**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**

**ESCOLA DE FARMÁCIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

IGOR FERREIRA SENA

# ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA SEMAGLUTIDA NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

OURO PRETO

2023

# ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA SEMAGLUTIDA NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA.

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador(a): Daiane Fátima Engel
Coorientador(a): Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira

OURO PRETO
2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S474e Sena, Igor Ferreira.
Estudo do efeito neuroprotetor da semaglutida na obesidade induzida por dieta hiperlipídica. [manuscrito] / Igor Ferreira Sena. Igor Sena. - 2023.
42 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daiane Engel.
Coorientadora: Profa. Dra. Katiane Nogueira.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Obesidade. 2. Sistema nervoso - Degeneração. 3. Dieta hiperlipídica. 4. GLP-1. 5. Semaglutida.. I. Sena, Igor. II. Engel, Daiane. III. Nogueira, Katiane. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 615.2

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANALISES CLINICAS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Igor Ferreira Sena**

**Estudo do efeito neuroprotetor da semaglutida na obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 26 de fevereiro de 2023

Membros da banca

Professor Doutora Daiane Fátima Engel - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Professor Doutora Nancy Scardua Binda - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutorando Lucas Gabriel Vieira - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Daiane Fátima Engel, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 26/02/2023

Documento assinado eletronicamente por **Daiane Fátima Engel**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/02/2023, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0479766** e o código CRC **A533C2FE**.



R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: (31)3559-1071 - www.ufop.br

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, por todo carinho e apoio. Minha mãe pelo seu brilhante apoio e uma pessoa incrível que me inspira a sempre tornar uma pessoa melhor. Minha avó por todo suporte, incentivo e apoio para continuar meus estudos e entender que esse caminho te transforma e é capaz de mostrar que esse é o caminho certo. Minha tia Lu, que foi a minha segunda mãe durante toda essa jornada dando todo suporte possível. Meus tios Heliomar e Elisangela por todo carinho e torcida a distância. Ao meu pai pelo carinho e suporte.

Agradeço também ao LNBIO. Mesmo com pouco tempo de experiência no laboratório, pude conhecer pessoas incríveis que me mostraram um pouco além do que a graduação me proporcionou. Agradeço imensamente à Daiane, minha orientadora, por ser mentora de todo conhecimento adquirido e mostrar o quanto a pesquisa brasileira é importante e contribui para o pensamento crítico. Lucas obrigado por todo conhecimento repassado e contribuir com minhas primeiras experiências em manipulação de roedores e de todo conhecimento necessário para executar todos os protocolos experimentais, sem esse apoio eu não estaria aqui.

Gostaria de agradecer as casinhas que passei em Ouro Preto que fizeram parte do meu amadurecimento como pessoa. A república rodoviária muito obrigado pelos 4 anos de amizade, Batata, Nup, Andressa, Bruno, Pablo, Hyuri e Lari obrigado por fazerem parte desse processo tão importante para mim. A República Diretoria!! Muito obrigado por todo acolhimento, todo suporte, carinho, momentos incríveis, bebedeiras e momentos de risada! Nutrido, Boizão, Tilider, Toi, Centrum, Recrutinha e Samuel obrigado por tornar tudo tão prazeroso. Sempre bom lembrar que amizades tem que ser poucas e das boas! República Poucas & Boas, não tenho palavras para expressar como essa amizade se tornou importante, obrigado pelos rocks, lanches e momentos de descontração! Vocês brilham!

Aos Farmamigos, esses merecem toda atenção do mundo! Como não agradecer todo o 2018.1 pelo companheirismo, choradeira, perrengues e tudo possível. Menções honrosas ao 18.2 também. Izabella, André, Ana Flávia, Breno, Rubiana, Iara, Carol, Bruna, Itala, Raio meus profundos agradecimentos por deixarem o cotidiano sempre mais leve e um pouco mais alcoólico também!

UFOP e gloriosa Escola de Farmácia, imensuravelmente agradecido pelo ensino superior de qualidade GRATUITO. Aos professores da EFAR, especialmente, Nancy, Daiane, Wander e todo corpo técnico obrigado pelo ensino impecável.

E claro, aos meus amigos de BH! Paulinho, Jonathan, Vivian, Dani, Hudson obrigado pelo suporte durante toda minha trajetória. Imensurável o carinho que tenho com cada um de vocês e como cada um contribuiu de certa forma para comemorar essa nova conquista.

*“Some people choose to see the ugliness in this world, the disarray. I choose to see the beauty. To believe there is an order to our days. A purpose.”*

*“When you've been in the darkness long enough, you begin to see.”*

Dolores Abernathy (Evan Rachel Wood)

Westworld 2016-2022

## RESUMO

A obesidade é uma doença em crescimento no mundo todo e está associada com diversas complicações, como por exemplo, problemas no metabolismo glicêmico e distúrbios cardiovasculares. Novos estudos vêm associado à obesidade, principalmente devido ao consumo de dietas hiperlipídicas, a neurodegeneração e inflamação no sistema nervoso, e com isso surge a demanda de solucionar/retardar esse processo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial neuroprotetor da semaglutida, um fármaco utilizado na diabetes e na obesidade, frente ao comprometimento comportamental induzido por uma dieta hiperlipídica em roedores. Os camundongos foram submetidos à uma dieta hiperlipídica durante 30 dias e a um tratamento com semaglutida intraperitoneal (25 nMol/Kg), durante os últimos 15 dias, e foram avaliados os efeitos no metabolismo e no comportamento. Foram avaliados o metabolismo glicêmico, nos testes de glicemia de jejum, a tolerância à glicose intraperitoneal e tolerância à insulina intraperitoneal, e o consumo alimentar e o ganho de peso. Dentre os testes comportamentais foram realizados os testes de realocação e reconhecimento do objeto, o comportamento tipo-depressivo foi avaliado nos testes de borrifagem e de preferência pela sacarose, enquanto o teste de claro/escuro foi usado para avaliar o comportamento tipo-ansioso. Os resultados mostraram que a semaglutida foi eficaz em atenuar o efeito da dieta sobre as alterações glicêmicas e de ganho de peso induzidas pela dieta rica em lipídeos. Por outro lado, a semaglutida não foi eficaz em atenuar o prejuízo cognitivo e o comportamento tipo-depressivo induzidos pela dieta hiperlípidica. Em conclusão, nossos dados mostraram que nesta dose e tempo de tratamento a semaglutida não protegeu os camundongos dos efeitos dieta hiperlipídica sobre o comportamento, apesar de ser efetiva frente às alterações metabólicas.



**Palavras-chave**: obesidade, neurodegeneração, dieta hiperlipídica, GLP-1, semaglutida.

## ABSTRACT

Obesity worldwide is continuously growing and has been associated with complications, such as glucose homeostasis impairment and cardiovascular disorders. New studies have been correlating obesity with neurodegeneration and inflammation in the central nervous, therefore, there is a demand to prevent and treat this process. Thus, this study aimed to evaluate the neuroprotective potential of semaglutide against high fat diet-induced behavioral impairments in mice. The animals were exposed to a high-fat diet for 30 days and treated with semaglutide (25 nMol/Kg), intraperitoneally for 15 days, to evaluate its effects on metabolism and behavior.

Fasting blood glucose, intraperitoneal glucose tolerance and intraperitoneal insulin tolerance tests, food consumption, and weight gain were evaluated. Among the behavioral tests, relocation and object recognition tests were performed, depressive-like behavior was assessed in the splash test and sucrose preference test, while the light/dark box was used to assess anxious-like behavior. The results showed that semaglutide was effective in attenuating the effect of the diet on the glycemic changes and weight gain induced by the high-fat diet. On the other hand, semaglutide was not effective in attenuating the cognitive impairment and depressive-like behavior induced by the high-fat diet. In conclusion, our data showed that semaglutide did not protect mice from the high-fat diet effects on behavior at this dose and time of treatment, despite being effective against the metabolic outcomes.


**Keywords:** obesity, neurodegeneration, high-fat diet, GlP-1, semaglutide.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Sintomas e resultados das complicações da obesidade.* ..... 15

FIGURA 2: *Mecanismos pelos quais os agonistas de GLP-1 podem exercer efeitos fisiológicos no organismo.* ..... 17

FIGURA 3: *Solução injetável de semaglutida embalada e produzida pela Novo Nordisk, Ozempic* ..... 19

FIGURA 4: *Timeline de todo protocolo experimental.* ..... 25

FIGURA 5: *Ilustração de todos os testes comportamentais.* ..... 26

FIGURA 6: *Ilustração de todos os testes metabólicos.* ..... 29

FIGURA 7: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o ganho de peso total em 4 semanas e consumo alimentar na última semana (dias 21 a 28).* ..... 31

FIGURA 8: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a glicemia.* ..... 32

FIGURA 9: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a tolerância à insulina..* ..... 33

FIGURA 10: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a memória no teste de realocação do objeto..* ..... 34

FIGURA 11: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a memória no teste de reconhecimento do objeto..* ..... 34

FIGURA 12: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo-ansioso no teste do campo claro/escuro.* ..... 35

FIGURA 13: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo depressivo no teste de borrifagem da sacarose* ..... 36

FIGURA 14: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo depressivo no teste de preferência pela sacarose.* ..... 36

## LISTA DE SIGLAS

| | |
|---|---|
| **ANVISA** | Agencia Nacional de Vigilância Sanitária |
| **CCA** | Centro de Ciência Animal |
| **CEUA-UFOP** | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| **DA** | Doença de Alzheimer |
| **DHL** | Dieta Hiperlipídica |
| **DM2** | diabetes mellitus tipo 2 |
| **DN** | Dieta Normal |
| **DPP-4** | dipeptidil peptidase 4 |
| **EMA** | *European Medicines Agency* |
| **FDA** | *Food and Drug Administration* |
| **GLP1** | *glucagon-like peptide* |
| **GLP1-R** | *glucagon-like peptide receptor* |
| **GLP1-RA** | *glucagon-like peptide receptor agonist* |
| **HPA** | Hipotálamo-Pituitária-Adrenal |
| **IFA** | Insumo Farmacêutico Ativo |
| **IMC** | Indice de massa corporal |
| **ipGTT** | *intraperitoneal glucose tolerance test* |
| **ipITT** | *intraperitoneal insulin tolerance test* |
| **RDC** | Resolução da Diretoria Colegiada |
| **TGI** | Trato Gastrointestinal |
| **WHO** | *World Health Organization* |

**SUMÁRIO**


1. INTRODUÇÃO ..... 11
   1.1 Obesidade ..... 11
   1.2 GLP-1 ..... 13
   1.3 Semaglutida ..... 14
   1.4 Obesidade e dano cognitivo ..... 17
   1.5 Neurodegeneração ..... 18
   1.6 GLP-1 e neuroproteção ..... 19
2. OBJETIVOS ..... 20
   2.1 Objetivo geral ..... 20
   2.2 Objetivo específicos ..... 20
3. JUSTIFICATIVA ..... 20
4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 21
   4.1 Animais e protocolo experimental ..... 21
   4.2 Tratamento e dieta ..... 21
   4.3 Testes comportamentais ..... 23
      4.3.1 Teste de realocação do objeto ..... 23
      4.3.2 Teste de reconhecimento do objeto ..... 24
      4.3.3 Teste do claro/escuro ..... 24
      4.3.4 Teste de borrifagem da sacarose ..... 24
      4.3.5 Teste de preferência pela sacarose ..... 25
   4.4 Testes metabólicos ..... 26
      4.4.1 Ganho de peso ..... 26
      4.4.2 Consumo alimentar ..... 26
      4.4.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) ..... 26
      4.4.4 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) ..... 27
5. RESULTADOS ..... 27
6. DISCUSSÃO ..... 34
7. CONCLUSÃO ..... 37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 38

# 1. INTRODUÇÃO

A população obesa (índice de massa corporal >30) e com sobrepeso (IMC>25) vem aumentando mundialmente. Dados divulgados pela Organização mundial de saúde (World Health Organization -WHO) mostram que a obesidade triplicou desde 1975. Além disso, há uma estimativa que na população mundial 1.9 bilhões de pessoas estão acima do peso ideal e mais de 600 milhões de pessoas têm algum grau de obesidade (WHO,2018).

As comorbidades associadas à doença, como por exemplo, diabetes mellitus tipo II e hipertensão, são bem conhecidas (ELIAS, et al., 200). O consumo de uma dieta rica em gordura é atualmente o maior fator de risco para o desenvolvimento de obesidade, diabetes e outros distúrbios metabólicos. Novos estudos mostram evidências em roedores e em humanos que há uma correlação do consumo dessas dietas hiperlipídicas também com o desenvolvimento de comprometimentos cognitivos, como por exemplo, a doença de Alzheimer (SALLES, et al, 2015).

## 1.1. Obesidade

A obesidade pode ser definida tradicionalmente pelo excesso de gordura corporal que pode causar prejuízos à saúde. Pode ser classificada por meio de um cálculo de índice de massa corporal (IMC) dado pela razão entre o peso corporal, que deve ser expresso em quilogramas, dividido pela altura, que é expressa em metros (WHO,2018). Na prática clínica, isso é levado em consideração para classificar os pacientes e avaliar/monitorar os riscos metabólicos, fisiológicos (inflamação, resistência à insulina) e cardiovasculares associados à obesidade. (ABESO, 2019). Uma das principais comorbidades metabólicas associadas à obesidade é a Diabetes Mellitus tipo II. É importante destacar que a diabetes e a obesidade são os principais fatores de risco para eventos cardiovasculares.

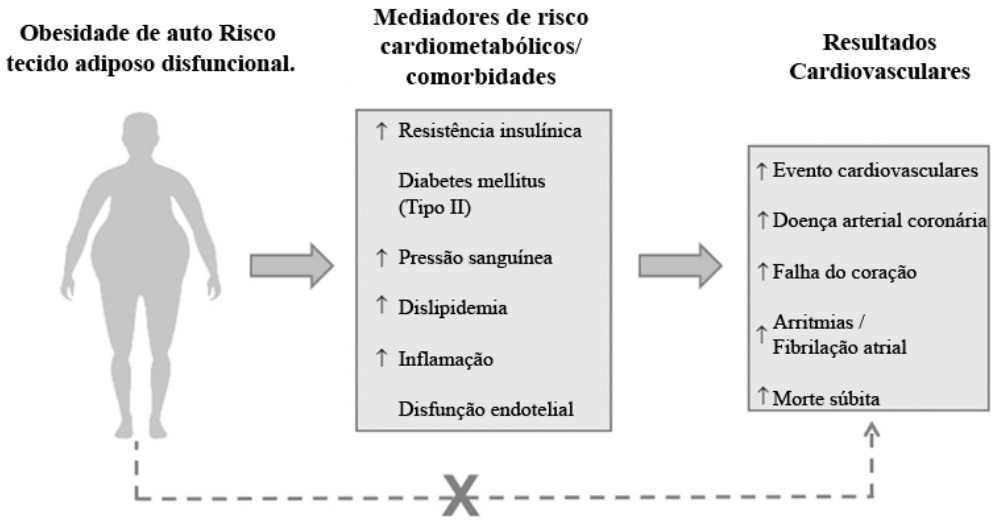


Figura 1: *Sintomas e resultados das complicações da obesidade.*

*Fonte: O autor.*

No Brasil, as ações de prevenção da obesidade têm se mostrado um dos maiores desafios de saúde. As causas da obesidade reúnem uma série complexa de fatores comportamentais, ambientais e genéticos, onde o principal elemento para aumento da prevalência de obesidade é categorizado por ambiente obesogênico, isto é, ambiente promotor de escolhas alimentares não saudáveis e de comportamentos sedentários ou com dificuldade de adoção de práticas regulares de atividade física (SWUINBURN et al., 2019b).

Dentre as mais recentes estratégias terapêuticas para o tratamento da obesidade e diabetes estão os medicamentos que mimetizam a resposta celular de determinada substância produzida pelo corpo. Os exemplos mais recentes são os ligantes de um receptor denominado de peptídeo semelhante ao glucagon ou *glucagon-like peptide receptor* (GLP-1R) que são alvos farmacológicos para tratamento da diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). Esses agonistas exercem função de um hormônio com ação hipoglicemiante, o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1). A *Novo Nordisk,* empresa que desenvolveu o fármaco, financia estudos clínicos para pesquisar se incretina possui ação neuroprotetora, já que receptores são expressos no Sistema Nervoso Central (SNC). Segundo Markaki e colaboradores (2020) estudos relatam que estes fármacos promovem a formação de novas células nervosas e a proteção de células pré-existentes para evitar a sua morte, que é um dos fatores que desencadeiam a doenças neurodegenerativas.

## 1.2 GLP-1

O GLP-1 possui potente ação hipoglicemiante que intensifica a liberação de insulina em resposta à ingestão de alimentos (KATZUNG, et al., 2014). É ligante do GLP-1R, um receptor acoplado a uma proteína G, transmembrana expresso majoritariamente em células exócrinas do pâncreas (MAYO et al., 2003). Foi identificado e isolado há mais de duas décadas e é um alvo farmacológico para tratamento para diabetes mellitus do tipo II (DM2), além de ser utilizado para auxílio no tratamento para obesidade em conjunto com outras terapias não medicamentosas (MATTHEW, 2017). Além disso, alguns estudos pré-clínicos sugerem que análogos dessa incretina podem exercer ação anti-inflamatória e neuroprotetora (HÖLSCHER C et. al, 2014).

O GLP-1 é produzido primariamente nas células L (enteroendócrinas) distribuídas ao longo do intestino, incluindo o cólon, íleo e porções mais próximas do intestino delgado em resposta à ingestão de alimentos. Essa incretina é codificada pelo gene do glucagon. As formas bioativas do GLP-1 contêm um comprimento de 29 ou 30 aminoácidos (AA). No estado não alimentando ou em jejum os níveis desse hormônio são baixos, após estado alimentado o GLP-1 atua nas células β do pâncreas aumentando a secreção de insulina, o que promove a internalização da glicose em todas as células do corpo, também possui atividade de inibição da secreção do glucagon. (DRUCKER, et al., 2007)

Além das células β do pâncreas, o GLP-1R também é expresso no cérebro – hipófise, hipotálamo, tronco cerebral e córtex, no coração, rim, trato gastrointestinal (TGI), fibras aferentes vagais no TGI, na veia hepatoportal (veia porta hepática), fígado e no nervo vago (CANDEIAS EM, 2015). Seu efeito no metabolismo se dá por dois mecanismos principais: i) quando da elevação da glicemia, é liberado pelas células intestinais e atua no pâncreas, estimulando a secreção de insulina; ii) sua elevação pós-prandial também promove redução de apetite e redução da ingestão de alimentos, por ativação de neurônios anorexígenos no centro da saciedade no hipotálamo (HAYES, 2017).

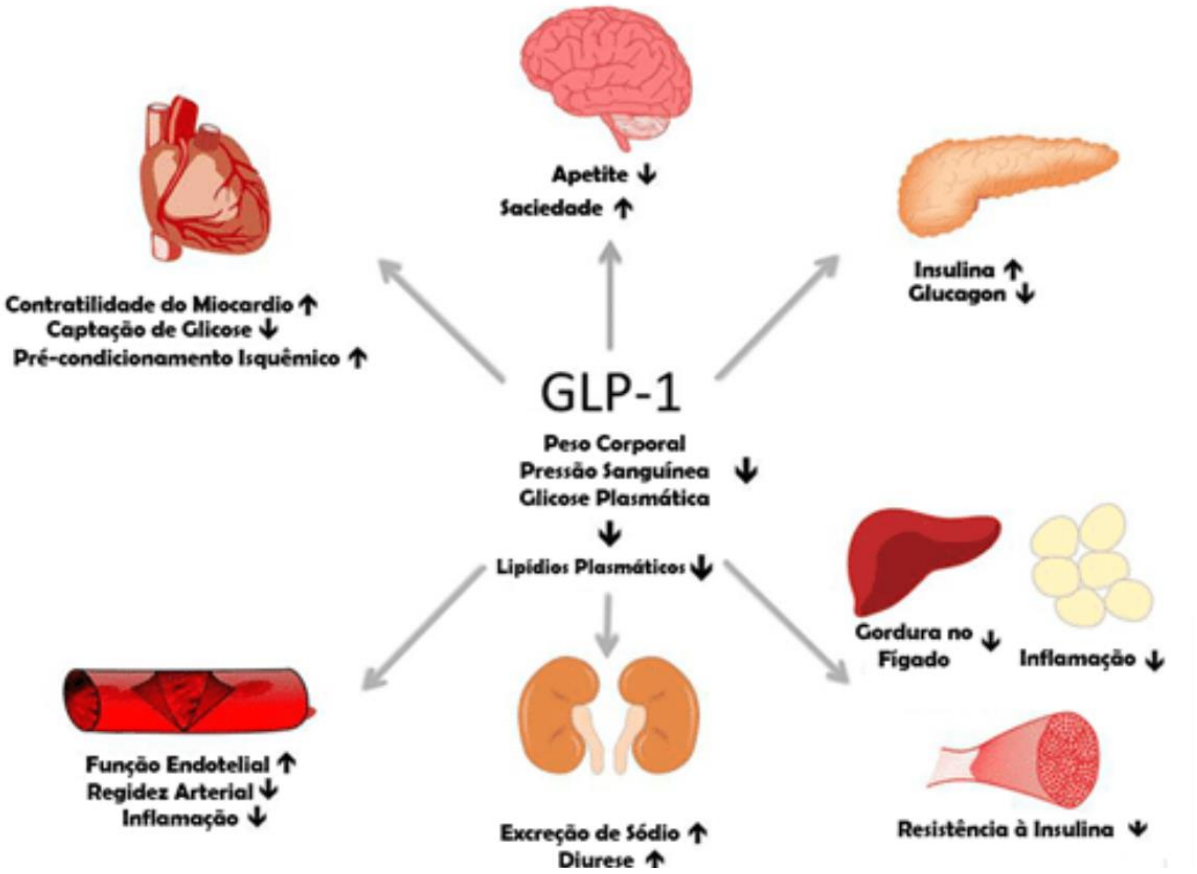


Figura 2: *Mecanismos pelos quais os agonistas de GLP-1 podem exercer efeitos fisiológicos no organismo.*

### 1.3 Semaglutida

Os análogos do GLP 1 são medicamentos utilizados para tratamento de diabetes mellitus tipo 2. O primeiro análogo (Victoza:Liraglutida) foi aprovado pelo FDA em 2010, sendo que anteriormente só existia uma incretina de ação longa, a exenatida (SETTER, et al., 2, 2011). Desde o começo da sua utilização, os agonistas injetáveis têm mostrado resultados no controle glicêmico, redução em eventos cardiovasculares e perda de peso. A semaglutida pode ser obtida a partir da *Saccharomyces cerevisiae* por tecnologia de DNA recombinante seguida por purificação de proteína. O tratamento com a semaglutida semanalmente é capaz de exercer perda de peso e redução na glicose sanguínea. A semaglutida foi aprovada pelo FDA em 5 de dezembro de 2017 e pela European Medicines Agency (EMA) em 8 de fevereiro de 2018. A aplicação clínica dos medicamentos da geração passada era limitada pelo seu curto tempo de meia vida na circulação (cerca de 1 a 2 minutos), pela atuação da enzima *dipeptidil peptidase-4* (DPP-4) que é responsável pela degradação proteolítica do fármaco. Em comparação à essa geração dos agonistas desse receptor, a semaglutida foi desenvolvida para ter uma taxa de eliminação baixa, consequentemente, possui maior tempo de meia vida.

Isso é devido a sua característica de maior oscilação e ligação à albumina, uma proteína muito presente no sangue, sendo adequado para a administração de uma vez por semana. (HABIB et al, 2021).

Com relação à farmacocinética, a semaglutida intacta no plasma corresponde, aproximadamente 70% a 80%, da dose total administrada, já a excreção inalterada é apenas 3% da dose total. O catabolismo do fármaco ocorre, essencialmente, pela ação da endopeptidase neutra (NEP) que é localizada em ligada à membrana em células renais (HABIB et al, 2021).

O mecanismo de ação relacionado à perda de peso é dado pela estimulação da saciedade nos neurônios anorexígenos localizados no hipotálamo juntamente com as alterações de tempo de esvaziamento gástrico e com motilidade do TGI, fatores que promove a redução do consumo, relacionado a fome fisiológica, e redução de peso corporal. Além disso, o fármaco atua nos circuitos neuronais do hipotálamo, que são responsáveis pela saciedade, satisfação e sensação de fome. Sobre a viabilidade de ser um medicamento voltado para tratamento de obesidade, é importante levar em consideração o efeito hipoglicemiante. Seu uso na obesidade tem se mostrado promissor, principalmente, se o paciente já apresenta DM2. Nesse caso, a intervenção na dieta e mudanças no estilos de vida são importantes para manter os níveis toleráveis e não-tóxico da glicose sanguínea e a redução de peso. É importante mencionar que os pacientes com esse distúrbio metabólico apresentam dificuldade ao controle de peso devido ao potencial de aumento de peso das medicações hipoglicemiantes, como sulfonilureias e a insulina. É necessário alertar sobre a segurança dessa medicação concomitante com outros hipoglicemiantes, devido ao risco de hipoglicemia, levando ao coma e até mesmo ao óbito. Com base nos dados de um estudo clínico de fase 2, elaborado pela Novo Nordisk, o uso da semaglutida 1x por semana em pacientes obesos sem DM2 resultou em pelo menos perda de 12% de peso se comparado ao grupo placebo (KUSHNER,et al., 2020).

Os agonistas do GLP 1 de forma geral são bem tolerados, onde os efeitos colaterais mais comuns são distúrbios no TGI (vômito, constipação e náuseas, são alguns exemplos). Todos esses efeitos são dependentes da dose, transitórios (comum nas primeiras semanas de tratamento). A incidência da hipoglicemia grave induzida pelo fármaco é baixa e bem rara. Estudos em ensaios randomizados controlados indicam a ausência de um risco aumentado de pancreatite ou câncer no pâncreas. No entanto, mesmo com resultados promissores para o uso seguro deste fármaco, outros autores mencionaram que esses achados científicos devem ser

interpretados com cautela devido à ocorrência de pancreatite aguda em um estudo (SUSTAIN 6.3).

No Brasil, recentemente no dia 03/01/2023 foi publicado no site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a aprovação do uso de um medicamento cujo o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) é a semaglutida. Segundo a nota, a indicação da medicação é um adjuvante a uma dieta hipocalórica e exercícios físicos para o controle e manutenção de peso em adultos com IMC inicial ≥ 30 kg/m2 (obesidade), ou ≥ 27 kg/m2 a < 30 kg/m2 (sobrepeso) na presença de outro distúrbio relacionado ao peso, como por exemplo, diabetes mellitus tipo II. Todo processo de aprovação está de acordo com o procedimento otimizado temporário de análise (RDC nº 750/2022). Anteriormente, a semaglutida era recomendada, no Brasil, apenas para o tratamento do diabetes e era utilizada para obesidade como *off-label* (sem orientação na bula).

No país, o medicamento necessita de prescrição médica, a receita é exigida para a dispensação, porém não é retida para assuntos regulatórios do estabelecimento. As formulações injetáveis da semaglutida, que no Brasil são distribuídas pela empresa dinamarquesa Novo Nordisk, podem ser encontradas em farmácias de dispensação em todo território nacional pela média de preço no valor de R$: 850,49 cada sistema de aplicação contém 1,5 ml e com sistema de liberação de doses que podem variar de 0,25mg à 0,5 mg.

Figura 3: *Solução injetável de semaglutida embalada e produzida pela Novo Nordisk, Ozempic*

## 1.4 Obesidade e dano cognitivo

Os efeitos fisiológicos, metabólicos e, principalmente, cardiovasculares da obesidade estão amplamente descritos na literatura, mas novos estudos vêm mostrando que existe uma relação também com alterações no sistema nervoso central. Um maior índice de massa corporal (IMC) está associado a deficiência de aprendizado, memória e funções cognitivas (MILLER,et all,. 2014). As relações entre obesidade e comprometimento cognitivo, como por exemplo, a doença de Alzheimer tem sido um dos assuntos que têm chamado atenção nos estudos. Evidências clínicas e estudos em modelos animais mostram que a obesidade e/ou dietas hiperlipídicas estão associadas às deficiências de aprendizado, memória, funções motoras e potencial atrofia cerebral (KNIGHT et al., 2014; WHITMER et al., 2008).

Um estudo realizado por Elias e colaboradores mostrou que a obesidade e hipertensão têm efeitos comuns em testes específicos de memória, isso sugere que o mecanismo da fisiopatologia desses danos pode ser comum. Nesse estudo foram feitos vários testes de cognição e foi comparado a pessoas não obesas (KARMI et al., 2010). Outro estudo realizado em 2020, avaliou os efeitos do palmitato, um ácido graxo de cadeia saturada presente nas maiorias das dietas hiperlipídicas, no cérebro. O estudo observou um aumento da absorção cerebral e acúmulo de palmitato no líquor de pessoas com obesidade e síndrome metabólica, que foi relacionado com menor desempenho cognitivo nos testes aplicados. Neste estudo, também foram utilizados camundongos que foram submetidos a infusão de palmitato diretamente no sistema nervoso central. O estudo encontrou como resultados, que em comparação ao grupo controle os potenciais pós sinápticos excitatório no hipocampo foram reduzidos em animais que receberam a infusão do ácido graxo. O palmitato no hipocampo pode induzir a ativação astroglial e micróglia e seu impacto deletério é mediado pela sinalização de fatores de necrose. O trabalho conclui que em camundongos, o palmitato induziu inflamação do hipocampo e induziu aumentos de níveis mediadores inflamatórios, inibindo a formação de novas conexões sinápticas (plasticidade sináptica) e comprometimentos relacionados à memória (MELO et al., 2020)

Além de alterações cognitivas, estudos relacionam a obesidade à maior incidência de depressão. Esta comorbidade sofre influência de fatores biológicos, comportamentais e predisposições genéticas. A exemplo das alterações biológicas podemos citar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e alterações em marcadores inflamatórios sistêmicos. São

vias biológicas que sofrem alterações nas duas patologias, não necessariamente ao mesmo tempo e influenciam as respostas tanto para obesidade quanto para depressão (MILANESCHI, et al., 2017). A hiperativação do eixo HPA libera cortisol que é um dos achados mais importantes na psiquiatria biológica (PARIANTE, et al., 2008). A exposição prolongada a esse hormônio pode levar a danos e perdas neuronais em regiões límbicas que são vulneráveis ao estresse associados à depressão, como por exemplo, o hipocampo (MCEWEN BS, et al., 2007). Essa hiperativação do eixo é observada em quase metade dos adultos obesos, o que pode ser fator agravante da obesidade por alguns mecanismos, como por exemplo, aumento do apetite com preferência por alimentos ricos em energia e promoção da adipogênese e hipertrofia na gordura visceral (FARDET L, et al., 2014).

A inflamação crônica é uma das marcas registradas da obesidade. O tecido adiposo branco sofre infiltração por macrófagos e outras células do sistema imunológico produtoras de citocinas pró inflamatórias. Essa instauração de um processo inflamatório periférico pode ser por via neurais, celulares e até por fatores relacionados ao humor (DINEL, et al., 2011). Mesmo que haja mecanismo de contraregulação, nas duas patologias em questão existe uma desregulação desse circuito, o que pode contribuir para a manutenção da inflamação, interferindo principalmente na neurotransmissão (CAPURON, et al., 2011).

### 1.5 Neurodegeneração

À medida que a população envelhece os comprometimentos cognitivos, incluindo a demência, se tornam mais comuns. Alguns estudos analisaram e correlacionaram que um IMC mais alto está associado ao risco de desenvolver a Doença de Alzheimer, uma das doenças neurodegenerativas mais comuns na população mundial. Mesmo que vários estudos apontem que a obesidade tem relação com o comprometimento cognitivo, dados sobre a relação entre obesidade-demência em idosos ainda são conflitantes. Alguns estudos apontam que essa relação persiste na vida adulta (GUSTAFSON et al., 2003).

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa responsável por uma morbidade significativa (OBOUDIYAT, et al., 2013). Possui elevada frequência na população idosa e há uma projeção que até 2050, 139 milhões de pessoas possam desenvolver Alzheimer ou algum tipo de demência (*Alzheimer Disease International)*. A doença de Alzheimer é uma doença progressiva caracterizada pelo encolhimento de estruturas cerebrais e perda de neurônios, principalmente colinérgicos, em regiões cerebrais (hipocampo e córtex frontal).

Como resultado funcional ocorre o desenvolvimento de demência, caracterizada por sintomas cognitivos, com disfunção das capacidades cerebrais, como por exemplo a memória, e físicas, como a incapacidade de coordenar movimentos musculares em função de falhas na transmissão colinérgica (ERATNE, et al., 2013)**.**

Uma das evidências mais estudadas sobre a diminuição dos neurônios nessas regiões é a formação de placas amiloides no espaço extracelular e de emaranhados de proteína tau fosforilada intracelular (SALLES *et al.,* 2015). Com essas placas facilitando a apoptose, há consequências na atividade dos neurônios; geralmente alterando os potenciais de ação dos neurônios causando hiperatividade ou hipoatividade. A perda dos neurônios colinérgicos nessa doença é bem expressiva, pois a via colinérgica do prosencéfalo basal (que é responsável pela memória e neuroplasticidade) é particularmente susceptível à formação das placas e emaranhados que resultam em neuroinflamação e, em última instância apoptose (SALLES *et al.,* 2015). Todos esses fatores podem implicar em problemas da neurotransmissão colinérgica levando o indivíduo a ter problemas no aprendizado e na neuroplasticidade que é um mecanismo necessário para a reorganização de funções e da própria estrutura do cérebro (SALLES *et al.,* 2015).

### 1.6 GLP-1 e Neuroproteção

Foram encontradas evidências que os agonistas de GLP-1 e a inibição da *dipeptidil peptidase-4* (DPP-4) podem exercer neuroproteção, e dessa forma, agir contra a neurodegeneração. Um estudo em roedores concluiu que agonistas do GLP-1 (GLP-1RA) foram associados a efeitos neuroprotetores e que o receptor dessa incretina é expresso em várias regiões do cérebro incluindo estruturas envolvidas na função cognitiva, como o hipocampo. Esses efeitos neuroprotetores mostraram depender da estimulação da neurogênese e da plasticidade sináptica e redução dos danos por estresse oxidativo (MARKAKI et al., 2020). Um dos primeiros fármacos análogos a essa incretina aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), a Exenatida demonstrou proteger células progenitoras neurais do apoptose induzido por placas de proteína beta amilóide (VELMURUGAN et al., 2012) Além disso, a liraglutida e lixisenatida, que também são agonistas dos GLP-1R, mostraram ter propriedades neuroprotetoras e regenerativas em neurônios hipocampais (HAMILTON et al., 2011). Além disso, esses agonistas têm sido associados a propriedades neuroprotetoras na

periferia, com efeitos animadores em modelos de neuropatia periférica e danos a nervos periféricos (MARKAKI et al., 2020)

Diante da relação entre a obesidade e o declínio cognitivo, e o potencial neuroprotetor de GLP1-RA, este trabalho tem por finalidade investigar se as alterações comportamentais e metabólicas em camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas podem ser revertidas pela semaglutida.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito neuroprotetor da semaglutida sobre alterações comportamentais e metabólicas em camundongos expostos a uma dieta rica em lipídios.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito de agonista de receptores GLP-1 (semaglutida) sobre as alterações de peso e homeostase glicêmica induzidas por dieta rica em lipídeos.
- Avaliar o efeito neuroprotetor da semaglutida sobre o comportamento tipo-depressivo e declínio cognitivo induzido pela dieta hiperlipídica.

## 3. JUSTIFICATIVA

A falta de novas medicações e outras alternativas (farmacológicas ou não) para o tratamento paliativo e/ou desaceleração da progressão de doenças relacionadas à prejuizo cognitivos, é agravada pelo aumento da população obesa, grupo de risco para o surgimento e progressão dessas doenças. Já existem evidências científicas (estudos experimentais e estudos pré-clínicos) de que agonistas GLP-1R podem exercer papel importante na neuroproteção e inibir a morte de neurônios. A *Novo Nordisk*, empresa que patenteou o primeiro agonista GLP-1R, usado no tratamento da diabetes, está juntamente com o colégio imperial de Londres, realizando um estudo clínico para avaliar os efeitos no SNC deste fármaco na doença de Alzheimer. (*ClinicalTrials.gov Identifier:* NCT01843075, 2019).

Portanto, é de fundamental interesse investigar se este fármaco poderia ser uma estratégia eficaz no tratamento tanto dos danos metabólicos, quanto neurológicos associados à obesidade e ao consumo de dietas hiperlipídicas.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Animais e protocolo experimental

Os animais foram provenientes do Centro de Ciências Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os procedimentos e manipulações foram realizadas conforme as recomendações da Lei Federal 11.794/20084, e posteriormente aprovada pelo Comitê de Ética Institucional (CEUA/UFOP 4502291021). Durante todo o experimento houveram esforços para a redução de danos e sofrimento dos camundongos.

Ao todo foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BI/6J, que foram retirados e mantidos sob os cuidados do biotério central da UFOP. Os animais foram divididos de maneira homogênea para que animais da mesma progenitora não ficassem na mesma caixa, evitando padrões genéticos e viés na interpretação dos testes. Foram alocados em 2 grandes grupos: dieta normal (DN) e a dieta hiperlipídica (DHL). Na terceira semana foram subdivididos em 4 grupos. Esses grupos foram: dieta normal veículo NUVILAB (DN), dieta normal Semaglutida (DNsemaglutida), dieta hiperlipídica veículo (DHL) e dieta hiperlipídica Semaglutida© (DHLsemaglutida).

## 4.2 Tratamento e dietas

Os camundongos foram submetidos às dietas durante 4 semanas. na seguinte composição NUVILAB: 20% de proteínas, 62% de carboidratos e 4% de lipídeos (óleo de soja vegetal); e dieta hiperlipídica: 20% de proteínas, 45% de carboidratos e 35% de lipídeos (óleo de origem animal). Nas 2 últimas semanas DNveículo e DHLveículo receberam injeções intraperitoneais de tampão fosfato (PBS 0,1M) e os grupos DNsemaglutida e DHLsemaglutida receberam injeção intraperitoneal durante 15 dias de semaglutida do laboratório NovoNordisk 25 nMol/Kg, em um intervalo de doses de 48 horas devido seu perfil farmacocinético (ZHANG,,2019).

| Composição | g/kg |
|---|---|
| Caseína (Proteína) | 200 |
| Amido de milho (Carboidrato) | 134,1 |
| Sacarose (Carboidrato) | 201 |
| Amido Dextrinizado (Carboidrato | 125 |
| Óleo de soja | 40 |
| Banha de porco | 200 |
| Celulose/fibras | 50 |
| Mix mineral | 50 |
| Mix vitaminas | 10 |
| L-Cisteína | 2,5 |
| Colina | 2,5 |
| **TOTAL** | 1000 |

*Tabela 1: composição da ração hiperlipídica.*

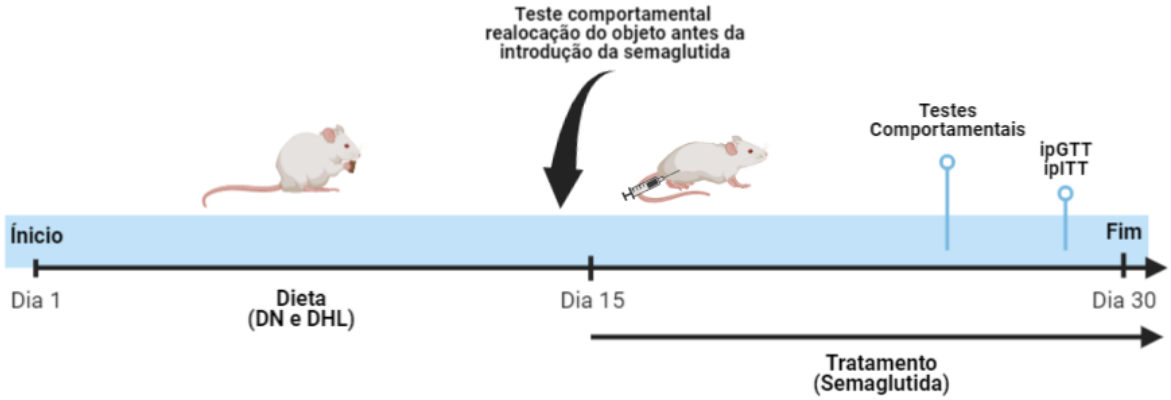


Figura 4: *Timeline de todo protocolo experimental.*

*Fonte: O autor.*

## 4.3 Testes comportamentais

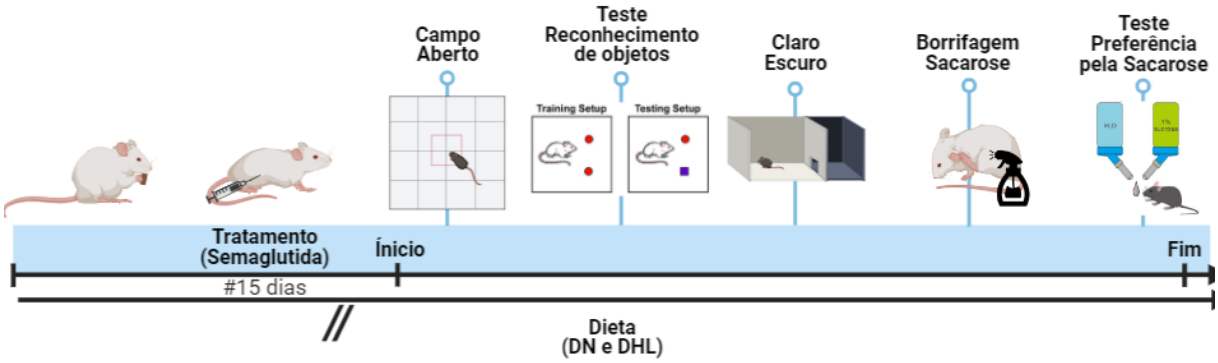


Figura 5: *Ilustração de todos os testes comportamentais.*

*Fonte: O autor.*

### 4.3.1 Teste de realocação do objeto

Este teste comportamental avalia a memória do roedor. É realizado em um aparato quadrado, com fundo e paredes brancas (52cm x 52cm) onde dois objetos iguais são dispostos paralelamente.

Vinte e quatro horas antes do início do teste, todos os roedores foram habituados a explorar o aparato na ausência dos objetos individualmente, cada animal foi colocado no centro do aparato para livre exploração durante 5 minutos. No dia seguinte, cada animal foi reintroduzido no aparato para exploração de dois objetos idênticos durante 5 minutos. Foram utilizadas peças de lego de no máximo 10 cm de altura e 5 cm de largura. Com auxílio de dois cronômetros, o tempo de interação com cada objeto foi mensurado. Os animais foram retirados do aparato, retornaram para suas caixas e após um intervalo de 30 minutos, foram reintroduzidos no aparato onde um dos objetos foi realocado. Novamente, a exploração e interação com os objetos foi mensurada por 5 minutos. A tendência natural é que o animal com memória mais preservada, explore mais o objeto realocado, caracterizando o interesse

pela novidade. A porcentagem de exploração de cada objeto (intacto e realocado) foi calculada em relação ao tempo total de exploração dos dois objetos.

### 4.3.2 Teste de reconhecimento do objeto

O teste de reconhecimento de objeto é um teste comportamental que avalia a memória declarativa em ratos e camundongos, baseado no comportamento tendencial do roedor de explorar objetos novos em detrimento a outro que já foi familiarizado.

Vinte e quatro horas antes do início do teste, todos os roedores foram habituados a explorar o aparato, descrito anteriormente, na ausência dos objetos durante 5 minutos. Na primeira etapa o animal passa 5 minutos no aparato explorando dois objetos idênticos e é contado pelo analisador o tempo que o animal interage com os objetos (proximidade, cheirar o objeto ou até mesmo subir sobre o objeto). Após 30 minutos, no teste um dos objetos é substituído por outro diferente, e são analisados os tempos de interação. A tendência inata do camundongo é ficar mais tempo no objeto novo pois é uma novidade. A porcentagem de exploração de cada objeto (velho e novo) foi calculada em relação ao tempo total de exploração dos dois objetos.

### 4.3.3 Teste do claro/escuro

O teste foi descrito primeiramente por Crawler e Goodwin para analisar e investigar os efeitos ansiolíticos de uma determinada droga. Os roedores apresentam um comportamento inato de aversão a áreas com muita iluminação. O aparato experimental consiste em uma caixa com dois compartimentos (42cm X 21cm, cada compartimento) ligados com uma porta. Um compartimento é aberto (Iluminado) e outro é completamente escuro. O animal é posicionado no compartimento escuro e alguns parâmetros são analisados, como por exemplo, número de transições para o claro, latência para sair do compartimento escuro e tempo de exposição no claro, isso no total de 5 minutos. Maior permanência no compartimento escuro e/ou menor números de transições indica comportamento tipo-ansioso Ansiolíticos como benzodiazepínicos e agonistas de receptores 5-HT1A já foram validados nesse teste.

### 4.3.4 Teste de borrifagem da sacarose

Este teste foi realizado conforme descrito por Isingrini e colaboradores (2010) e consiste em borrifar uma solução de 10% de sacarose sobre o dorso de cada animal, que

foram isolados entre si por um béquer de vidro de 2L. Neste teste é avaliado o comportamento de auto-limpeza. Com auxílio de dois cronômetros são mensurados o tempo de latência de cada animal, isto é, o tempo que o camundongo demora para começar a se limpar e o tempo total de auto-limpeza, em um intervalo de 5 minutos. Os animais tendem a se limpar mais vezes quando descobrem que a solução borrifada é palatável. Roedores com comportamento tipo-depressivo, mesmo quando descobrem que a solução é palatável, tendem a se limpar menos se comparado aos motivados. Entre cada animal o ambiente é limpo com uma solução de etanol 10% com a finalidade de remover vestígios do animal anterior. Ao final do teste todo aparato é limpo com uma solução de etanol 70%.

#### 4.3.5 Teste de preferência pela sacarose

Teste que avalia um fenômeno de diminuição do comportamento hedônico e falta de interesse por coisas potencialmente prazerosas, que na depressão, é um sintoma clássico e é chamado de anedonia. O consumo de sacarose é um indicativo para alterações nesse comportamento. Nas 72 horas que antecederam o início do teste foram colocadas 2 garrafas de água para habituação dos animais. Na sequência, foram disponibilizadas uma com água e uma com solução sacarose 1% (100mL) em cada caixa. Durante 3 dias os animais estavam expostos a essas duas garrafas e puderam escolher qual consumir. Diariamente as garrafas foram invertidas entre si para evitar esse viés de aprendizado de localização. O consumo total de sacarose foi calculado pela quantidade de solução colocada durante o experimento em relação ao volume total consumido ([consumo de sacarose/consumo total de líquido (sacarose + água)]*100).

### 4.4 Testes metabólicos

#### 4.4.1 Ganho de peso

O peso dos animais foi mensurado utilizando uma balança digital semanalmente durante um período de 4 semanas.

### 4.4.2 Consumo alimentar

Após o início da dieta e separação dos grupos, durante o primeiro dia ao sétimo dia e durante o vigésimo primeiro ao vigésimo oitavo dia de dieta foram mensurados o valor em gramas das rações consumidas com auxílio de uma balança digital. Foi anotado o consumo diário nesses períodos para avaliar se o fármaco inibiu o consumo da ração em comparação ao grupo sem tratamento farmacológico.

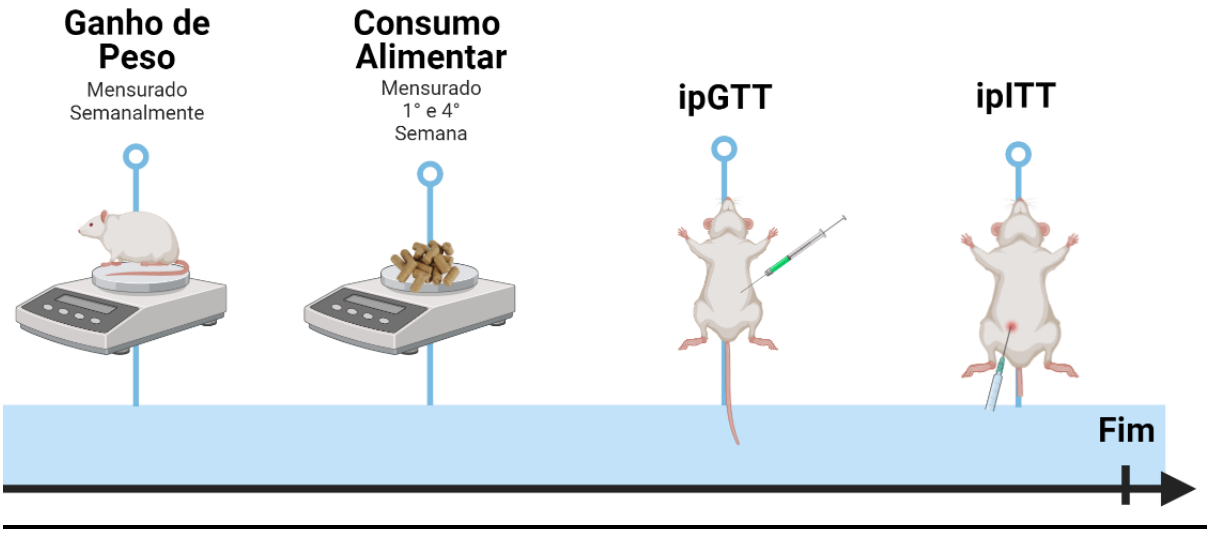


Figura 6: *Ilustração de todos os testes metabólicos.*

*Fonte: O autor.*

### 4.4.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

Após 4 semanas à introdução da dieta os animais foram submetidos ao teste metabólico de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT). Todos os animais foram submetidos a jejum durante 6 horas. Os animais foram habituados na sala do procedimento por uma hora, para evitar fatores estressores, como por exemplo, barulho excessivos do ambiente e a temperatura. Foi utilizado um equipamento glicosímetro (Accu-Chek Active) para a leitura da glicose circulante no sangue, por meio de uma pequena incisão na extremidade da cauda. Antes da administração da glicose todos animais foram submetidos a uma coleta para mensurar o nível de glicose de jejum. A administração de glicose foi realizada por uma injeção intraperitoneal de glicose (2g/Kg de peso corporal de cada animal) e na sequência foram realizadas medidas em tempos distintos: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos

após a administração de glicose, conforme especificações do fabricante do glicosímetro. Todos os resultados foram utilizados para a construção da curva de glicemia e foi calculada a área sob a curva (ASC), no software GraphPad Prism.

É importante mencionar que esses testes foram realizados após os testes comportamentais para evitar interferência do estresse da coleta de sangue.

### 4.4.4 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Semelhante ao ipGTT, o teste de tolerância à insulina tem o objetivo de avaliar a responsividade do animal à uma administração intraperitoneal de insulina, avaliada por meio do decaimento da glicose sanguínea. Para a realização do teste, após jejum de 6 horas, após esse jejum os animais foram submetidos a ambientação na sala com temperatura de 23° C por pelo menos 1h tiveram a glicemia determinada no tempo zero (T0; jejum) e receberam injeção intraperitoneal de insulina regular (Novo Nordisk) 1,5 U/kg. Após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos foram coletadas amostras de sangue para determinação da curva de decaimento de glicose circulantes no plasma sanguíneo.

## 5. RESULTADOS

Neste estudo foi utilizado um modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídios contendo 45% de gordura. A depender do tempo de exposição à dieta, os animais desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia e hiperglicemia, que se assemelham aos distúrbios metabólicos humanos e apresentam alterações comportamentais relacionadas à depressão e também, comprometimento cognitivo. Por outro lado, os agonistas de GLP-1R, como a semaglutida, vem se mostrando um grande avanço no tratamento da obesidade e diabetes, devido ao seu ótimo perfil de obtenção e manutenção de resultados e baixo índice de efeitos adversos. Como respaldado em estudos clínicos em andamento, nesse estudo investigamos se o sucesso metabólico do tratamento com semaglutida seria capaz de reduzir as alterações comportamentais, mostrando um perfil neuroprotetor.

Como pode ser observado na figura 7a, a DHL promoveu um significativo ganho de peso de cerca de 40% em relação aos animais que receberam DN em 4 semanas de tratamento. A semaglutida, introduzida no início da 3 semana de tratamento, foi capaz de promover uma redução neste ganho de peso. Importante mencionar que em animais em DN,

que são animais saudáveis, a semaglutida não produziu nenhum efeito na alteração de peso, neste tratamento. Um dos mecanismos associados a esta perda de peso é a redução do consumo alimentar. As figuras 7b e 7c mostram a redução no consumo diariamente dos dias 21 a 28, e do consumo acumulado, respectivamente.

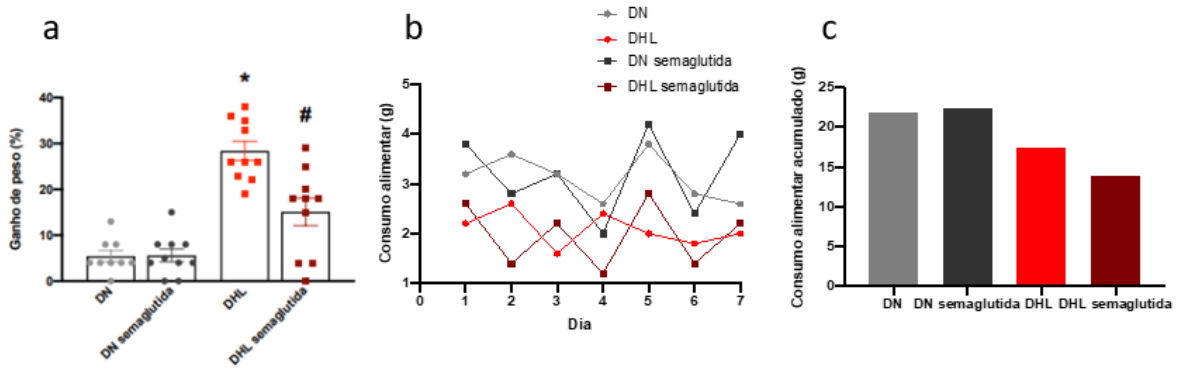


Figura 7: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o ganho de peso total em 4 semanas e consumo alimentar na última semana (dias 21 a 28). a) n = 9-10 por grupo; ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni * e # p< 0,05. * vs. DN e # vs. DHL. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). b) n=1 caixa, contendo 4-5 animais. a) Ganho de peso médio de cada grupo b) consumo alimentar de cada grupo c) consumo alimentar acumulado durante todo período de analise. DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica)*

Do mesmo modo, a DHL promoveu aumento na glicemia de jejum e na área sob a curva (ASC), no teste de tolerância à glicose administrada intraperitoneal (ipGTT) onde a semaglutida teve a capacidade de minimizar esses aumentos, provando seu potencial hipoglicemiante. Durante o ipGTT (Figura 8b), podemos observar que os grupos DN, DN semaglutida e, até mesmo o DHL semaglutida, após 15 minutos de teste apresentam decaimento na glicemia, o que indica que esta carga glicêmica desencadeia liberação de insulina, e que provavelmente, estes animais são sensíveis à sua ação hipoglicemiante. Por outro lado, no grupo DHL, até 30 minutos de teste, a glicemia continua em ascensão chegando a níveis plasmáticos de 400mg/dL, desta forma como o tempo de ascensão é maior, demora mais tempo para normalizar a níveis basais. Para comparar esses dados matematicamente, é necessário calcular a área sob a curva. Quanto maior a ASC menor é a eficiência deste animal em metabolizar a sobrecarga glicêmica. Na figura 8c observamos que a DHL reduz a eficiência metabólica dos animais, que é parcialmente melhorada pela semaglutida.

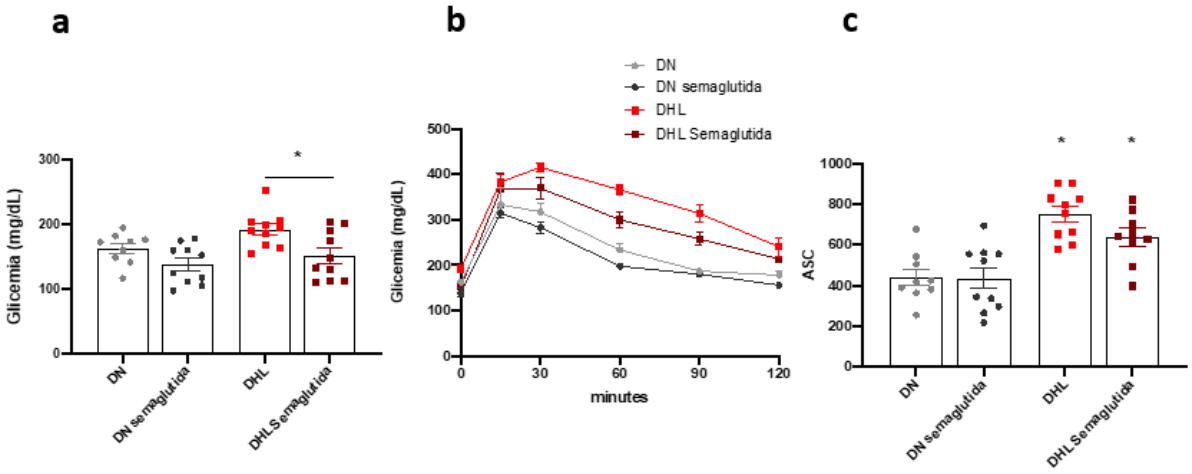


Figura 8: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a glicemia. n = 9-10 por grupo. ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni * e # p< 0,05. * vs. DN e # vs. DHL. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). a) glicemia de jejum de 8 horas de todos os grupos b) Gráfico de decaimento glicêmico c) ASC para interpretação gráfico b. DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica)*

A figura 9, demonstra os resultados do teste de tolerância à insulina intraperitoneal. Esse teste avalia o decaimento da glicose circulante no plasma após administração de uma concentração de insulina no peritônio do roedor para avaliar sua sensibilidade à insulina. Para avaliar a velocidade de decaimento de todos os grupos, foi necessário escolher um ponto constante de decaimento da curva para verificar a inclinação da reta (por regressão linear) e assim, calcular a constante de decaimento. Pode ser observado no gráfico intitulado kiTT, que estatisticamente, não há diferenças significativas entre os grupos. Estes dados indicam que apesar de apresentarem hiperglicemia, os animais do grupo DHL são, sim, sensíveis à insulina.

O aumento dos níveis de glicose nos primeiros 5 minutos observados pelo DN, DN semaglutida e DHL semaglutida no teste pode ser justificado pelo estresse de manipulação do animal e pela injeção.

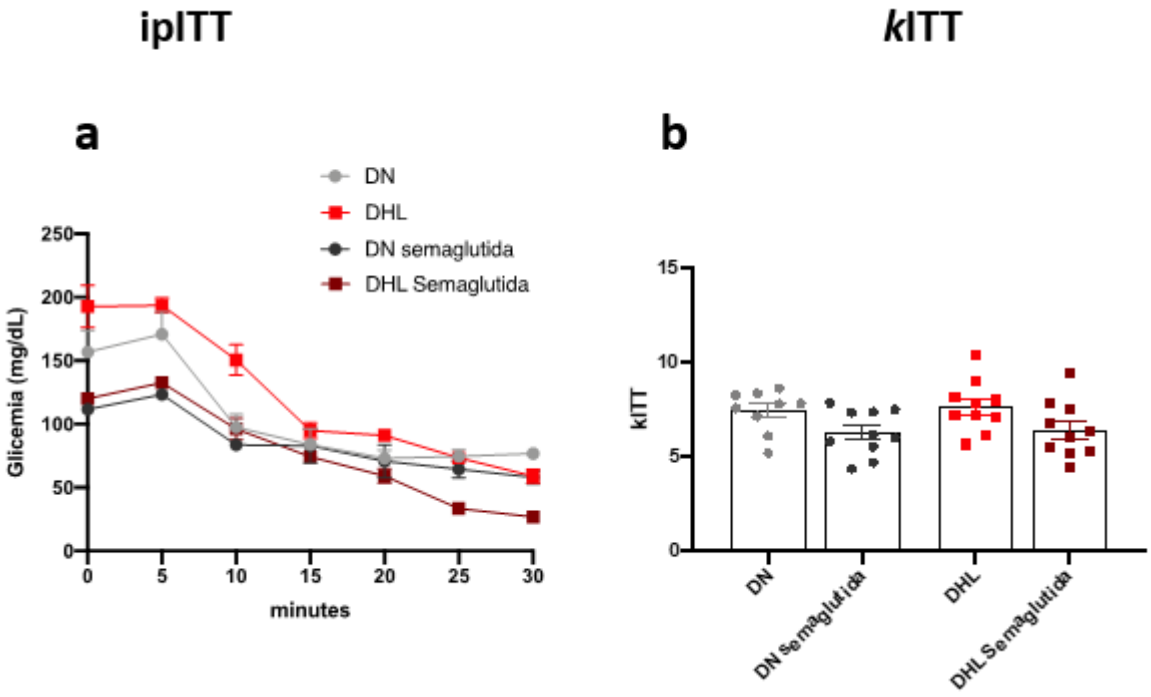


Figura 9: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a tolerância à insulina. n = 9-10 por grupo. ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni * e # p< 0,05. * vs. DN e # vs. DHL. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). a) decaimento glicêmico de cada grupo testado b) calculo da constante de decaimento da glicemia dos grupos para intepretação dos dados. DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica)*

Os efeitos metabólicos da semaglutida já são conhecidos, e foram confirmados neste estudo. No entanto, o efeito da semaglutida frente aos danos comportamentais de uma dieta hiperlipídica ainda não eram conhecidos. Neste sentido, antes de iniciar o tratamento com a semaglutida verificamos, no 14° dia, se os animais já apresentavam algum dano cognitivo.

No teste de realocação de objeto (Figura 10) realizado antes do início do tratamento com a semaglutida podemos observar que os animais pertencentes ao grupo DN exploraram mais o objeto novo (N) (mais que 50% do tempo) em comparação ao objeto velho (O), visto que as médias de % de exploração foram estatisticamente diferentes do valor fixo de 50%. Avaliando os animais do grupo DHL, houveram roedores que aprenderam, mas houveram também roedores que ficaram abaixo ou na linha na porcentagem de exploração próxima aos 50%, ou seja, não reconheceram que o objeto realocado era novo ou uma novidade. Esse teste realizado antes do tratamento com o fármaco, confirmou que animais DHL já estavam com comprometimento cognitivo.

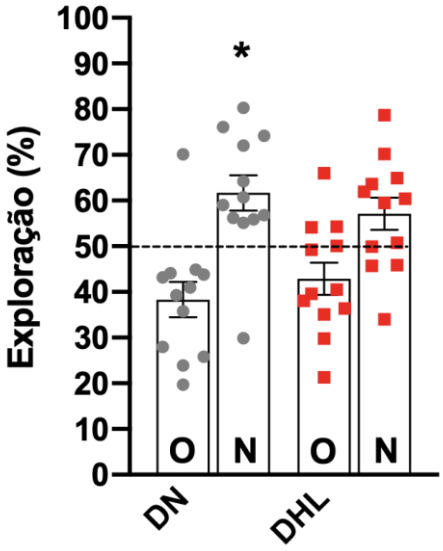


Figura 10: *Efeito da dieta sobre a memória no teste de realocação do objeto. n = 10-12 por grupo. O Teste de Student foi utilizado para a análise do teste de realocação do objeto, para determinar se o índice de exploração difere significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). *p< 0,05 versus 50%. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). DN (dieta normal), DHL (dietas hiperlipídicas)*

Duas semanas após o início da administração do análogo de GLP-1, ou veículo, foi realizado o teste de reconhecimento de objeto (Figura 11). Observamos que os grupos DN e DN semaglutida passaram mais de 50% do tempo explorando o objeto novo (N), fato que indica que estes animais reconheceram a novidade e tiveram interesse em explorá-la. Em contrapartida, independente do tratamento, ambos grupos que receberam DHL apresentaram prejuízos de memória por explorarem menos o novo objeto (a média não difere estatisticamente de 50%), ou seja, não houve alteração no fenótipo dos animais DHL frente ao tratamento, e podemos inferir que não a semaglutida não foi neuroprotetora.

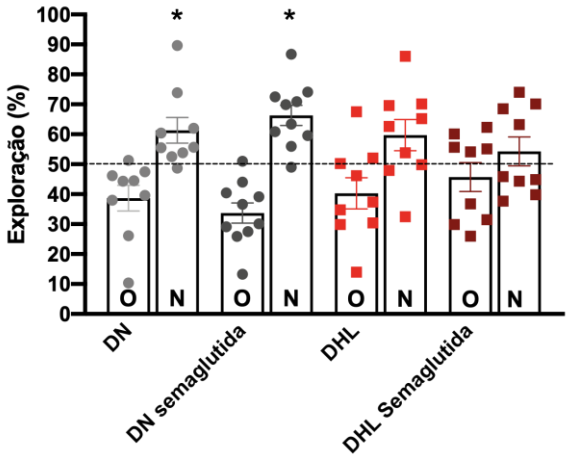


Figura 11: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre a memória no teste de reconhecimento do objeto. n = 9-10 por grupo. Teste t de Student foi utilizado para a análise do teste de reconhecimento do objeto, para determinar se o índice de exploração difere significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). *p< 0,05*

*versus 50%. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica).*

Em seguida avaliamos o comportamento tipo-ansioso no teste claro escuro (Figura 12). Neste teste avaliamos o tempo decorrido até a saída do animal pela primeira vez do compartimento escuro para o campo claro (tempo de latência), o número de entradas no campo claro e o tempo total no campo claro. Em todos os parâmetros, que poderiam indicar comportamento tipo ansioso no animal, pode-se observar que não houve nenhuma diferença nos tempos avaliados. Independente do tratamento, não foi observado nenhum fenótipo ansiolítico ou comportamento do tipo ansioso.

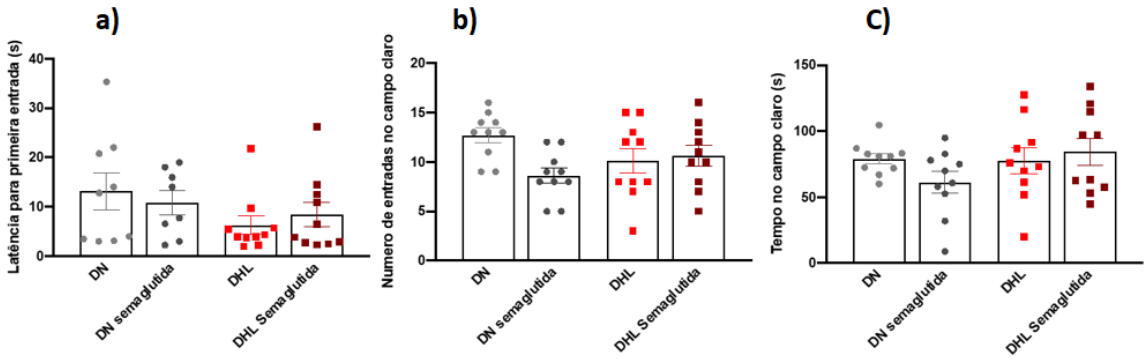


Figura 12: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo-ansioso no teste do campo claro/escuro. n = 9-10 por grupo. ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). a) média do tempo de latência para primeira transição para o campo claro b) média do número de transições entre os compartimentos c) média do tempo total de permanência no campo claro. DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica).*

O teste de borrifação de sacarose (*splash test*) (Figura 13), avalia o comportamento do tipo-depressivo (anedonia ou autocuidado) do animal. Os parâmetros avaliados são a latência para autolimpeza pela primeira vez e tempo total em que o animal tenha um comportamento de limpar o próprio corpo e/ou tentar retirar a umidade se limpando com a língua. O grupo DHL apresentou maior latência para autolimpeza pela primeira vez bem como um menor tempo total de autolimpeza, independente do tratamento com a semaglutida, o que indica um menor índice de autocuidado.

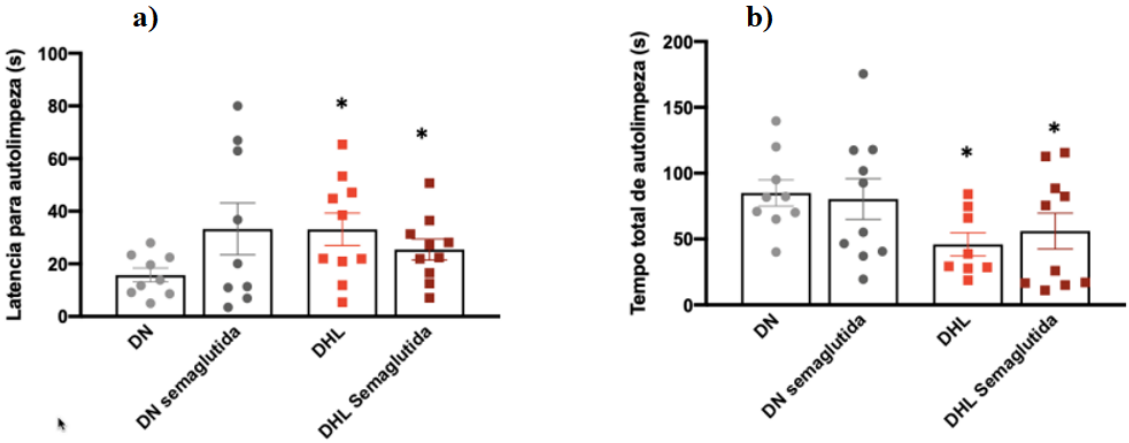


Figura 13: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo depressivo no teste de borrifagem da sacarose. n = 9-10 por grupo. ANOVA de duas vias, post hoc de Bonferroni * p< 0,05, vs. DN. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). a) média do tempo de latência para primeira autolimpeza b) Média do tempo total de autolimpeza dos camundongos. DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica).*

No teste de preferência de sacarose avaliamos o estado do tipo depressivo do animal, caracterizado por uma menor ingestão de uma solução palatável. A palatabilidade da solução de 1% de sacarose está associada a uma maior sensação de prazer e recompensa nos animais Na figura 14, podemos observar que os animais do grupo DHL tiveram uma preferência bem menor se comparado ao grupo DN. Além disso, também é perceptível que grupos que receberam a semaglutida não obtiveram um aumento significativo em relação ao grupo sem o tratamento.

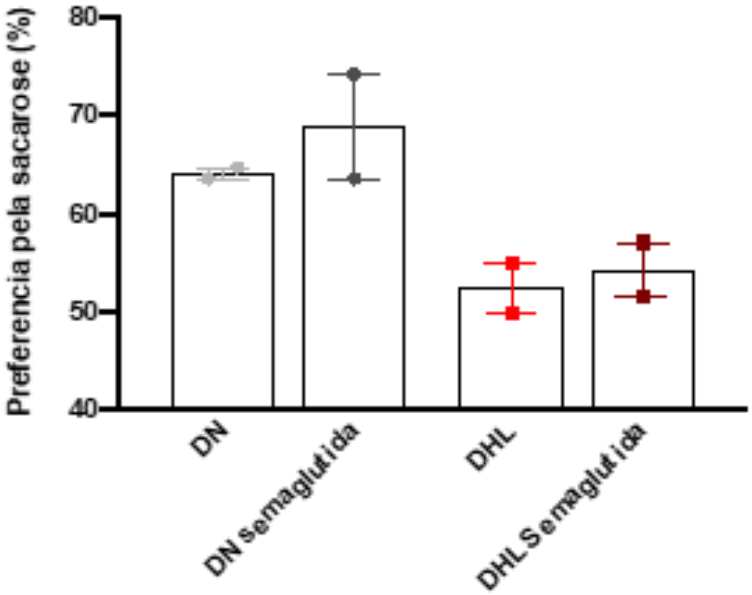


Figura 14: *Efeito da dieta e da semaglutida sobre o comportamento tipo depressivo no teste de preferência pela sacarose. n = 2 por grupo ( a preferência foi mensurada por caixa, contendo 4-5 animais de cada grupo em*

*cada caixa). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). DN (dieta normal), DHL (dieta hiperlipídica).*

## 6. DISCUSSÃO

Como demonstrado em vários estudos em modelos animais, os agonistas de GLP- 1R são muito eficientes em sua ação sobre o metabolismo da glicose. Além disso, existe a hipótese da sua atuação no SNC, melhorando a cognição e a plasticidade de células nervosas. A maioria dos estudos avaliaram representantes das primeiras gerações de agonistas, como por exemplo, a liraglutida e exenatida (FEMMINELLA et al.,, 2019). Fármacos de gerações subsequentes apresentam aperfeiçoamento na farmacocinética, com melhor perfil de absorção e capacidade de ligação plasmática promovendo uma ação prolongada.

Os nossos resultados demonstraram que a semaglutida produziu uma melhora sobre perfil glicêmico e no ganho de peso nos animais expostos à DHL. Com relação ao metabolismo da glicose, apesar de produzir uma ligeira redução na glicemia de jejum, os efeitos mais proeminentes são, de fato, observados em animais expostos à DHL. Esses dados indicam que o fármaco pode exercer maior eficiência em distúrbios metabólicos pré estabelecidos. Além disso, observamos efeito da DHL na glicemia de jejum e no ipGTT, sem alteração no ipITT, o que pode indicar que estes animais ainda estão sensíveis à insulina e sua hiperglicemia pode ser decorrente de uma maior produção endógena de glicose, por exemplo via gliconeogênese (DAVID L, et al., 2017).

Na sequência avaliamos o efeito da semaglutida sobre as alterações comportamentais induzidas pela DHL. Um dos mecanismos pelos quais a DHL promove alterações no SNC está associado à neuroinflamação. Está demonstrado que as DHL, especialmente as ricas em ácidos graxos saturados, induzem rapidamente a ativação da neuroinflamação seguida de ativação microglial e astrocitária no hipotálamo, região cerebral que controla a homeostase energética (THALER, et al., 2017; VALDEARCOS et al.,2017). Recentemente, estudos também demonstraram que este rápido efeito da DHL parece acontecer também no hipocampo, região envolvida na modulação da memória e regulação do humor (DE PAULA, 2021 ; MELO,et al. 2020).

Em nosso estudo, antes do início do tratamento com a semaglutida, os animais foram submetidos ao teste comportamental de realocação do objeto, onde observamos que os animais do grupo DHL já estavam com comprometimento cognitivo. Após o tratamento com

o medicamento, outro teste de memória foi realizado (teste de reconhecimento do objeto) e pudemos observar que não houve melhora significativa no fenótipo dos animais DHL.

No teste claro escuro não houveram diferenças nos parâmetros avaliados. Este dado difere de estudos prévios que mostraram um efeito ansiogênico da DHL. Dutheil e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de elucidar os mecanismos de atuação da dieta hiperlipídica no SNC. Os resultados mostraram que a DHL pode causar comportamentos do tipo ansioso por meio da interrupção nas vias celulares envolvidas na plasticidade sináptica (DUTHEIL, Sophie et al., 2016). Importante ressaltar que no estudo de Dutheil e colaboradores animais foram submetidos a 16 semanas de dieta, o que pode explicar nossa divergência de achados.

No teste de borrifagem de sacarose houve uma pequena diferença no comportamento de autocuidado, indicando o efeito da dieta em induzir um comportamento tipo-depressivo, que não foi revertido pela semaglutida. O teste de preferência pela sacarose comprovou o efeito da DHL em induzir anedonia e novamente a semaglutida não reverteu o fenótipo. Este efeito da DHL já está descrito na literatura e alterações tipo-depressivas podem ser observadas a partir de 5 dias de DHL, enquanto efeitos na memória já são observados a partir do terceiro dia (DE PAULA, 2021). Além disso, em nosso estudo a semaglutida também não foi capaz de reverter os danos cognitivos observados no teste de memória.

Apesar de não encontrarmos, neste estudo, efeito protetor da semaglutida sobre as alterações comportamentais induzidas pela DHL, diversos estudos vêm mostrando o potencial neuroprotetor de agonistas e análogos de GLP1-R. Hamilton e colaboradores observaram que o tratamento por 10 semanas com exendin-4 ou liraglutida (dois GLP-1RA) promoveu um aumento de novos neurônios no hipocampo de animais em dieta normal e DHL, evidenciando o potencial de indução de neuroplasticidade destes compostos (HAMILTON, et al., 2011). Em outro estudo onde foram comparados agonistas de duas gerações, liraglutida e semaglutida na doença de Parkinson. Ambos os fármacos foram utilizados na mesma concentração do nosso protocolo, porém o tempo de tratamento foi de 30 dias, via intraperitoneal. Nesse estudo, os animais foram expostos a uma toxina causadora de parkinsonismo e submetidos a testes comportamentais, como por exemplo, campo aberto e outros testes de função motora. Além disso, também foi avaliada a proliferação celular e neurogênese no hipocampo. Zhang observou ambos os fármacos melhoraram as deficiências motoras induzidas pela toxina e ainda promoveram redução da resposta inflamatória crônica no cérebro (ZHANG, et al., 2019). Maryna V Basalay. e colaboradores, utilizaram um modelo

de ratos não diabéticos submetidos a acidente vascular encefálico, por meio de oclusão da artéria cerebral média, para analisar o efeito neuroprotetor da liraglutida e semaglutida em 24hrs a 72hrs após a isquemia. O estudo encontrou que a semaglutida e liraglutida administradas por meio de perfusão conseguiram reduzir o tamanho do infarto em 63% e 48% (BASALAY, et al., 2019).

Os fármacos têm potencial de neuroproteção em várias vias nervosas e não somente no encéfalo. Um estudo realizado por Xingsheng Shu e colaboradores analisou o potencial neuroprotetor dos agonistas dos GLP-1R na neurodegeneração diabética retinal. Utilizando roedores, ele administrou a liraglutida via tópica ocular nos animais que já estavam com a condição induzida por dieta hiperlipídica. Os resultados mostraram que a liraglutida pode prevenir a degeneração das células ganglionares da retina, evitando apoptose e perda neural da retina (XINGSHENG et al., 2019).

De modo geral, observamos que uma importante diferença entre nosso estudo e os acima descritos foi o tempo de exposição ao tratamento, o que pode ser um fator determinante para a ativação de vias de sinalização e respostas envolvidas na neuroproteção. Desta forma, acreditamos que o tempo de tratamento de duas semanas, não foi o suficiente para observar no comportamento animal sinais que demonstram melhoras na questão cognitiva e de comportamento tipo-depressivo. Para análises mais conclusivas em relação ao tempo de 15 dias ser um tratamento eficaz para neuroproteção, seria mais interessante a separação encéfalo para realização de imunohistoquímica com auxílio de biomarcadores e microscopia para análise de neurônios e suas conexões.

Além disso, uma importante observação parece ser que o efeito comportamental independe das alterações metabólicas sistêmicas, uma vez que a semaglutida promoveu redução do ganho de peso e melhora da homeostasia glicêmica. Neste sentido, parece que conforme descrito na literatura, a neurotoxicidade dos próprios componentes da dieta, como ácidos graxos saturados (MELO, HELEN M. et al. 2020), é mais determinante sobre o SNC do que as alterações sistêmicas induzidas pela dieta, uma vez que estas foram atenuadas pelo tratamento, enquanto os danos comportamentais não.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos dados mostraram que a semaglutida foi eficaz em atenuar os efeitos metabólicos da DHL. Por outro lado, com relação às alterações comportamentais promovidas pela DHL, nosso estudo não conseguiu comprovar o efeito neuroprotetor nas condições avaliadas (tempo de tratamento e dose). Acreditamos que seja necessário a utilização de um maior tempo de administração do medicamento e técnicas histológicas e moleculares para avaliação de efeitos a nível de neuroplasticidade que indiquem um potencial neuroprotetor.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AMARAL, A. B.; RESENDES, C.; SANTOS, A. M. **Novos Antidiabéticos e Neuroproteção. Revista Portuguesa de Diabetes**, Portugal, ano 2020, v. 15, ed. 1, p. 11-15, 2020.

BAGGIO, LAURIE L.; DRUCKER, DANIEL J. **Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. Incretins**, Toronto, v. GASTROENTEROLOGY 2007;132:, ed. 132, p. 2131–2157, 2007.

BASALAY, Maryna V.; DAVIDSON, Sean M.; YELLON, Derek M. **Neuroprotection in rats following ischaemia-reperfusion injury by GLP-1 analogues—liraglutide and semaglutide. Cardiovascular drugs and therapy**, v. 33, p. 661-667, 2019.

BLUNDELL, John et al. **Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity**. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 19, n. 9, p. 1242-1251, 2017.

Candeias EM. Gut-brain connection: **The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. World Journal of Diabetes** [Internet]. 2015; 6(6): 807

Capuron L, Miller AH. **Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. Pharmacol Ther.** 2011;130:226–38 [Internet]. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.014. 67.

CONTE, SUÉLYN CAROLINA; DE CAMPOS, SIMONE BOLONHEIS. **PERSPECTIVAS DE PERDA DE PESO COM O USO DE LIRAGLUTIDA: REVISÃO DA LITERATURA**. LIRAGLUTIDE, Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR, ano 2015, v. 9, n. 1, ed. 9, p. 84-90, 1 out. 2014.

DE PAULA, Gabriela Cristina et al. **Hippocampal function is impaired by a short-term high-fat diet in mice: Increased blood–brain barrier permeability and neuroinflammation as triggering events**. Frontiers in neuroscience, v. 15, p. 734158, 2021.

Dinel A-L, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. **Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome**. PLoS ONE. 2011;6:e24325.

DUTHEIL, Sophie et al. **High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation.** Neuropsychopharmacology, v. 41, n. 7, p. 1874-1887, 2016.

ELIAS, M. F. et al. **Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension**: the Framingham heart study. International journal of obesity, v. 27, n. 2, p. 260-268, 2003.

Fardet L, Fève B. **Systemic glucocorticoid therapy: a review of its metabolic and cardiovascular adverse events. Drugs**. 2014;74:1731–45

FEMMINELLA, Grazia Daniela *et al*. **Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alz**heimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial: (ELAD study). Femminella et al. Trials, [*s. l.*], v. 20, p. 20-191, 2019.

HAMILTON, Alison et al. **Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. Journal of neuroscience research**, v. 89, n. 4, p. 481-489, 2011.

HANLEY, Michael J.; ABERNETHY, Darrell R.; GREENBLATT, David J. **Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans.** Clinical pharmacokinetics, v. 49, p. 71-87, 2010.

Hölscher C. Central effects of GLP-1: **New opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. Journal of Endocrinology**. 2014 Mar 7; 221(1): T31-41

**HORMÔNIOS pancreáticos e fármacos antidiabéticos: Agonistas do receptor de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP 1)**. *In*: KATZUNG, Bertram G. Farmacologia básica e clínica. 13. ed. California: AMGH Editora Ltda, 2017. cap. 41, p. 739-741.

JAACKS, Lindsay M. et al. **The obesity transition: stages of the global epidemic.** The lancet Diabetes & endocrinology, v. 7, n. 3, p. 231-240, 2019.

KUSHNER, Robert F. et al. **Semaglutide 2.4 mg for the treatment of obesity: key elements of the STEP trials 1 to 5**. Obesity, v. 28, n. 6, p. 1050-1061, 2020.

MARKAKI, Ioanna *et al*. **Repurposing GLP1 agonists for neurodegenerative diseases. International Review of Neurobiology,** [*s. l.*], v. 155, 2020.

MAYO, Kelly E. *et al*. **The Glucagon Receptor Family: International Union of Pharmacology.** XXXV.. Pharmacological Reviews, [*s. l.*], v. 1, ed. 55, p. 167-194, March 2003.

McEwen BS. **Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain.** Physiol Rev. 2007;87:873–904

MELO, Helen M. et al. **Palmitate is increased in the cerebrospinal fluid of humans with obesity and induces memory impairment in mice via pro-inflammatory TNF-α**. Cell Reports, v. 30, n. 7, p. 2180-2194. e8, 2020.

MELO, Helen M. et al. **Palmitate is increased in the cerebrospinal fluid of humans with obesity and induces memory impairment in mice via pro-inflammatory TNF-α**. Cell Reports, v. 30, n. 7, p. 2180-2194. e8, 2020.

Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). **Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. Brain, Behavior, and Immunity, 42, 10–21. doi:10.1016/j.bbi.2014.04.001**

Nelson, David L., and Michael M. Cox. 2017. **Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed.** New York, NY: W.H. Freeman.

**NEURONAL and intracellular signaling pathways mediating GLP-1 energy balance and glycemic effects. Physiology & Behavior, Philadelphia**, p. 1-5, 27 nov. 2017.

Pariante CM, Lightman SL. **The HPA axis in major depression: classical theories and new developments**. Trends Neurosci. 2008;31:464–8. 50.

SALLES, Geisa *et al*. **Efeitos Neuroprotetores do Tratamento com Agente Antidiabético em Camundongos Transgênicos com Doença de Alzheimer**. Doença de Alzheimer, Oxidativo, Brazil, 2015.

SHU, Xingsheng et al. **Topical ocular administration of the GLP-1 receptor agonist liraglutide arrests hyperphosphorylated tau-triggered diabetic retinal neurodegeneration via activation of GLP-1R/Akt/GSK3β signaling**. Neuropharmacology, v. 153, p. 1-12, 2019.

THALER, Joshua P. et al. **Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 1, p. 153-162, 2012.

VADINI, Francesco et al. **Liraglutide improves memory in obese patients with prediabetes or early type 2 diabetes: a randomized, controlled study.** International Journal of Obesity, v. 44, n. 6, p. 1254-1263, 2020.

VALDEARCOS, Martin et al. **Microglial inflammatory signaling orchestrates the hypothalamic immune response to dietary excess and mediates obesity susceptibility. Cell metabolism**, v. 26, n. 1, p. 185-197. e3, 2017.

WASHINGTON, S. M. S., PharmD, DVM, CDE, CGP, FASCP Associate Professor Department of Pharmacotherapy, College of Pharmacy Washington State University-Elder Services Spokane, Washington Joshua J. Neumiller, PharmD, CDE, CGP, FASCP Assistant Professor, Department of Pharmacotherapy, College of Pharmacy Washington State University—Elder Services Spokane. **Clinical Focus on GLP-1 Agonists in Type 2 Diabetes Mellitus.** Disponível em: <https://www.uspharmacist.com/article/clinical-focus-on-glp-1-agonists-in-type-2-diabetes-mellitus>.

YARIBEYGI, Habib et al. **GLP-1 mimetics and cognition. Life Sciences**, v. 264, p. 118645, 2021.

Zhang L, Zhang L, Li L, Hölscher C. **Semaglutide is Neuroprotective and Reduces α-Synuclein Levels in the Chronic MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease**. Journal of Parkinson's Disease. 2019 ;9(1):157-171. DOI: 10.3233/jpd-181503. PMID: 30741689.