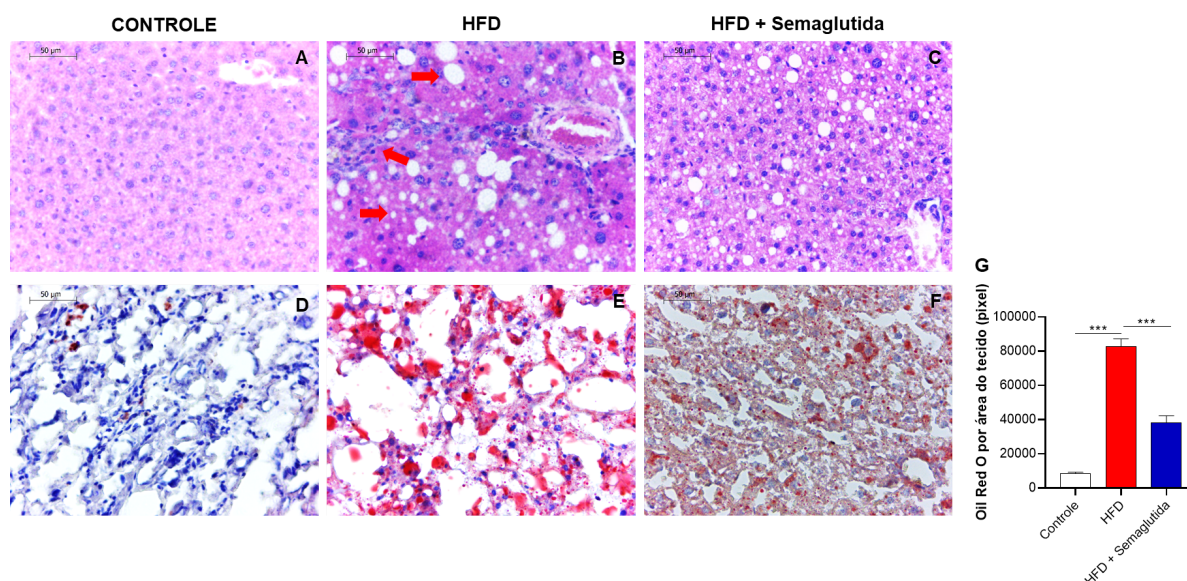


Figura 5. Efeitos da semaglutida nas análises histopatológicas hepáticas de camundongos C57BL/6. Os cortes do tecido hepático foram corados com H&E (A–C) e Oil Red O (D–F). (A) Grupo controle. (B) Grupo HFD exibindo esteatose macro e microvesicular e infiltrados inflamatórios, sinalizadas nas imagens (setas vermelhas). (C) Grupo HFD+Semaglutida mostrando organização tecidual hepática normal, com redução das inclusões lipídicas. (D) Grupo controle. (E) Grupo HFD mostrando abundância significativa de lipídios. (F) Grupo HFD+Semaglutida exibe redução significativa das inclusões lipídicas. Barras 50µm. (G) Quantificação da marcação de gotículas de lipídios por Oil Red O em pixel (n= 5 animais). Os dados indicam diferenças significativas entre os tratamentos, ***p < 0,0001 (ANOVA seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey).

5.4 Imuno-histoquímica

A expressão de IL-1 β em imuno-histoquímica foi analisada após o tratamento com semaglutida. Foram escolhidos campos com a arquitetura melhor preservada para refletir melhor a imunorreação através da contagem por pixel. O grupo controle apresentou baixa reatividade para a IL-1 β (Fig. 6 - A). A utilização da dieta rica em gordura aumentou de forma significativa a expressão dessa citocina no tecido hepático (p < 0.0001) (Fig. 6 – B). Após o tratamento foi possível observar uma redução significativa na reatividade para a IL-1 β no grupo HFD + Semaglutida comparado ao grupo HFD (p < 0.0001) (Fig. 6 – C), sugerindo assim a possível atividade anti-inflamatória. A expressão de COX-2 foi avaliada por

imuno-histoquímica após tratamento com semaglutida em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. O grupo controle apresentou baixa reatividade à enzima COX-2 (Fig. 6 – D). Após exposição a uma dieta hiperlipídica, observou aumento da imunorreatividade à COX-2 quando comparada ao grupo controle ($p < 0.0001$) (Figs. 6 – D e E). Em contraste, no grupo HFD + Semaglutida observou-se redução significativa da imunorreação para COX-2 quando comparado ao grupo HFD ($p < 0.0001$) (Fig. 6 – F).

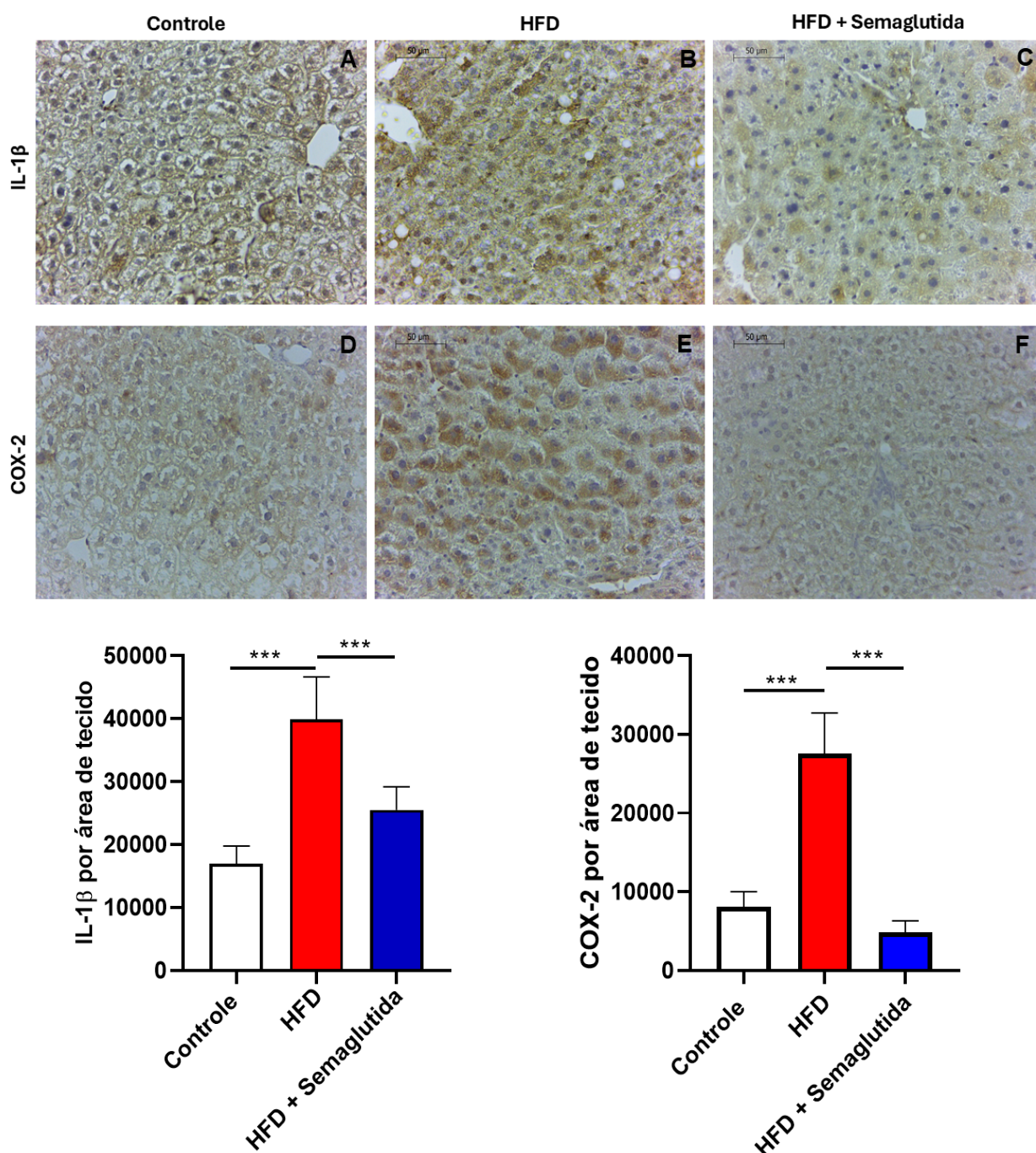


Figura 6. Análise de imuno-histoquímica para interleucina 1- β (IL-1 β) e COX-2 em camundongos alimentados com dieta HFD tratados com semaglutida. Os cortes hepáticos (imagens) estão no aumento de 40X (50 μ m). Quantificação dos pixels da marcação realizada pelo GIMP (n=5). Dados mostram diferenças significativas entre os grupos ***p <0.0001(ANOVA one-way).

5.5 Western Blot

A proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) tem um papel importante no processo de inflamação, contribuindo para o aumento da expressão de células inflamatórias. O grupo HFD aumentou significativamente a expressão da proteína MCP-1 no fígado em comparação ao grupo controle (p <0.01) (Fig. 7 A e B). Contudo, o tratamento reduziu significativamente a expressão dessa proteína em comparação ao grupo HFD (p <0.01) (Fig. 7 A e B).

O fator nuclear κ B (NF- κ B) regula múltiplos aspectos e induz, principalmente, para a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o processo inflamatório hepático. No presente estudo, os níveis do p-NF- κ B no tecido hepático no grupo HFD apresentaram aumento significativo quando comparado ao grupo controle (p <0.05) (Fig. 7 A e C). O tratamento no grupo HFD + semaglutida resultou em uma diminuição significativa da expressão do fator nuclear κ B em comparação ao grupo HFD (p <0.01) (Fig. 7 A e C).

A IL-1 β regula a lipogênese hepática na obesidade, sendo fundamental para a indução de esteatose hepática em camundongos obesos, se encontrando em níveis elevados nessa situação. A expressão de IL-1 β no grupo HFD apresentou aumento significativo no tecido hepático em comparação ao grupo controle (p <0.01) (Fig. 7 A e D), demonstrando inflamação hepática. Em contraste, no grupo HFD + semaglutida houve uma redução significativa da IL-1 β em comparação ao grupo HFD (p <0.01) (Fig. 7 A e D).

A expressão de TNF- α , um mediador pró-inflamatório, no grupo HFD teve aumento significativo em comparação ao grupo controle (p <0.01) (Fig. 7 A e E). No grupo HFD + semaglutida, a expressão da proteína TNF- α diminuiu significativamente nos fígados dos camundongos comparada ao grupo HFD (p <0.05) (Fig. 7 A e E).

A expressão de IL-6 pode refletir diretamente o grau de resposta inflamatória. O grupo HFD aumentou significativamente a expressão de IL-6 no fígado quando

comparada ao grupo controle ($p < 0.01$) (Fig. 7 – A e F). No grupo HFD + semaglutida houve redução da expressão de IL-6 em relação ao grupo HFD ($p < 0.05$) (Fig. 7 – A e F).

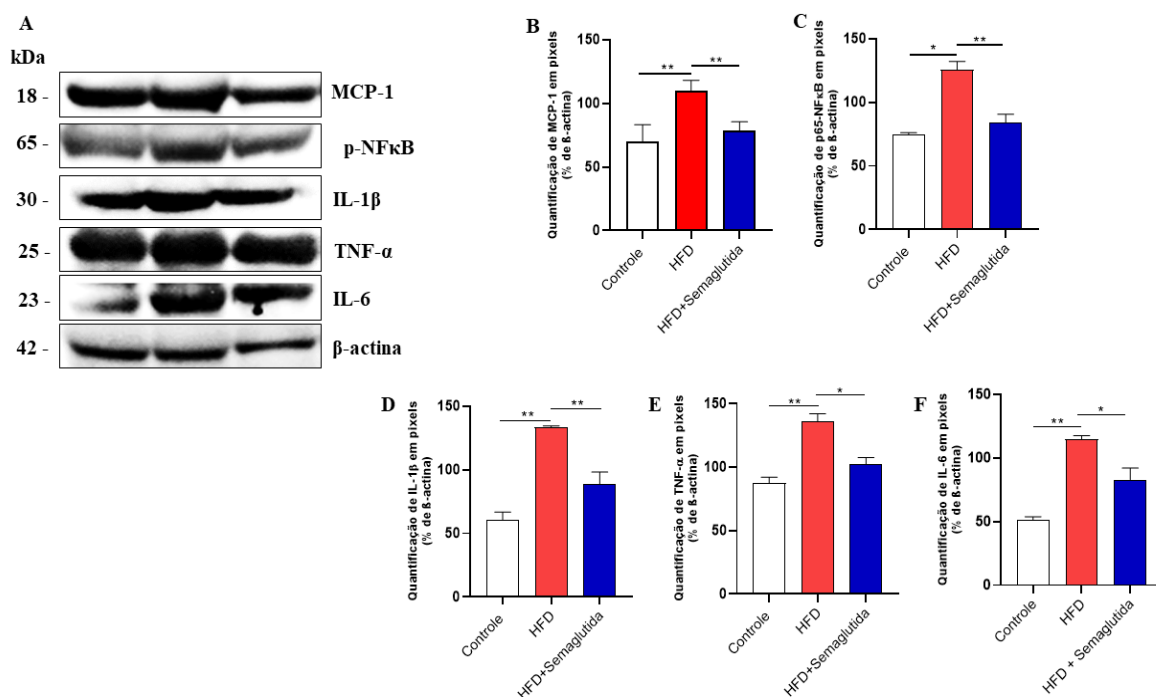


Figura 7. Western Blot para análise da expressão de MCP-1, p-NF-κB e IL-1β, TNF-α e IL-6 no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) tratados com semaglutida. As colunas representam média $\pm$ DP das proteínas analisadas. Quantificação dos pixels da densidade das bandas realizada pelo ImageJ. Dados mostram diferenças significativas entre os grupos *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ (ANOVA one-way).

5 DISCUSSÃO

O modelo utilizado neste estudo apresentou a maioria das características metabólicas da MASLD humana, podendo ser utilizado para uma compreensão clara da etiologia, patogênese e permitir o desenvolvimento de opções eficientes de terapia da MASLD. Os principais achados foram que o consumo crônico de dieta hipercalórica levou o grupo HFD a apresentar níveis mais elevados de triglicerídeos, colesterol total, LDL-c, glicose, insulina e HOMA-IR, semelhante aos resultados em outros modelos de MASLD induzidos por dieta (Eccleston *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2007; Lau; Zhang; Yu, 2017; Silva *et al.*, 2023; Velázquez *et al.*, 2019). Estes dados confirmam que a alimentação HFD em camundongos C57BL/6 induziu o desenvolvimento de hipercolesterolemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Em contraste, o tratamento com semaglutida melhorou o comprometimento do metabolismo lipídico e glicêmico como observados em outros estudos (Li *et al.*, 2022; Niu *et al.*, 2022; Soto-catalán *et al.*, 2024).

A MASLD é considerada uma das manifestações hepáticas da SM (Angulo, 2007; Fan *et al.*, 2007; Fan; Farrell, 2009) que se inicia com efeito combinado da resistência à insulina, do acúmulo de gordura na forma de triglicerídeos nos hepatócitos, do estresse oxidativo, e da cascata inflamatória (Makri; Goulas; Polyzos, 2021). Neste estudo, demonstramos histologicamente presença de esteatose macro e microgoticular e inflamação. Essas características indicaram que o modelo de MASLD foi construído com sucesso. Por sua vez, o tratamento com semaglutida melhorou significativamente as alterações patológicas no fígado (esteatose e focos inflamatórios), como também reduziu o acúmulo de lipídios no fígado. Outros estudos observaram resultados semelhantes; no entanto, utilizando modelo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Mao *et al.*, 2024, Li *et al.*, 2022).

Os camundongos alimentados com HFD aumentaram significativamente a expressão de IL-1 β e COX-2 em comparação com camundongos alimentados com a dieta controle, sugerindo um estado altamente inflamatório contribuindo para o dano hepático. No entanto, a semaglutida induziu uma redução significativa no número de agregados de células inflamatórias e na expressão de IL-1 β e COX-2. Portanto, a

semaglutida pode reduzir a resposta inflamatória na MASLD e o dano às células hepáticas como observado no estudo de Niu *et al.*, 2022.

No geral, a inflamação hepática é um dos principais impulsionadores da progressão da MASLD (Bernardi *et al.*, 2015). Assim, a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) recruta monócitos periféricos para o fígado, ativando a resposta pró-inflamatória (Murray e Wynn, 2011). Além disso, a fosforilação do NF- κ B está associada à transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles que codificam citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e quimiocinas (Liu *et al.* 2017).

Consistentes com esses estudos, nossos resultados demonstraram que o grupo HFD aumentou a expressão de MCP-1 e NF- κ B, enquanto o tratamento com semaglutida reduziu significativamente. O presente estudo também mostrou, que o grupo HFD aumentou a expressão de TNF- α , IL1 β e IL-6, enquanto a administração de semaglutida reduziu esses marcadores inflamatórios. O estudo de Niu *et al.*, 2022, relatou que o tratamento com semaglutida na concentração de 30 μ mol/kg reduziu mediadores inflamatórios. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais a semaglutida regula a inflamação hepática ainda precisam ser elucidados. Assim, nossos resultados indicam que os efeitos da semaglutida na MASLD possivelmente podem ser atribuídos à inibição indireta da ativação do NF- κ B.

Em resumo, nosso estudo estabeleceu conclusivamente que a semaglutida efetivamente aliviou a lesão hepática e o acúmulo de gordura hepática em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura, ao melhorar tanto o perfil glicêmico quanto o lipídico. Além disso, reduziu a resposta inflamatória da MASLD e o dano às células hepáticas ao regular negativamente a expressão de marcadores inflamatórios MCP-1, pNF- κ B, TNF- α , IL1 β e IL-6.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com semaglutida durante 6 semanas melhorou significativamente os parâmetros metabólicos, induziu uma melhor organização em todo o parênquima hepático e atenuou o acúmulo de gordura hepática possivelmente modulando as vias lipogênicas. Além disso, dados seus efeitos notáveis na redução de marcadores inflamatórios (TNF- α , IL1 β e IL-6) que podem ser parcialmente atribuídos à inibição indireta da ativação do NF- κ B, estudos posteriores devem ser considerados para avaliar o papel anti-inflamatório na MASLD. Portanto, nosso estudo revela que a semaglutida pode, possivelmente, ser uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da MASLD.

REFERÊNCIAS

1. AL-MUZAFAR, H. M.; ALSHEHRI, F. S.; AMIN, K. A. The role of pioglitazone in antioxidant, anti-inflammatory, and insulin sensitivity in a high fat-carbohydrate diet-induced rat model of insulin resistance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 8, 2021.
2. ANGELIKI KATSAROU et al. Current and experimental pharmacotherapy for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **HORMONES**, 7 ago. 2024.
3. AURÉLIE MAILHAC et al. Semaglutide (Ozempic®) Use in Denmark 2018 Through 2023 – User Trends and off-Label Prescribing for Weight Loss. **Clinical epidemiology**, v. Volume 16, p. 307–318, 1 abr. 2024.
4. BANDYOPADHYAY, S. et al. Role of semaglutide in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease or non-alcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 17, n. 10, p. 102849, 1 out. 2023.
5. BIFARI, F. et al. Multiple target tissue effects of GLP-1 analogues on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Pharmacological Research**, v. 137, n. October, p. 219–229, 2018.
6. CHAN, W. et al. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: A State-of-the-Art Review. **Journal of obesity & metabolic syndrome**, v. 32, n. 3, p. 197–213, 13 set. 2023.
7. CHOI, S. H.; GINSBERG, H. N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 353–363, set. 2011.
8. CIARDULLO, S. et al. Advancements in pharmacological treatment of NAFLD/MASLD: a focus on metabolic and liver-targeted interventions. **Gastroenterology report**, v. 12, 22 dez. 2023.
9. COTRIM, H. P. et al. NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 2, p. 118–122, jun. 2016.
10. CUNHA, V. et al. Metformin in the prevention of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: A systematic review. **Annals of Hepatology**, nov. 2019.
11. DAWOOD, R. M. et al. Molecular Insights of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 44, n. 3, p. 111–123, 1 mar. 2024.
12. DE BRITO E SILVA, M. B. et al. Obesity and Severe Steatosis: the Importance of Biochemical Exams and Scores. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 34, n. 4, p. 1–6, 2021.
13. DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 2, p. 142–148, mar. 2007.
14. DIZ-CHAVES, Y. et al. Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in the Integration of Neural and Endocrine Responses to Stress. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3304, 1 nov. 2020.
15. DUDLEY, L. J.; MAKAR, A. N.; GAMMOH, N. Membrane targeting of core autophagy players during autophagosome biogenesis. **FEBS Journal**, v. 287, n. 22, p. 4806–4821, 2020.

16. EFEYAN, A.; COMB, W. C.; SABATINI, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 302–310, 2015.
17. EMMANOUIL KORAKAS et al. Semaglutide Concurrently Improves Vascular and Liver Indices in Patients With Type 2 Diabetes and Fatty Liver Disease. **Journal of the Endocrine Society**, v. 8, n. 8, 1 jul. 2024.
18. ESTIVALETI, J. M. et al. Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2022.
19. FAHED, G. et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, 2022.
20. FELDSTEIN, A. E. et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 437–443, 1 ago. 2003.
21. FENG, X. et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPAR γ . **Biochemical Pharmacology**, v. 89, n. 4, p. 503–514, 1 jun. 2014.
22. FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, p. 83–92, out. 2010.
23. FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 jun. 2021.
24. FOTBOLCU, H.; ZORLU, E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 16, p. 4079–4090, 2016.
25. FRIEDMAN, S. L. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 24, n. 7, p. 908–922, jul. 2018.
26. GAO, Y. et al. Carbohydrates deteriorate fatty liver by activating the inflammatory response. **Nutrition Research Reviews**, p. 1–16, [s.d.].
27. HALL, S.; ISAACS, D.; CLEMENTS, J. N. Pharmacokinetics and Clinical Implications of Semaglutide: A New Glucagon-Like Peptide (GLP)-1 Receptor Agonist. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 12, p. 1529–1538, 19 jun. 2018.
28. HARDY, T. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 451–496, 23 maio 2016.
29. HE, Y. et al. The preventive effect of liraglutide on the lipotoxic liver injury via increasing autophagy. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 44–52, 1 jan. 2020.
30. HEIDA, A. et al. The hepatocyte IKK:NF- κ B axis promotes liver steatosis by stimulating de novo lipogenesis and cholesterol synthesis. **Molecular Metabolism**, v. 54, p. 101349–101349, 1 dez. 2021.
31. HOFFMAN, S.; KHOSROW ADELI. Glucagon-like peptide (GLP)-1 regulation of lipid and lipoprotein metabolism. **Medical Review**, v. 4, n. 4, p. 301–311, 10 abr. 2024.
32. HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 2006.
33. HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231–237, 30 abr. 2009.

34. HUH, Y.; CHO, Y. J.; NAM, G. E. Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Obesity & Metabolic Syndrome**, v. 31, n. 1, p. 17–27, 30 mar. 2022.
35. IBGE. Pesquisa nacional de saúde.: 2019: atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / **IBGE**, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE (2020).
36. JENSEN-URSTAD, A. P. L.; SEMENKOVICH, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 747–753, maio 2012.
37. KANG, S. H. et al. KASL clinical practice guidelines: Management of nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 27, n. 3, p. 363–401, 1 jul. 2021.
38. KIM, K.-S.; LEE, B.-W. Beneficial effect of anti-diabetic drugs for nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 26, n. 4, p. 430–443, 1 out. 2020.
39. KUCHAY, M. S.; CHOUDHARY, N. S.; MISHRA, S. K. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1875–1887, nov. 2020.
40. LAWITZ, E. J. et al. Elevated de novo lipogenesis, slow liver triglyceride turnover, and clinical correlations in nonalcoholic steatohepatitis patients. **Journal of Lipid Research**, v. 63, n. 9, p. 100250, set. 2022.
41. LE, M. H. et al. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 12, 7 dez. 2021.
42. LI, R. et al. Semaglutide May Alleviate Hepatic Steatosis in T2DM Combined with NFALD Mice via miR-5120/ABHD6. v. Volume 16, p. 3557–3572, 1 out. 2022.
43. LI, S. et al. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–21, 2016.
44. LIN, H. Z. et al. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. **Nature Medicine**, v. 6, n. 9, p. 998–1003, set. 2000.
45. LIU, H. Y. et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: Inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31484–31492, 2009.
46. MAO, T. et al. Semaglutide alters gut microbiota and improves NAFLD in db/db mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 710, p. 149882–149882, 1 maio 2024.
47. MARRA, F. et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 2, p. 72–81, fev. 2008.
48. MCLEAN, B. A. et al. Revisiting the Complexity of GLP-1 Action from Sites of Synthesis to Receptor Activation. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 2, p. 101–132, 15 dez. 2020.
49. MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human

- serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 829–835, jun. 1993.
50. MOGNA-PELÁEZ, P. et al. Inflammatory markers as diagnostic and precision nutrition tools for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Results from the Fatty Liver in Obesity trial. **Clinical Nutrition**, v. 43, n. 7, p. 1770–1781, jul. 2024.
 51. MÜLLER, T. D. et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). **Molecular Metabolism**, v. 30, p. 72–130, dez. 2019.
 52. NEWSOME, P. et al. Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 50, n. 2, p. 193–203, 2019.
 53. NEWSOME, P. N. et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 12, p. 1113–1124, 2021.
 54. NIU, S. et al. Semaglutide ameliorates metabolism and hepatic outcomes in an NAFLD mouse model. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 9 dez. 2022.
 55. OBADIA, N. et al. TLR4 mutation protects neurovascular function and cognitive decline in high-fat diet-fed mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 19, n. 1, 2022.
 56. OLIVEIRA, LM. Liver and biliary ultrasonography in diabetic and non-diabetic obese women. **Diabetes & metabolism**, v. 24, n. 5, 2020.
 57. Parise ER, Salgado AL, Secaf R, Cerri L, Cerri G. Prevalence of liver steatosis in abdominal ultrasound. *GED*; 22:235-7, 2003.
 58. PATOURAUX, S. et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 2, p. 328–338, ago. 2017.
 59. PIAZZOLLA, V. A.; MANGIA, A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. **Cells**, v. 9, n. 4, 17 abr. 2020.
 60. POLYZOS, S. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Insights in epidemiology, pathogenesis, imaging, prevention and therapy. **Seminars in cancer biology**, v. 93, p. 20–35, 1 ago. 2023.
 61. POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics**. [s.l.] Elsevier Inc, 2019. v. 92.
 62. PROMRAT, K. et al. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 188–196, jan. 2004.
 63. RAKOSKI, M. O. et al. Meta-analysis: insulin sensitizers for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 32, n. 10, p. 1211–1221, 23 set. 2010.
 64. RINELLA, M. E. et al. AASLD Practice Guidance on the Clinical Assessment and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 77, n. 5, p. 10.1097/HEP.0000000000000323, maio 2023.
 65. ROHIT LOOMBA et al. Semaglutide 2·4 mg once weekly in patients with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis: a randomised, placebo-controlled phase 2 trial. v. 8, n. 6, p. 511–522, 1 jun. 2023.
 66. ROUMANS, K. H. M. et al. Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 20 abr. 2020.
 67. SANYAL, A. J. et al. The Natural History of Advanced Fibrosis Due to Nonalcoholic Steatohepatitis: Data From the Simtuzumab Trials. **Hepatology**, v. 70, n. 6, p. 1913–1927, 28 maio 2019.

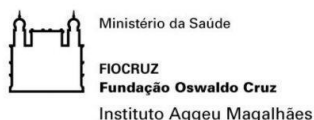
68. SCHNEIDER, J. L.; CUERVO, A. M. Liver autophagy: Much more than just taking out the trash. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 187–200, 2014.
69. SCORLETTI, E.; CARR, R. M. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 4, p. 934–945, 1 abr. 2022.
70. SOARES E SILVA, A. K. et al. LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123787, 14 abr. 2015.
71. SUBHODIP PRAMANIK; PAL, P.; RAY, S. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: Emerging evidence of benefit of peroxisome proliferator-activated receptors agonists and incretin-based therapies. **World Journal of Methodology**, v. 14, n. 2, 20 jun. 2024.
72. SUN, F. et al. Impact of GLP-1 receptor agonists on blood pressure, heart rate and hypertension among patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 110, n. 1, p. 26–37, out. 2015.
73. SUN, Y.; ZHOU, W.; ZHU, M. Serum Metabolomics Uncovers the Mechanisms of Inulin in Preventing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 7, p. 895–895, 5 jul. 2024.
74. TACKE, F.; WEISKIRCHEN, R. An update on the recent advances in antifibrotic therapy. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 11, p. 1143–1152, 1 nov. 2018.
75. TANG, S. et al. Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 29 abr. 2022.
76. TILG, H. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: the interplay between metabolism, microbes and immunity. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 12, p. 1596–1607, 1 dez. 2021.
77. TOSELLO-TRAMPONT, A.-C. et al. Kupffer Cells Trigger Nonalcoholic Steatohepatitis Development in Diet-induced Mouse Model through Tumor Necrosis Factor- α Production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40161–40172, nov. 2012.
78. VLAD DUMITRU BRATA; TACKE, F. Fatty liver disease: time to target CCR5? **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 28, n. 5, p. 335–339, 3 maio 2024.
79. WANG, H. et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1597, 9 dez. 2019.
80. WANG, J. et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, 13 abr. 2020.
81. WEISS, J.; RAU, M.; GEIER, A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Deutsches Aerzteblatt Online**, 27 jun. 2014.
82. YABUT, J. M.; DRUCKER, D. J. Glucagon-like Peptide-1 Receptor-based Therapeutics for Metabolic Liver Disease. **Endocrine Reviews**, 30 jul. 2022.
83. YANG, L. et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 11, n. 6, p. 467–478, 2010.
84. YONG HO LEE et al. Lobeglitazone, a Novel Thiazolidinedione, Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes: Its Efficacy and Predictive Factors Related to Responsiveness. v. 32, n. 1, p. 60–60, 1 jan. 2017.

85. YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11–20, 20 set. 2017.
86. YOUNOSSI, Z. M. et al. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver disease-Meta-analytic Assessment of prevalence, incidence, and Outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 22 fev. 2016.
87. YOUNOSSI, Z. M. et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, n. September 2022, p. 1–13, 2023.
88. ZHU, L. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor expression and its functions are regulated by androgen. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 120, p. 109555, dez. 2019.
89. ZHU, Z. et al. In-depth analysis of de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease: Mechanism and pharmacological interventions. **Liver Research**, v. 7, n. 4, p. 285–295, 1 dez. 2023.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IAM)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IAM)

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**AÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A FLUOXETINA SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO, COGNIÇÃO E DEPRESSÃO EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**” protocolado sob nº **190/2023** pela pesquisadora **Christina Alves Peixoto**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem **validade até 01 de abril de 2025** com a finalidade de **pesquisa científica**. É responsabilidade da coordenadora do projeto notificar à CEUA sobre acidentes ou intercorrências com os animais, bem como a necessidade de quaisquer alterações em relação ao projeto. A coordenadora concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambos			
Camundongo isogênico	(Mus musculus - C57BL/6)	75	x			8-10 semanas	20-22g	Biotério-IAM
Total		75						

Recife, 28 de junho de 2023

Documento assinado digitalmente:
 VIRGINIA MARIA BARROS DE LORENA
 Data: 28/06/2023 11:48:34-0300
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Virgínia Maria Barros de Lorena
 Coordenadora CEUA/IAM
 Mat. Siape 1984445