

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA PAULA FUGAZZA BERNARDES

**EFEITOS DA LIRAGLUTIDA NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CAMUNDON-
GOS SWISS QUE RECEBERAM DIETA HIPERLIPIDICA**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2023

ANA PAULA FUGAZZA BERNARDES

**EFEITOS DA LIRAGLUTIDA NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CAMUNDON-
GOS SWISS QUE RECEBERAM DIETA HIPERLIPIDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B522e Bernardes, Ana Paula Fugazza.

Efeitos da liraglutida na instabilidade genômica em camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica / Ana Paula Fugazza Bernardes. - 2023.

52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Liraglutida - Efeito fisiológico. 2. Instabilidade genômica. 3. Obesidade. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 420

Com início às 14 (quatorze) horas do dia 28 (vinte e oito) de novembro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 101/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **ANA PAULA FUGAZZA BERNARDES**, sob a orientação da **Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade**, intitulada “**EFEITOS DA LIRAGLUTIDA NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CAMUNDONGOS SWISS QUE RECEBERAM DIETA HIPERLIPIDICA**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Alessandra Peres (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesesseis) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de novembro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução n 07/2015 aprovada pelo colegiado de coordenação PPGCS, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental e no Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

"Dedico este trabalho ao meu pai, Valtir Fugazza (*in memoriam*) cujo apoio incentivo constante ao longo dos meus estudos sempre foram a minha maior motivação. Tenho certeza de que estaria imensamente orgulhoso desta minha conquista.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que é minha base e minha razão de viver

Minha família, fonte de amor e apoio incondicionais.

À minha orientadora, por sua orientação, conhecimento e inspiração.

Aos professores, pelo conhecimento e compreensão

Aos meus amigos e colegas de sala e do laboratório GPGTOX, pelas horas de estudo compartilhadas e pelo apoio mútuo.

À instituição de ensino Unesc e Unifebe por nos dar subsídios e ótima estrutura para nossos estudos e pesquisas

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram em mim, me encorajaram e estiveram ao meu lado durante esta jornada desafiadora. Sem vocês, este caminho teria sido mais árduo.

À minha dissertação de mestrado, que representa a dedicação, a busca pelo conhecimento e o desejo de contribuir para o avanço da ciência.

Muito obrigado por fazerem parte desta conquista.

“O começo de todas as ciências é o espanto de
as coisas serem o que são”

Aristóteles

RESUMO

Dentre as doenças crônicas mais incidentes na população, destaca-se a obesidade. Os fatores de risco incluem uma combinação de fatores genéticos, metabólicos e ambientais, que interagem entre si contribuindo para a prevalência e consequências. Mecanismos fisiopatológicos estão associados a obesidade, como desequilíbrio energético, resistência à insulina, inflamação crônica, alteração no sistema nervoso central, disbiose intestinal, podendo resultar em danos em diversas macromoléculas, como o DNA. A liraglutida é um agente promissor para o tratamento da obesidade, uma vez que age no controle glicêmico e no mecanismo de saciedade alimentar. Baseado nesses achados, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da liraglutida na instabilidade genômica em camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica (DH). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos entre 40 e 60 dias de vida, divididos em 4 grupos experimentais (n = 6 animais por grupo): Grupo 1 (Controle) – recebeu dieta padrão e salina via subcutânea; Grupo 2 (Dieta Hiperlipídica) - recebeu dieta hiperlipídica e salina (0,9%) via subcutânea; Grupo 3 (Liraglutida) - recebeu dieta padrão e liraglutida dose 0,15 mg/kg via subcutânea; Grupo 4 (Dieta hiperlipídica + liraglutida) - recebeu dieta hiperlipídica e liraglutida 0,15 mg/kg via subcutânea. O experimento teve duração de 20 semanas e foi dividido em 2 etapas: Etapa 1) duração de 16 semanas com dieta hiperlipídica; Etapa 2): duração de mais 4 semanas, onde junto com a dieta foi fornecido o tratamento com liraglutida (0,15 mg/kg) diariamente por 4 semanas. Nesse período foi realizado o controle alimentar, peso corporal e posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia para as avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade através do Ensaio Cometa (sangue e fígado) e Teste de Micronúcleos (medula óssea), respectivamente. Dentre os resultados obtidos, um aumento no peso dos animais que consumiram a dieta hiperlipídica em relação aos que consumiram dieta padrão foi verificado, isso devido maior ingestão de calorias por conta da densidade da gordura fornecida pela DH. Em relação aos dados do ensaio cometa em sangue, a DH e liraglutida, levaram a um aumento de dano ao DNA quando comparados ao controle e a liraglutida não se mostrou eficaz na reparação destes danos. No fígado, foi observado um aumento no grupo DH em relação ao grupo controle. Quando avaliado a mutagenicidade pela dieta DH e pelo uso da liraglutida, os dados mostraram que não houve diferenças significativas no grupo controle, com uso de liraglutida e DH + liraglutida. Assim, podemos concluir que a dieta hiperlipídica foi genotóxica e que o tratamento com liraglutida levou a instabilidade genômica. Mais estudos são necessários para entender o mecanismo da liraglutida na instabilidade genômica e dose.

Palavras-chave: Obesidade; Instabilidade Genômica; Liraglutida.

ABSTRACT

Among the most common chronic diseases in the population, obesity stands out. Risk factors include a combination of genetic, metabolic and environmental factors, which interact with each other contributing to prevalence and consequences. Pathophysiological mechanisms are associated with obesity, such as energy imbalance, insulin resistance, chronic inflammation, alterations in the central nervous system, intestinal dysbiosis, which can result in damage to several macromolecules, such as DNA. Liraglutide is a promising agent for the treatment of obesity, as it acts on glycemic control and the food satiety mechanism. Based on these findings, the objective of this study is to evaluate the effects of liraglutide on genomic instability in *Swiss* mice that received a high-fat diet (HD). Male *Swiss* mice between 40 and 60 days of age were used, divided into 4 experimental groups (n = 6 animals per group): Group 1 (Control) – received a standard diet and saline subcutaneously; Group 2 (High-fat Diet) - received a high-fat diet and saline (0.9%) subcutaneously; Group 3 (Liraglutide) - received a standard diet and liraglutide dose 0.15 mg/kg subcutaneously; Group 4 (High-fat diet + liraglutide) - received a high-fat diet and liraglutide 0.15 mg/kg subcutaneously. The experiment lasted 20 weeks and was divided into 2 stages: Stage 1) duration of 16 weeks with a high-fat diet; Stage 2): duration of another 4 weeks, where along with the diet, treatment with liraglutide (0.15 mg/kg) will be provided daily for 4 weeks. During this period, food and body weight control were carried out and subsequently subjected to euthanasia for genotoxicity and mutagenicity assessments through the Comet Assay (blood and liver) and Micronucleus Test (bone marrow), respectively. The results obtained were an increase in weight in the animals that consumed the high-fat diet in relation to those that consumed a standard diet, due to a higher calorie intake due to the density of fat provided by HD. In relation to the data from the comet assay in blood, DH and liraglutide led to an increase in DNA damage when compared to the control and liraglutide was not effective in repairing this damage. In the liver, an increase was observed in the DH group compared to the control group. When evaluating the mutagenicity of the DH diet and the use of liraglutide, the data showed that there were no significant differences in the control group, with the use of liraglutide and DH + liraglutide. Thus, we can conclude that the high-fat diet was genotoxic and that treatment with liraglutide led to genomic instability. Further studies are needed to understand the mechanism of liraglutide on genomic instability and dose.

Keywords: Obesity; Genomic Instability; Liraglutide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Desenho experimental 29

FIGURA 2. *Tail Intensity* (%) de células de sangue total periférico de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida 34

FIGURA 3. *Tail Intensity* (%) de células de fígado camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida 34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Consumo alimentar e peso corporal de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida 33

TABELA 2. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida 35

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGS	Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control</i>)
CEA	Centro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DH	Dieta Hiperlipídica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
EPCMn	Eritrócitos policromáticos micronucleados
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21 (<i>Fibroblast growth factor 21</i>)
GLP-1	Peptídeo 1 tipo glucagon (<i>Glucagon-like peptide-1</i>)
GLP-1RA	Agonista do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (<i>Glucagon-like peptide-1 receptor agonists</i>)
IDF	Federação internacional de diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
IHME	Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (<i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>)
IL-6	Interleucina 6 (<i>Interleukin 6</i>)
IMC	Índice de massa corporal
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PKA	Proteína quinase A (<i>Protein kinase A</i>)
PKC	Proteína quinase C (<i>Protein kinase C</i>)

STZ	Estreptozotocina (<i>Streptozotocin</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
Vitamina D3	Colecalciferol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE.....	14
1.2. FISIOLOGIA DA OBESIDADE.....	16
1.3. INSTABILIDADE GENÔMICA NA OBESIDADE.....	18
1.4. DIETA HIPERLIPÍDICA (DH).....	20
1.5. A EVOLUÇÃO DOS HIPOGLICEMIANTES E SEUS EFEITOS NA PERDA DE PESO	21
1.6. FARMACOLOGIA DA LIRAGLUTIDA.....	22
1.7. JUSTIFICATIVA.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. ANIMAIS.....	28
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
3.3. TRATAMENTOS.....	30
3.3.1. Dieta hiperlipídica.....	30
3.3.2. Liraglutida	30
3.4. PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR DOS ANIMAIS.....	30
3.5. ENSAIO COMETA.....	30
3.6. TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN).....	31
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	33
4.2. ENSAIO COMETA.....	33
4.3. TESTE DE MICRONÚCLEOS	34
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem a principal causa de morbidade, incapacidades e mortalidade da população geral, mas principalmente nos idosos, se tornando um desafio para todas as regiões do mundo e para países em desenvolvimento como o Brasil (Campolina et al., 2011; CDC, 2013). Dentre as doenças crônicas mais incidentes na população, destaca-se a obesidade que vem atingindo proporções epidêmicas e se tornando uma das doenças que mais cresce no mundo, representando um desafio global que transcende barreiras geográficas, culturais e socioeconômicas (Poblete-Aro et al., 2018; ADA, 2020).

A obesidade emergiu como uma das maiores ameaças à saúde global do século XXI, definida como uma condição caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que representa um risco significativo para a saúde. Mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são obesas, dentre elas, 650 milhões de adultos, 340 milhões de adolescentes e 39 milhões de crianças. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2025, aproximadamente, 167 milhões de pessoas, adultos e crianças, ficarão menos saudáveis por estarem acima do peso ou obesas (OMS, 2021). Todos os países são afetados pela obesidade, com alguns países de rendimento mais baixo a registarem os maiores aumentos na última década. Nenhum país reportou um declínio na prevalência da obesidade em toda a sua população e nenhum está no bom caminho para cumprir a meta da Organização Mundial de Saúde (OMS) de não aumentar os números de obesos de 2010 até 2025.

A tendência é que esse número aumente exponencialmente, segundo o levantamento apresentado pelo Atlas Mundial da Obesidade. Esta organização apontou que a estimativa é de que 1 em cada 5 mulheres e 1 em cada 7 homens sejam obesos em 2030, o que significaria 1 bilhão de pessoas no mundo. No Brasil, destacamos um aumento anual de 2,8 % de adultos obesos, o que representa uma projeção de 41% de adultos obesos, em 2035 (IDF, 2023).

O impacto econômico do excesso de peso e da obesidade de 2020 a 2035, mostra um impacto de 1,96 bilhões de dólares em 2020, aumentando para mais de 4 bilhões de dólares em 2035. Aqui, o impacto econômico inclui tanto os custos de sa-

úde decorrentes do tratamento da obesidade e das suas consequências, como o impacto na produtividade econômica, a contribuir para o absentismo, o presenteísmo (redução da produtividade no trabalho), a aposentadoria por invalidez ou a morte (Banco Mundial, 2022).

Sendo assim, a epidemiologia da obesidade abrange a análise de sua distribuição, determinantes e consequências em populações específicas. Como enfatizado por Jeffery et al. (2006), quando diz que a obesidade é uma epidemia complexa com raízes profundas em nossa sociedade moderna. Assim, a compreensão da epidemiologia da obesidade é fundamental para a formulação de políticas públicas eficazes e estratégias de prevenção e intervenção.

Neste contexto, o reconhecimento precoce dos fatores de risco e a implementação de medidas preventivas são de extrema importância para combater essa crescente ameaça à saúde (Biggs et al., 2010). No entanto, como observado por Popkin et al., (2012), a obesidade é uma epidemia global complexa, enraizada em mudanças sociais, econômicas e culturais, não se limita apenas à análise de dados demográficos, mas requer uma abordagem multidisciplinar para compreender suas causas e seu controle.

Dados estatísticos atuais refletem a gravidade da epidemia de obesidade. A pesquisa Global mostrou que a obesidade é responsável por 4,7 milhões de mortes em todo o mundo anualmente. Nos Estados Unidos, por exemplo, a taxa de obesidade entre adultos atingiu 42,4% em 2017-2018, de acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). A obesidade também está relacionada a uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, apneia do sono, câncer e outras comorbidades (IHME, 2017). Vale ressaltar que a obesidade é uma doença subdiagnosticada e que possui uma mortalidade subestimada, demonstrando que sua magnitude é maior do que pode ser traduzida com esses dados. Uma preocupação é que as pessoas com obesidade diagnosticadas tardiamente, provavelmente usarão mais serviços de saúde devido à maior probabilidade de complicações, sobrecarregando os sistemas de saúde que já estão sob pressão (Dall et al., 2014).

A expectativa de vida de uma pessoa com obesidade pode ser afetada negativamente, principalmente devido ao aumento do risco a diversas comorbidades, incluindo a forma grave da obesidade, a qualidade dos serviços de saúde e o estilo de vida do indivíduo (Ministério da Saúde, 2017). Segundo Bhaskaran et al. (2014),

foram analisados os dados de 239 estudos, onde se concluiu que a obesidade está associada a um risco aumentado de morte prematura. A pesquisa destacou que a obesidade grave pode reduzir a expectativa de vida em até 10 anos.

É crucial ressaltar, que a perda de peso e o gerenciamento da obesidade podem melhorar a expectativa de vida e reduzir o risco de complicações relacionadas à obesidade. Intervenções que promovam a adoção de um estilo de vida saudável, incluindo uma dieta equilibrada e a prática regular de atividade física, podem ter impactos positivos na expectativa de vida de pessoas com obesidade (Rizza, 2010).

1.2. FISILOGIA DA OBESIDADE

A fisiologia da obesidade é um campo complexo que envolve uma série de processos biológicos que resultam no acúmulo excessivo de gordura corporal. A principal delas é que a obesidade, está associada a um estado de inflamação crônica, podendo contribuir para o desenvolvimento de diversas complicações metabólicas (Lumeng e Saltiel, 2011). O estado inflamatório existente na obesidade induz uma superprodução de espécies reativas de oxigênio, as quais danificam estruturas celulares e podem culminar no desenvolvimento dessas comorbidades (Carey et al., 1997; Bellou et al., 2016).

Outro ponto importante é o balanço energético, que é a relação entre a ingestão de calorias adquiridas através da ingestão de alimentação e o gasto energético através de atividade física, funções fisiológicas e metabolismo basal. Quando a ingestão de calorias excede o gasto energético, ocorre um excesso de energia que é armazenado na forma de gordura (Hill et al., 2003). O acúmulo de gordura no tecido adiposo é um aspecto fundamental da fisiologia da obesidade pois a regulação desse metabolismo, envolve hormônios como a insulina, leptina e adiponectina, causando resistência à insulina (Hotamisligil, 2006).

A influência do sistema nervoso central, em particular o hipotálamo, desempenha a função de regular o apetite e o consumo de alimentos. Estudos mostram que os mecanismos neurais envolvidos na regulação do apetite e como eles podem estar disfuncionais na obesidade. A fisiologia da obesidade também é influenciada pela genética e epigenética. A herança genética desempenha um papel na predisposição à obesidade, enquanto as modificações epigenéticas podem afetar a expressão gênica relacionada ao metabolismo (Loos, 2012).

Além disso, a obesidade associada ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) também está relacionada ao metabolismo prejudicado dos adipócitos, resultando em lipólise excessiva e conseqüente aumento nos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e produção e secreção excessivas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-6. Acredita-se que esse aumento inflamatório seja originário de macrófagos de tecido adiposo ativado e, assim, o metabolismo aberrante do tecido adiposo no DM2 contribui diretamente para a resistência à insulina nos tecidos-alvo através de um aumento no acúmulo de lipídios ou indiretamente através da interrupção mediada por citocinas da cascata de sinalização da insulina no fígado e no músculo esquelético (Wellen e Hotamisligil, 2005). O aumento do tecido adiposo, tem efeitos pleiotrópicos nos eventos endócrinos e metabólicos, o que pode contribuir para a patogênese das comorbidades associadas à obesidade (Singla, 2010).

A resistência à insulina, descrita como o principal elo entre a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2, é uma condição na qual os tecidos periféricos alvo, tais como o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, têm uma resposta subnormal aos níveis de insulina circulante, resultando em menor efeito fisiológico desse hormônio, destacando menor captação da glicose. Estudos científicos nas últimas décadas trouxeram grande avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na instalação da resistência insulínica associada à obesidade, especialmente a secreção e ação exacerbadas de mediadores inflamatórios (Tateya et al., 2013). Deste modo, os hormônios secretados pelo tecido adiposo interferem na homeostase energética, no metabolismo lipídico e da glicose, na homeostase vascular, na resposta imune e nas funções reprodutivas.

O diagnóstico da obesidade é realizado por meio da avaliação do índice de massa corporal (IMC) e da circunferência da cintura, sendo esses, os parâmetros mais utilizados. O IMC é calculado dividindo o peso corporal (em quilogramas) pela altura ao quadrado (em metros) e o valor resultante é um índice que classifica a pessoa em diferentes categorias, incluindo baixo peso, peso normal, sobrepeso e obesidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um IMC igual ou superior a 30. O IMC é amplamente utilizado como uma ferramenta de triagem para a obesidade (OMS, 2021).

A medição da circunferência da cintura é outra ferramenta importante no diagnóstico da obesidade, uma vez que fornece informações sobre a distribuição de gordura corporal, sendo os pontos de corte para a circunferência da cintura variam,

mas a OMS define valores de risco aumentado em 94 cm para homens e 80 cm para mulheres. O acúmulo de gordura na região abdominal e gordura visceral estão associados a um maior risco de problemas de saúde (OMS, 2021).

1.3. INSTABILIDADE GENÔMICA NA OBESIDADE

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na investigação da instabilidade genômica como um fator subjacente à obesidade, sugerindo que as alterações no DNA e nos mecanismos epigenéticos desempenham um papel fundamental. Este conceito é respaldado por pesquisas recentes, como o estudo de Martínez et al. (2014), que destacou as conexões entre a obesidade e as modificações epigenéticas.

A instabilidade genômica refere-se a mudanças indesejadas e instáveis no genoma de um organismo, podendo ser resultado de danos ao DNA, erros na replicação do DNA ou alterações epigenéticas que afetam a expressão gênica. A integridade do genoma é fundamental para a regulação do metabolismo, o controle do apetite e a homeostase energética. Estudos de pesquisa mostram que a instabilidade genômica pode predispor indivíduos à obesidade (Yang et al., 2016).

Além disso, a epigenética, que controla modificações químicas no DNA que regulam a expressão gênica, também está emergindo como um ponto crucial de investigação. O estudo de Barres et al. (2013), identificou mudanças epigenéticas associadas à obesidade que podem ter implicações importantes na regulação metabólica, podem ser multifatoriais e incluir fatores genéticos, ambientais e comportamentais.

As mutações genéticas são um fator que pode predispor indivíduos à obesidade, principalmente mutações em genes que regulam o apetite, o metabolismo e o armazenamento de gordura podem desempenhar um papel na instabilidade genômica associada à obesidade (Loos, 2012). As modificações químicas no DNA e nas histonas (proteínas que ajudam a compactar o DNA) podem afetar a regulação da expressão gênica. Estudos sugerem que alterações epigenéticas podem estar envolvidas no desenvolvimento da obesidade (Barres et al., 2013). Por outro lado, o estresse oxidativo, resultante de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo em neutralizá-las, pode também causar danos ao DNA

e contribuir para a instabilidade genômica (Bastard et al., 2006). As inflamações crônicas, por contribuírem para um estado inflamatório crônico de baixo grau, podem desencadear alterações genômicas que afetam a resposta do organismo à obesidade (Lumeng e Saltiel, 2011).

Esses mecanismos de instabilidade genômica podem resultar em disfunções metabólicas, desregulação do apetite, resistência à insulina e outras alterações que contribuem para a obesidade. Além disso, a instabilidade genômica na obesidade pode estar relacionada a um risco aumentado de comorbidades, como diabetes tipo 2, doenças cardíacas e câncer (Freitas et al., 2014).

Além disso, os diversos mecanismos fisiológicos no diabetes, que são a principal comorbidade na obesidade, podem desencadear diversos outros mecanismos que contribuem para o aumento de dano ao DNA (Al-Aubaidy e Jelinek, 2011; Shimizu et al., 2016). A hiperglicemia induz a formação de radicais livres através da ativação da via do poli-ol, glicação de proteínas, lipídeos e ácidos graxos. Assim o DNA passa a ser frequentemente danificado, causando quebras nos filamentos e modificações nas bases nitrogenadas. Dessa forma os biomarcadores de dano ao DNA são importantes na elucidação da fisiopatologia e na avaliação das complicações e comorbidades associadas à obesidade (Broedbaek et al., 2013).

Francisconi et al. (2014) investigaram o surgimento de danos no DNA de camundongos submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica por 24 semanas. Eles observaram que esses animais apresentaram maior dano no DNA no tecido hepático em relação ao grupo controle que recebeu apenas dieta padrão, avaliado através do Ensaio Cometa. Ainda, no estudo de White et al. (2013), utilizou-se a dieta hiperlipídica para indução de obesidade e diabetes em ratos *Swiss* machos, concluindo que esse tipo de dieta favoreceu o desenvolvimento da resistência à ação da insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia, sugerindo uma exaustão das células β pancreáticas.

O fígado, sendo um dos principais órgãos relacionados ao metabolismo dos lipídeos, pode estar relacionado ao aumento do ambiente pró-oxidante devido à ingestão de lipídeos pela dieta, e assim levar à genotoxicidade neste tecido. Este ambiente pró-oxidante é observado devido ao aumento da produção de espécies reativas que podem causar o aumento nos danos no DNA. As lesões no DNA podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos, ou pela indução de quebras em uma das cadeias do que pode levar a mutações (Berra et al., 2006). Vale salientar também

que a hiperglicemia exerce uma grande influência no aumento do estresse oxidativo e danos no DNA (Silva et al., 2021).

Fagundes et al. (2019) observaram através do ensaio cometa que pacientes com diabetes e obesidade, possuem um aumento de dano ao DNA e que a intervenção com vitamina D3 foi capaz de diminuir a genotoxicidade. Ainda, (Macan et al., 2022) observaram também um aumento de dano ao DNA em sangue de pacientes com diabetes, sendo diminuído quando consumido a castanha do Brasil, fonte de selênio. Dessa forma, buscar alternativas que melhore a instabilidade genômica é essencial para melhor qualidade de vida dos pacientes.

1.4. DIETA HIPERLIPÍDICA (DH)

Para estudar a obesidade em modelos animais, empregamos a indução por meio de dietas que replicam o padrão alimentar da população humana contemporânea, visando gerar resultados que possam potencialmente contribuir para a redução dos problemas relacionados à obesidade na população.

Em todo o mundo, o consumo excessivo de gordura e/ou açúcar tem aumentado consideravelmente, assim acredita-se que dietas ricas em gorduras palatáveis levam a distúrbios metabólicos, como a obesidade. Além disso, a dieta hiperlipídica é uma ferramenta que corrobora para estudar os mecanismos subjacentes à obesidade e suas comorbidades, bem como para avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas (Silva et al., 2021).

Assim, em modelo animal de obesidade, destaca-se a dieta hiperlipídica, que tem alto poder calórico e de gordura, sendo altamente palatável pelos camundongos. No trabalho de Silva et al. (2021), foram utilizados um modelo animal de dieta hiperlipídica para avaliar alterações de parâmetros comportamentais e cerebrais. Ainda, acredita-se que uma dieta rica em gordura pode alterar o perfil glicêmico e levar à genotoxicidade em camundongos *Swiss* machos, uma vez que são palatáveis e estimulam o consumo alimentar dos animais (Leffa et al., 2014).

Em uma pesquisa, investigaram os efeitos de uma dieta hiperlipídica no ganho de peso e na regulação do apetite em camundongos. Eles observaram que a exposição a uma dieta hiperlipídica levou a um aumento significativo no ganho de peso e a alterações na expressão de genes relacionados ao apetite. Em outro estudo,

investigaram os efeitos da obesidade induzida por dieta na função metabólica e demonstraram que a dieta hiperlipídica levou a disfunções no metabolismo de glicose e insulina, contribuindo para a resistência à insulina (Buettner et al., 2007).

O consumo de dietas hiperlipídicas (DH) é capaz de ativar vias inflamatórias, aumentando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias em tecidos periféricos e centrais, elevando o estresse oxidativo por aumento da produção EROs nesses mesmos tecidos (Furukawa et al., 2004; Yang et al., 2010; Feillet-Coudray et al., 2019). Com o aumento das EROs, há interação com as macromoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA. Acredita-se que a interação das EROs no DNA esteja envolvida no rompimento de pontes de hidrogênio entre duas hélices, na quebra de uma ou das duas cadeias (fitas) de DNA e na formação de ligações cruzadas entre moléculas de DNA e proteínas. Todas estas alterações, direta ou indiretamente, influenciam a expressão gênica que pode levar a distúrbios no metabolismo e ao desenvolvimento de doenças (Berra et al., 2006). Dessa forma, a DH é considerada uma dieta eficaz para um modelo animal, a fim de estudar os mecanismos na instabilidade genômica.

1.5. A EVOLUÇÃO DOS HIPOGLICEMIANTES E SEUS EFEITOS NA PERDA DE PESO

Por todas as complicações que a obesidade causa, surge a necessidade urgente de desenvolvimento e implementação de novas medidas preventivas e estratégias de tratamento para combater o aumento e a prevalência em todo o mundo, pois as consequências não só acometem o sistema público de saúde, mas também geram consequências econômicas marcantes; sejam porque as despesas com o tratamento da obesidade estão aumentando devido às suas complicações a longo prazo e/ou pelo surgimento de opções mais modernas e com preços mais elevados no tratamento medicamentoso (Rizza, 2010).

Hipoglicemiantes são medicamentos usados para tratar a hiperglicemia (aumento do nível de glicose no sangue) em pessoas com diabetes. Alguns desses medicamentos podem ter um impacto na perda de peso, embora o efeito possa variar dependendo do medicamento e das características individuais. No estudo publicado

na revista "*Diabetes Care*," pesquisadores conduziram um ensaio clínico com pacientes com pré-diabetes e descobriram que a metformina estava associada a uma perda de peso significativa e redução na incidência de diabetes (Knowle et al., 2002).

Bayliss e Starling (1902), descreveram pela primeira vez a conexão entre o pâncreas, o intestino e os hormônios incretinas no início do século XX. O GLP-1 é um hormônio produzido no trato gastrointestinal em resposta à ingestão de alimentos, e desempenha um papel importante na regulação do apetite e do metabolismo e quando o hormônio incretina, peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) mostrou ser responsável por até 70% da secreção de insulina em resposta à ingestão de nutrientes, se considerou o seu potencial como alvo terapêutico no diabetes tipo 2 e consequente perda de peso, podendo tratar a obesidade. Os agonistas do receptor de GLP-1 (glicoproteína semelhante ao peptídeo 1) são conhecidos por chamar a atenção pela sua capacidade de induzir a perda de peso em algumas pessoas, seja pela supressão do apetite ou retardo do esvaziamento gástrico que mantém a saciedade por maior tempo (Chacra, 2006).

Desenvolvidos a princípio para tratamento do diabetes e prescritos como "*off-label*" para o tratamento da obesidade, os análogos do GLP-1 podem ser usados a longo prazo, ou até mesmo de forma contínua (Gomes e Trevisan, 2021). O uso *off label* de medicamentos nada mais é do que a utilização de um fármaco para condições diferentes para o qual o mesmo foi desenvolvido e inicialmente aprovado para uso (Guimaraes et al., 2021).

Desde então, várias abordagens têm sido usadas para estender a meia-vida do GLP-1 nativo, várias das quais resultaram em agentes farmacológicos que são eficazes no tratamento da obesidade, sendo as terapias baseadas em GLP-1 um avanço significativo no tratamento.

1.6. FARMACOLOGIA DA LIRAGLUTIDA

A liraglutida é um análogo de GLP1, sendo amplamente utilizada para o tratamento da obesidade e do DM2. Ele foi o primeiro fármaco com ação do GLP-1RA de ação prolongada a se tornar disponível para o tratamento de DM2 e obesidade, recebendo autorização de comercialização em 2009. Os análogos do GLP-1 são drogas potencialmente promissoras para perda de peso em adultos obesos ou com sobrepeso e pelo menos uma comorbidade. Eles atuam também promovendo a perda

de peso corporal; a supressão da liberação de glucagon; a desaceleração do esvaziamento gástrico; a melhora a sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, maior sociabilidade e redução do consumo de alimentos (Barros et al., 2021).

O GLP1 é um hormônio liberado pelas células L enteroendócrinas, com múltiplas ações: estimula a secreção de insulina de maneira glicose-dependente, inibe a secreção de glucagon e o débito hepático de glicose, retarda o esvaziamento gástrico, provoca saciedade, melhora a sensibilidade periférica à insulina, com estímulo à cardioproteção e neuroproteção. Fisiologicamente, o GLP1 é rapidamente degradado pela enzima DPP4, por isso, vêm sendo desenvolvidos análogos do GLP1 resistentes à degradação pela DPP4, denominados análogos do receptor do GLP1 (GLP1RA) (Cuevas Fernández et al., 2021). É uma substância sintética que apresenta 97% de homologia com seu análogo, o GLP-1 (Lopes et al., 2020).

Estudos anteriores demonstraram que a liraglutida, numa dose de 3 mg por dia, pode melhorar significativamente os níveis de glicemia e perda de peso, comparada a outros análogos GLP-1. Além disso, identificou-se que a liraglutida possui efeito neuroprotetor sobre os nervos e a cognição (Buse et al., 2009; Hölscher, 2012). Os GLP-1RAs de ação prolongada têm menos efeito no esvaziamento gástrico e nas excursões pós-prandiais da glicose, mas um efeito mais pronunciado na glicemia de jejum e na perda de peso, diferente dos GLP-1RA de ação curta que são administrados antes de uma refeição e têm um efeito maior no esvaziamento gástrico e na glicose pós-prandial, principalmente após a refeição (Lautenbach et al., 2022).

Os estudos clínicos realizados no Japão, têm demonstrado a eficácia da monoterapia da liraglutida para a perda de peso e conseqüentemente para o controle do DM2 (Zhao et al., 2014). Somado a isso, um estudo revelou que o tratamento com liraglutida reduziu áreas de gordura visceral e subcutânea abdominal (Garber et al., 2009; Nauck et al., 2009). Portanto, a liraglutida pode ser um novo agente promissor para o tratamento de DM tipo 2 e obesidade, que estão associadas a um alto risco de doenças cardiovasculares (Inoue et al., 2011).

Investigações intensivas mostraram um grande perfil de efeitos metabólicos benéficos da liraglutida em modelos animais. Liu et al. (2019), mostraram que a liraglutida pode regular positivamente a produção do fator de crescimento de fibroblastos hepáticos 21 (FGF21) em modelo animal em camundongos. Em camundongos tratados com dieta rica em gordura (DH), o tratamento diário com liraglutida (300 mg/kg de peso corporal), por 3 semanas resultou em FGF21 hepático elevado e a

expressão de genes relacionados ao metabolismo e tecidos adiposos foram beneficiados. Neste estudo concluiu-se que os 3 grupos experimentais mostraram expressão elevada de genes que codificam piruvato desidrogenase quinase 4, enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase associada a concentrações reduzidas de triglicérides no plasma. Importante ressaltar que a redução de peso corporal nos ratos, também foi observada.

No entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos na genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que há poucos estudos avaliando a sua segurança no DNA. Estudos recentes mostraram que tratamentos com a liraglutida levaram à inibição da proliferação celular e diminuição do risco de câncer de próstata, mama e pâncreas (Ligumsky et al., 2012; Zhao et al., 2014).

Por isso, o uso do fármaco vem sendo cada vez mais testado em neoplasias malignas, em virtude dos mecanismos moleculares de algumas patologias apresentarem semelhanças entre as vias utilizadas pelas células tumorais no desenvolvimento do câncer (Gupta et al., 2002; Würth et al., 2016).

Segundo Oliveira et al. (2020), que avaliou o efeito da liraglutida em células de ratos submetidas a dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e os resultados indicaram que a liraglutida foi capaz de reduzir o dano ao DNA nessas células. Neste mesmo estudo, a liraglutida se mostrou capaz de reduzir significativamente o dano oxidativo no DNA das células AGS tratadas com peróxido de hidrogênio. Além disso, a liraglutida foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase e descobriram que ela ativou a via de sinalização PI3K/Akt, que é conhecida por ter um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo (Oliveira et al., 2020).

Em outro estudo, investigaram o efeito da liraglutida em células humanas expostas a radiação ionizante. Na pesquisa, as células humanas foram pré-tratadas com a liraglutida antes da exposição à radiação ionizante e os resultados mostraram que o pré-tratamento com liraglutida reduziu significativamente o dano ao DNA nessas células e diminuiu a taxa de apoptose induzida pela radiação (Battino et al., 2019).

E ainda, Yin et al. (2018), com achados *in vitro* e *in vivo* sugeriram que o agonista do receptor de GLP-1, liraglutida, diminui o dano renal induzido por hiperglicemia, reduzindo a proliferação de células mesangiais, albuminúria, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias. Mostrou uma expressiva redução do estresse oxidativo com

uso da liraglutida em pacientes com DM2 independente do efeito redutor da glicose. Além disso, um GLP-1 humano recombinante inibiu a proteína quinase C (PKC)- γ , mas aumentou a proteína quinase A (PKA), reduzindo o estresse oxidativo nos glomérulos e túbulos em ratos diabéticos induzidos por streptozotocin (STZ).

Embora esses estudos sugiram que a liraglutida pode ter um efeito protetivo no dano ao DNA, é importante destacar, que mais pesquisas são necessárias para confirmar e elucidar os mecanismos envolvidos nesse efeito em diferentes tecidos.

1.7. JUSTIFICATIVA

Sendo a obesidade uma epidemia global de saúde, que representa uma ameaça significativa para a qualidade de vida e o bem-estar da população em todo o mundo e sendo um fator de risco para uma série de comorbidades graves, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardíacas, hipertensão, doenças hepáticas, distúrbios respiratórios e até certos tipos de câncer, vê-se a urgência em buscar por abordagens mais eficazes para o tratamento da obesidade.

A crescente prevalência da obesidade e suas ramificações para a saúde pública exigem a investigação de intervenções terapêuticas inovadoras e a liraglutida representa uma promissora linha de pesquisa nesse contexto. A liraglutida é um agonista do receptor do GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), uma medicação aprovada para o tratamento do diabetes tipo 2. Além de sua eficácia no controle glicêmico, a liraglutida tem demonstrado benefícios adicionais na perda de peso em pacientes com ou sem diabetes. Esses efeitos de perda de peso se tornaram um foco de interesse considerável no contexto da obesidade.

Diversos estudos clínicos e experimentais têm sugerido que a liraglutida pode ser uma opção de tratamento promissor para a obesidade, especialmente quando outras intervenções não produzem resultados satisfatórios. Essa medicação atua reduzindo o apetite, promovendo a sensação de saciedade e desacelerando o esvaziamento gástrico, o que, por sua vez, pode levar à redução do consumo calórico e à perda de peso.

Além disso, a liraglutida também parece influenciar positivamente nos fatores de risco metabólico associados à obesidade, como resistência à insulina e dislipidemia. Esses benefícios potenciais fazem da liraglutida um candidato interessante para o tratamento da obesidade e suas comorbidades. Ainda a liraglutida, conforme

diversos artigos, tem o poder de ação para diminuir esses eventos genotóxicos, porém, necessitando de mais experimentos para avaliar o efeito protetor na instabilidade genômica, gerada através do modelo animal de obesidade, no consumo de uma DH.

Portanto, um estudo sobre obesidade e liraglutida se justifica plenamente, pois pode fornecer dados valiosos sobre a eficácia e a segurança dessa medicação no tratamento da obesidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da liraglutida na instabilidade genômica em camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o consumo alimentar e peso corporal dos camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica e tratados com liraglutida;
- Avaliar a genotoxicidade através do ensaio cometa em sangue total periférico e fígado de camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica e tratados com liraglutida;
- Investigar o efeito mutagênico na medula óssea de camundongos *Swiss* tratados com dieta hiperlipídica e tratados com liraglutida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com o protocolo 58/2022 (anexo A). Os animais foram obtidos do Centro de Experimentação Animal (CEA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense e alojados em caixas de polietileno, com comida e água controlada e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro (07:00 às 19:00) (claro 7:00h), com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. O tamanho amostral deste projeto foi de 24 animais de camundongos *Swiss* machos entre 40 e 60 dias de vida. Os animais foram distribuídos randomicamente nas caixas conforme a dieta ofertada (dieta padrão ou DH).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos entre 40 e 60 dias de vida, divididos em 4 grupos experimentais.

- Grupo 1 (Controle, n = 6): receberam dieta padrão do biotério e salina (0,9%) via subcutânea;
- Grupo 2 (Dieta Hiperlipídica, n = 6): receberam dieta hiperlipídica e salina (0,9%) via subcutânea;
- Grupo 3 (Liraglutida, n = 6): receberam dieta padrão do biotério e liraglutida dose 0,15 mg/kg via subcutânea;
- Grupo 4 (Dieta Hiperlipídica + liraglutida, n = 6): receberam dieta hiperlipídica e liraglutida 0,15 mg/kg via subcutânea.

O experimento teve duração de 20 semanas, onde foi dividido em duas etapas (Figura 1):

Etapa 1: A primeira etapa teve duração de 16 semanas para indução do modelo animal de obesidade através do consumo de dieta hiperlipídica, onde durante esse período os animais receberam dieta hiperlipídica ou dieta padrão do biotério,

conforme os grupos citados anteriormente. Durante esse período foi controlado o consumo alimentar, através da quantidade inicial e final da ração ofertada. Além disso, os animais foram pesados no final do experimento.

Etapa 2: Nessa etapa, as dietas continuaram sendo fornecidas livremente por mais 4 semanas, junto com a liraglutida (0,15 mg/kg) que também foi administrada diariamente por 4 semanas. Os animais seguiram com a dieta e tratamento por um total de 20 semanas. Os animais foram submetidos a eutanásia para as avaliações de genotoxicidade e mutagenicidade através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos.

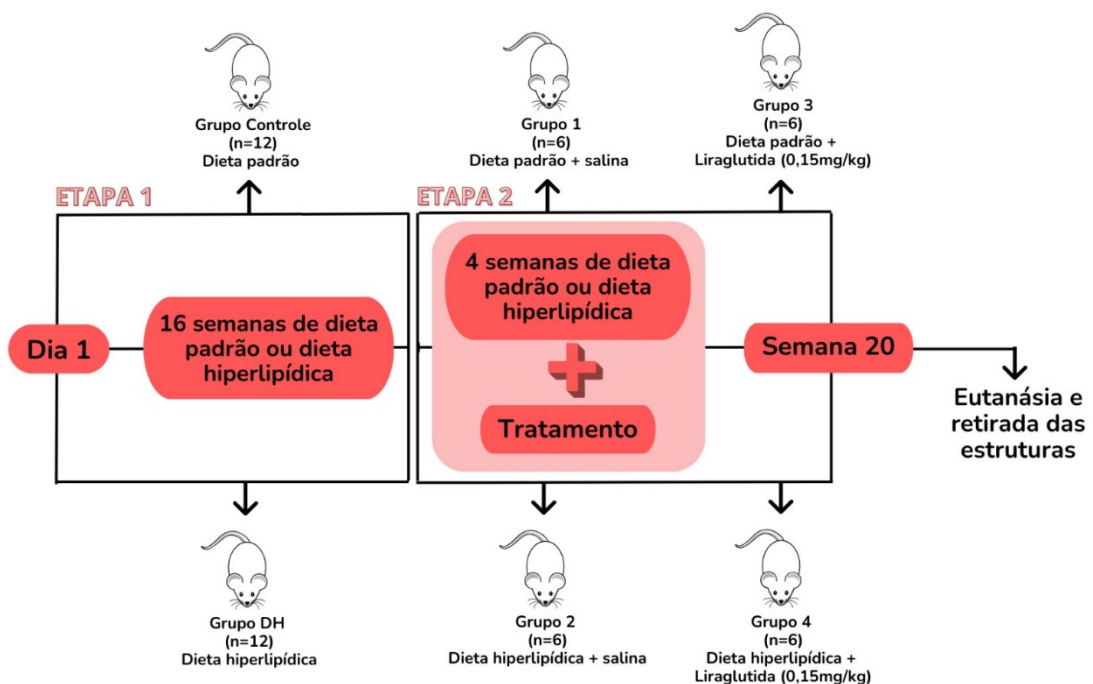


Figura 1. Desenho experimental. Fonte: Autores (2023).

O início do experimento se deu quando os animais atingiram entre 40 e 60 dias de idade. Logo, foi iniciado o fornecimento da dieta hiperlipídica por 12 semanas. Após as 16 semanas, os animais continuaram recebendo por mais 4 semanas a dieta hiperlipídica, junto com o tratamento com a liraglutida. Os animais foram pesados duas vezes por semana.

Na 20ª semana após início do experimento, os animais sofreram eutanásia por decapitação. No momento da eutanásia, foram coletados novamente amostras de sangue para a realização do ensaio cometa. No mesmo dia da eutanásia foi realizada a dissecação do fígado e medula óssea para o ensaio cometa e teste de micronúcleos.

3.3. TRATAMENTOS

3.3.1. Dieta hiperlipídica

Os animais receberam via oral de forma livre durante 16 semanas a dieta hiperlipídica. Estas dosagens e o tempo de tratamento foram escolhidas de acordo com dados descritos previamente na literatura (Silva et al., 2021). A dieta padrão foi adquirida de Puro Trato Nutrição Animal (cat. Puro Lab 22PB) Santo Augusto, RS, Brasil (calorias provenientes de 50% carboidratos [amido e açúcares], 27% proteínas e 23% lipídeos [gordura animal e óleo de soja], totalizando 3,3 kcal/g). A aquisição da dieta hiperlipídica foi de PragSoluções Biociência, Jaú, SP, Brasil (calorias provenientes de 26% carboidratos [amido de milho e sacarose], 15% proteínas e 59% lipídeos [óleo de soja e banha], totalizando 5,3 kcal/g).

3.3.2. Liraglutida

A liraglutida foi administrada via subcutânea nos animais durante 4 semanas, na dose de 0,15 mg/kg. Estas dosagens e o tempo de tratamento foram escolhidas de acordo com dados descritos previamente na literatura (Liu et al., 2022).

3.4. PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados no final do tratamento. O consumo alimentar foi calculado semanalmente, pela pesagem da quantidade total de alimentos (g) fornecida aos animais e subtraindo a comida (g) e líquidos (mL) do remanescente na gaiola, sendo feita uma média do consumo alimentar por caixa e animal (Diniz et al., 2004, 2005).

3.5. ENSAIO COMETA

O Ensaio Cometa ocorreu sob condições alcalinas, conforme descrito por Collins et al. (2023). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de fígado foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com

o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5 μL) e as células obtidas da dissociação do fígado (alíquotas de 10 μL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 μL ou 110 μL , respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta posteriormente com uma lamínula e levada, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em solução alcalina (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos para desenovelamento do DNA, seguido de eletroforese a ~1V/cm por aproximadamente 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado Sybr Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise.

Para avaliação dos danos, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa Comet Assay IV, onde foram avaliadas 100 células/animal. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do *tail length* (consiste na distância do meio do núcleo até o final da cauda em μm) e *tail moment* (*tail length* x intensidade da fluorescência da cauda), através do *Tail Intensity* (%).

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas codificadas para análise às cegas.

3.6. TESTE DE MICRONÚCLEOS (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000). O mesmo seguiu o protocolo sob número 474 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (a "OCDE"), atualizado em 2016. Sendo

aceito e frequentemente revisado por agências internacionais e comitês de harmonização (OCDE, 2016).

Para a realização do teste foi realizada a extração da medula óssea. Após a extração, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC), foi analisada em 500 eritrócitos/animal. A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 4000 EPCs para cada animal (ou seja, 2000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Foi analisado as variáveis quanto a normalidade da distribuição usando o teste de Bartlett's. Foi utilizado teste de variância de uma via (ANOVA) com *post hoc* de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P forem menores que 0,05 ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. CONSUMO ALIMENTAR E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados no final do experimento conforme os tratamentos alimentares, ou seja, dieta padrão e dieta hiperlipídica (Tabela 1).

Tabela 1. Consumo alimentar e peso corporal de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida.

Tratamento	Ração (g)	Calorias (kcal/dia)	Peso Corporal (g)
Controle	54,71 ± 2,77	182,0 ± 10,77	32,23 ± 2,50
Dieta Hiperlipídica (DH)	29,64 ± 2,15*	207,2 ± 13,68*	36,05 ± 2,28*

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média (n = 6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (test-t, p<0,05).

Na tabela 1, observamos através do consumo alimentar em gramas que o grupo controle teve uma ingesta maior em relação ao DH. No entanto, ao avaliar o consumo calórico foi observado que a dieta hiperlipídica teve maior ingestão de calorias em relação ao grupo controle. Em relação ao peso corporal, observou-se um aumento no grupo DH em relação ao grupo controle.

4.2. ENSAIO COMETA

Na figura 2, foram expressos os dados referentes ao ensaio cometa no sangue total periférico através do *Tail Intensity* (0-100%). Observou-se um aumento de danos em DNA no grupo da dieta hiperlipídica (DH), liraglutida e na dieta hiperlipídica com uso da liraglutida em relação ao grupo controle.

Na figura 3, foram expressos os dados referentes ao ensaio cometa no fígado e podemos constatar que houve um aumento de danos em DNA no grupo que consumiu a dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com liraglutida.

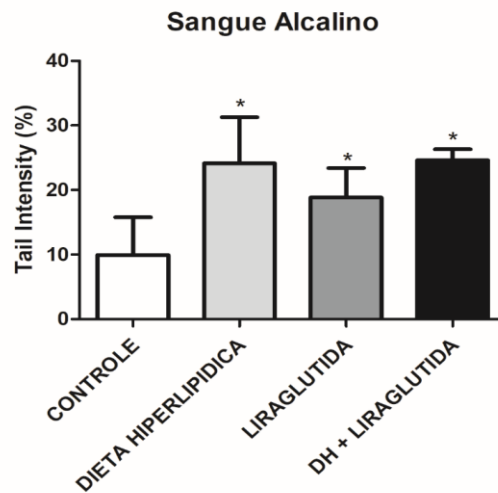


Figura 2. *Tail Intensity* (%) de células de sangue total periférico de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média (n = 6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

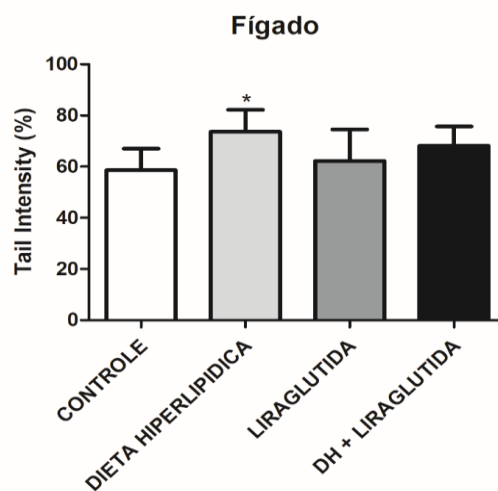


Figura 3. *Tail Intensity* (%) de células de fígado camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média (n = 6 animais por grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey).

4.3. TESTE DE MICRONÚCLEOS

Na tabela 2, podemos observar o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPC/Mn) para avaliar possíveis efeitos mutagênicos causadas pela dieta hiperlipídica e pelo uso da liraglutida.

Tabela 2. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos que receberam dieta hiperlipídica e/ou liraglutida

Tratamento	EPCMn	EPC/ENC
Controle	2,72 ± 0,78	0,52 ± 0,02
Dieta Hiperlipídica (DH)	3,20 ± 2,77	0,52 ± 0,02
Liraglutida	3,00 ± 2,07	0,52 ± 0,06
DH + Liraglutida	3,0 ± 1,67	0,55 ± 0,02

Foram analisadas 4000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n = 6 animais por grupo). Não houve diferença significativa.

Não houve diferença em relação ao número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Em relação à proporção EPC/ENC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade.

5. DISCUSSÃO

A relação entre a dieta hiperlipídica e a instabilidade genômica é um tema relevante e comumente utilizados em experimentos usando ratos, a fim de observar os efeitos de diversos tratamentos e mecanismos que avaliam a reversão do dano em DNA nos animais que receberam DH. As dietas ricas em gordura, principalmente as gorduras saturadas e ácidos graxos livres, têm sido associadas a vários mecanismos que podem levar à instabilidade genômica (Cabeço et al., 2010).

No atual experimento, podemos observar que a ingesta calórica foi maior nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, quando comparados com os grupos que receberam dieta padrão. A ingestão alimentar em gramas foi menor nos grupos que receberam dieta hiperlipídica.

A DH afeta significativamente o ganho de peso corporal devido aumento da ingesta calórica/dia (Yin et al., 2018). Estudo descrito por Sampey et al. (2011), compara o impacto de uma dieta de cafeteria, que inclui uma variedade de alimentos ricos em gordura e açúcar, com uma dieta hiperlipídica tradicional em ratos. Os resultados revelam que ambas são eficazes para o ganho de peso e a inflamação hepática e adiposa.

No atual estudo, foi observado um ganho de peso menor do que o relatado em estudos anteriores, porém devemos levar em consideração que este parâmetro quando associado ao índice de adiposidade e percentual de gordura para as avaliações das condições de saúde podem complementar a classificação de obesidade. A obesidade sendo uma condição caracterizada pelo acúmulo maciço de tecido adiposo, tem como padrão ouro, a avaliação da composição corporal/ índice de adiposidade, como principal diagnóstico (Wanderley e Ferreira, 2010).

É importante ressaltar que dietas hiperlipídicas são caracterizadas por uma alta proporção de calorias provenientes de gorduras, em comparação com carboidratos e proteínas. A densidade calórica pode variar dependendo da composição específica da dieta, que em geral tem uma alta densidade calórica devido à concentração de gorduras. Portanto, quando uma dieta é rica em gordura, ela naturalmente terá uma alta densidade calórica e isso significa que uma pequena quantidade de alimentos ricos em gordura pode fornecer um grande número de calorias. Essa alta densidade calórica das dietas hiperlipídicas pode contribuir para o ganho de peso, uma vez

que uma maior ingestão de calorias do que o corpo requer, leva ao acúmulo de gordura. Além disso, dietas hiperlipídicas podem estar associadas a problemas de saúde, como obesidade, doenças cardiovasculares e resistência à insulina (Freitas et al., 2014).

Quanto ao ensaio cometa feito no sangue, foram expressos os dados referentes à versão alcalina no sangue e podemos constatar que houve um aumento de danos em DNA, tanto no grupo da dieta hiperlipídica (DH), no grupo que usou a liraglutida e no grupo dieta hiperlipídica com uso da liraglutida no tratamento, havendo um aumento de dano significativo em relação ao grupo controle, ou seja, podemos notar que a própria liraglutida foi causadora de dano, tanto quanto a DH. A de se considerar que estudos que avaliam o impacto da liraglutida no dano ao DNA são poucos, comparado com diversos que já comprovam sua eficácia no tratamento do diabetes e na gestão do peso.

Quanto a abordagem sobre a relação entre a dieta hiperlipídica e o dano ao DNA, essa é complexa e envolve vários fatores. Dietas ricas em gordura, especialmente gorduras saturadas, podem desencadear uma série de mecanismos que contribuem para o dano ao DNA. Isso inclui o aumento do estresse oxidativo, a inflamação crônica, alterações no metabolismo lipídico, desregulação do sistema antioxidante e efeitos diretos sobre órgãos como o fígado. Além disso, os componentes da dieta hiperlipídica podem afetar a expressão de genes e a composição da microbiota intestinal, influenciando indiretamente a integridade do DNA. Esses fatores podem aumentar o risco de condições relacionadas à dieta, como câncer e doenças cardiovasculares (Yang et al., 2016).

Por ser uma medicação nova no mercado e os experimentos envolvendo danos em DNA ainda serem muito poucos, é importante haver mais experimentos nesta temática para o uso mais seguro da medicação, bem como usufruir de todos os benefícios e ter consentimentos dos efeitos colaterais.

Analisando o ensaio cometa no fígado, constatamos um aumento de danos em DNA no grupo que consumiu a dieta hiperlipídica, em relação ao grupo controle. Danos no DNA no fígado de ratos que consumiram uma dieta hiperlipídica é comumente visto em vários relatos, uma vez que o fígado desempenha um papel central no metabolismo lipídico e no processamento de gorduras (Oliveira, 2020).

A dieta hiperlipídica, caracterizada por um alto teor de gorduras na alimentação, tem sido associada a danos no fígado, incluindo esteatose hepática não alcoólica, inflamação e fibrose. Os mecanismos subjacentes a essa relação incluem o acúmulo de gordura no fígado, que sobrecarrega as células hepáticas, causando inflamação, causando um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no fígado e estresse oxidativo. Além disso, a disfunção mitocondrial e o acúmulo de lipídios em macrófagos hepáticos contribuem para o dano hepático (Browning e Horton, 2004).

Silva et al. (2020), investigaram os efeitos de uma dieta hiperlipídica e o fígado de ratos. Os ratos foram divididos em dois grupos, um grupo de controle que recebeu uma dieta padrão e um grupo experimental que recebeu uma dieta hiperlipídica rica em gorduras saturadas e colesterol. Os ratos foram alimentados com suas respectivas dietas por 12 semanas e os resultados revelaram que os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo nos níveis de gordura hepática, indicando o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica. Além disso, os ratos do grupo da dieta hiperlipídica mostraram evidências de inflamação hepática, como aumento nos marcadores de inflamação, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no fígado. O dano ao DNA nas células hepáticas foi avaliado utilizando um ensaio cometa alcalino. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo na extensão da cauda do cometa, indicando danos no DNA nas células do fígado dos ratos que receberam a dieta hiperlipídica. Podemos ver através da figura, que a liraglutida não apresentou diferença significativa, causando danos ao DNA, tanto quanto os ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica.

Para avaliar o efeito mutagênico utilizamos o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, que é um indicador comumente usados em estudos de genotoxicidade e é capaz de refletir danos ao material genético das células, podendo ser usado também para avaliar a eficácia de medidas de proteção, como antioxidantes, que têm como objetivo reduzir o dano genético causado por agentes genotóxicos. Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos mutagênicos causadas pela dieta hiperlipídica e pelo uso da liraglutida, constatou-se neste experimento que não houve diferença em relação ao número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos e em relação à proporção EPC/ENC, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade.

A relação entre dieta hiperlipídica e genotoxicidade tem sido amplamente investigada, pois em geral, as dietas hiperlipídicas podem estar associadas ao aumento do número de micronúcleos, sugerindo potenciais efeitos genotóxicos. No entanto, é importante notar que os resultados podem variar dependendo das condições experimentais, da composição da dieta hiperlipídica, do tempo de exposição e das características dos modelos animais utilizados (Pacheco-Martínez et al., 2016).

Até o momento, há poucos estudos que tenham apresentado resultados demonstrando a mutagenicidade. A pesquisa nessa área tem sido limitada e, em grande parte, tem destacado a presença dessas estruturas celulares em contextos variados. Santos (2017) avaliou a mutagenicidade dos efeitos da farinha de bocaiuva em fígados e intestinos de ratos *Wistar* tratados com DH (21 dias). Foi realizado o teste de micronúcleos e não observaram diferenças significativas no número de micronúcleo. Chaves (2016) avaliou a mutagenicidade dos efeitos da inalação do pó de carvão mineral em animais obesos e não obesos, sendo os animais obesos induzidos por DH (28 dias). No teste de micronúcleo não foi observado diferenças significativas no número de micronúcleos, em ambos os grupos de animais, corroborando com os nossos resultados. Assim sugerimos que um tempo maior de tratamento com DH poderia aumentar o número de MN, uma vez que a alimentação teria uma ação indireta e crônica, diferente de um fármaco como o metilmetanosulfonato (MMS), agente sabidamente genotóxico e mutagênico (Damiani et al., 2022).

No entanto, no ensaio cometa observa-se que a DH pode levar a genotoxicidade, como observado no trabalho de Luciano et al. (2021) que avaliou em camundongos obesos (obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica de 4 meses) o efeito do uso do gengibre (*Zingiber officinale*). Foi observado que a DH foi genotóxica no sangue e levou ao aumento de citocinas pró-inflamatórias nos fígados dos camundongos com obesidade através da DH.

É fundamental ressaltar que a detecção de micronúcleos é de grande importância na avaliação de danos genéticos e na compreensão de riscos associados a fatores ambientais e exposições a agentes genotóxicos. Portanto, a realização de pesquisas abrangentes que abordem tanto a presença quanto a ausência de micronúcleos é crucial para uma compreensão completa dos efeitos potenciais desses fatores. Estudos adicionais que se aprofundem nessa investigação são necessários para preencher essa lacuna de conhecimento.

A obesidade por si só, é um fator que favorece um ambiente mutagênico endógeno na ausência de uma exposição evidente a mutagênicos exógenos. Também é plausível que o excesso de ingestão calórica de gorduras na dieta utilizada neste estudo, seja genotóxico e mutagênico. As gorduras são macronutrientes dietéticos importantes e necessários, mas sob condições de ingestão excessiva, é possível que o aumento da peroxidação lipídica e o metabolismo excessivo dos ácidos graxos através da oxidação ou por enzimas metabólicas aumentem o conteúdo sistêmico de intermediários genotóxicos. Assim, a genotoxicidade associada a dietas hiperlipídicas e a obesidade são áreas de pesquisa em evolução, que geram implicações para a saúde humana e a compreensão dos efeitos da dieta na integridade do DNA (Pacheco-Martínez et al., 2016).

Assim, a obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, incluindo vários tipos de câncer e que ocorrem devido a produção de metabólitos reativos endógenos, estresse oxidativo sistêmico e/ou inflamação sistêmica uma dieta rica em gordura e calorias que induzem a obesidade. A obesidade também pode aumentar a sensibilidade a agentes mutagênicos e cancerígenos ambientais e outros fatores interajam para aumentar o risco de câncer (Jeffery et al., 2006).

Em resumo, os resultados deste estudo demonstram que a dieta hiperlipídica e o uso de liraglutida podem afetar a integridade genômica, evidenciando a complexa relação entre alimentação, saúde e danos ao DNA. A obesidade e o consumo excessivo de gorduras desempenham um papel fundamental nesse processo, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para compreender plenamente essas interações e seus impactos na saúde humana com as intervenções utilizadas.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a dieta hiperlipídica levou aumento de consumo calórico e ganho de peso dos animais. Em relação a genotoxicidade observamos que a DH pode levar a genotoxicidade no sangue e fígado. No sangue, observamos um aumento de danos ao DNA no grupo tratado com liraglutida + salina e com DH. No entanto, não observamos mutagenicidade. Dessa forma, com essa pesquisa, observamos que a liraglutida na dose utilizada pode levar a instabilidade genômica em camundongos tratados com DH.

Dada a complexidade dos resultados, é fundamental conduzir estudos adicionais, especialmente para explorar as diferentes doses de liraglutida, a fim de obter uma imagem mais completa dos potenciais riscos à saúde. A pesquisa contínua será fundamental para esclarecer ainda mais as implicações desses resultados e para garantir a segurança dos pacientes que utilizam a liraglutida como parte de seu tratamento na instabilidade genômica.

REFERÊNCIAS

Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*. 2011;164(6):899–904.

Association, American Diabetes (ADA). 1. Improving Care and Promoting Health in Populations: *Standards of Medical Care in Diabetes — 2020*. *Diabetes Care*. 2020;43(Supplement_1):S7–13.

Banco Mundial. Relatório sobre o Desenvolvimento Mundial 2022. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/publication/wdr2022>

Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, Näslund E, Zierath JR. Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation. *Cell Reports*. 2013;3(4):1020–7.

Barros M, Meirelles S, Rodrigues A, Terra M. Ação da incretina GLP-1 e perspectivas para a redução da incidência de obesidade. *Revista Transformar*; 2021;

Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):4–12.

Battino M, Forbes-Hernández TY, Gasparrini M, Afrin S, Cianciosi D, Zhang J, Manna PP, Reboredo-Rodríguez P, Varela Lopez A, Quiles JL, Mezzetti B, Bompadre S, Xiao J, Giampieri F. Relevance of functional foods in the Mediterranean diet: the role of olive oil, berries and honey in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(6):893–920.

Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of Physiology*. 1902;28(5):325–53.

Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JPA. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2016;23:1–9.

Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quím Nova*. 2006;29(6):1340–4.

Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5·24 million UK adults. *The Lancet*. 2014;384(9945):755–65.

Biggs ML, Mukamal KJ, Luchsinger JA, Ix JH, Carnethon MR, Newman AB, De Boer IH, Strotmeyer ES, Mozaffarian D, Siscovick DS. Association Between Adiposity in Midlife and Older Age and Risk of Diabetes in Older Adults. *JAMA*. 2010;303(24):2504.

Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, Jimenez-Solem E, Hansen LJ, Henriksen JE, Bonnema SJ, De Fine Olivarius N,

Poulsen HE. Association Between Urinary Markers of Nucleic Acid Oxidation and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(3):669–76.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114(2):147–52.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*. 2007;15(4):798–808.

Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, Zychma M, Blonde L. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *The Lancet*. 2009;374(9683):39–47.

Cabeço LC, Akiba M, Calsa MS, Sartori DRDS, Vicentini-Paulino MDLM, Pinheiro DF. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. *Rev Nutr*. 2010;23(3):417–24.

Campolina AG, Dini PS, Ciconelli RM. Impacto da doença crônica na qualidade de vida de idosos da comunidade em São Paulo (SP, Brasil). *Ciênc saúde coletiva*. 2011;16(6):2919–25.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willet WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body Fat Distribution and Risk of Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus in Women: The Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*. 1997;145(7):614–9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The State of Aging and Health in America Atlanta: National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division of Population Health; 2013.

Chacra AR. Efeito fisiológico das incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine*; 2006;613–7.

Chaves P. Efeito da inalação de pó de carvão nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em ratos obesos. 2016.

Collins A, Møller P, Gajski G, Vodenková S, Abdulwahed A, Anderson D, Bankoglu EE, Bonassi S, Boutet-Robinet E, Brunborg G, Chao C, Cooke MS, Costa C, Costa S, Dhawan A, De Lapuente J, Bo' CD, Dubus J, Dusinska M, Duthie SJ, Yamani NE, Engelward B, Gaivão I, Giovannelli L, Godschalk R, Guilherme S, Gutzkow KB, Habas K, Hernández A, Herrero O, Isidori M, Jha AN, Knasmüller S, Kooter IM, Koppen G, Kruszewski M, Ladeira C, Laffon B, Larramendy M, Hégarat LL, Lewies A, Lewinska A, Liwszyc GE, De Cerain AL, Manjanatha M, Marcos R, Milić M, De Andrade VM, Moretti M, Muruzabal D, Novak M, Oliveira R, Olsen A-K, Owiti N, Pacheco M, Pandey AK, Pfuhrer S, Pourrut B, Reisinger K, Rojas E, Rundén-Pran E, Sanz-Serrano J, Shaposhnikov S, Sipinen V, Smeets K, Stopper H, Teixeira JP, Valdiglesias V, Valverde M, Van Acker F, Van Schooten F-J, Vasquez M, Wentzel JF, Wnuk M, Wouters A, Žegura B, Zikmund T, Langie SAS, Azqueta A. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc*. 2023;18(3):929–89.

- Cuevas Fernández FJ, García Marrero MR, Iglesias Girón MJ, Pérez De Armas AA, Cerdeña Rodríguez E, Cabrera León A, Aguirre-Jaime A. Efectividad de la ratio TG/c-HDL en la mejora de la prescripción de GLP-1 en pacientes con diabetes tipo 2 en atención primaria. *Medicina de Familia SEMERGEN*. 2021;47(8):521–30.
- Dall TM, Yang W, Halder P, Pang B, Massoudi M, Wintfeld N, Semilla AP, Franz J, Hogan PF. The Economic Burden of Elevated Blood Glucose Levels in 2012: Diagnosed and Undiagnosed Diabetes, Gestational Diabetes Mellitus, and Prediabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(12):3172–9.
- Damiani AP, Magenis ML, Dagostin LS, Beretta ÂCDL, Sarter RJ, Longaretti LM, Monteiro IDO, Andrade VMD. Royal jelly reduce DNA damage induced by alkylating agent in mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2022;825:111796.
- Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli ELB. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2005;21(6):749–55.
- Diniz YS, Fernandes AAH, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42(2):313–9.
- Fagundes GE, Macan TP, Rohr P, Damiani AP, Da Rocha FR, Pereira M, Longaretti LM, Vilela TC, Ceretta LB, Mendes C, Silveira PCL, Teixeira JPF, De Andrade VM. Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. *Mutagenesis*. 2019;34(2):135–45.
- Feillet-Coudray C, Fouret G, Vigor C, Bonafos B, Jover B, Blachnio-Zabielska A, Rieusset J, Casas F, Gaillet S, Landrier JF, Durand T, Coudray C. Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat/High-Fructose Diet. *Lipids*. 2019;54(1):81–97.
- Francisconi V, Montagner GFFS, Fiorin PBG, Salomon B, Ludwig MS, Heck TG. Consumo de dieta hiperlipídica induz dano no DNA hepático de camundongos. XII Seminário de Iniciação Científica. Programa de Pós Graduação em Saúde Integrada, Unij.; 2014;
- Freitas, M C, Ceschini, F L, Ramallo, B T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. 2014. *Bras. Ci. e Mov.*; 2014;
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752–61.
- Garber A, Henry R, Ratner R, Garcia-Hernandez PA, Rodriguez-Pattzi H, Olvera-Alvarez I, Hale PM, Zdravkovic M, Bode B. Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *The Lancet*. 2009;373(9662):473–81.

Gomes H, Trevisan M. O uso do ozempic (semaglutida) como medicamento off label no tratamento da obesidade e como auxiliar na perda de peso. *Revista Artigos.*; 2021;

Guimaraes CR, Sousa EFDS, Pinto RR. Riscos e benefícios do uso de off label de medicamentos: Revisão de literatura / Risks and benefits of the use of off label of medicines: Literature review. *BJDV.* 2021;7(11):104149–57.

Gupta K, Krishnaswamy G, Karnad A, Peiris AN. Insulin: A Novel Factor in Carcinogenesis. *The American Journal of the Medical Sciences.* 2002;323(3):140–5.

Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the Environment: Where Do We Go from Here? *Science.* 2003;299(5608):853–5.

Hölscher C. Potential Role of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in Neuroprotection: *CNS Drugs.* 2012;26(10):871–82.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860–7.

Inoue K, Maeda N, Kashine S, Fujishima Y, Kozawa J, Hiuge-Shimizu A, Okita K, Imagawa A, Funahashi T, Shimomura I. Short-term effects of liraglutide on visceral fat adiposity, appetite, and food preference: a pilot study of obese Japanese patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10(1):109.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Findings from the Global Burden of Disease Study 2017. 2017.

International Diabetes Federation (IDF). *Diabetes Atlas. Diabetes Atlas 2021 – 10th edition.* Disponível em: https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf

Jeffery RW, Baxter J, McGuire M, Linde J. Are fast food restaurants an environmental risk factor for obesity? *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2006;3(1):2.

Knowle WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med.* 2002;346(6):393–403.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2000;455(1–2):155–66.

Lautenbach A, Wernecke M, Huber TB, Stoll F, Wagner J, Meyhöfer SM, Meyhöfer S, Aberle J. The Potential of Semaglutide Once-Weekly in Patients Without Type 2 Diabetes with Weight Regain or Insufficient Weight Loss After Bariatric Surgery—a Retrospective Analysis. *OBES SURG.* 2022;32(10):3280–8.

Leffa DD, Da Silva J, Daumann F, Dajori ALF, Longaretti LM, Damiani AP, De Lira F, Campos F, Ferraz ADBF, Côrrea DS, De Andrade VM. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters

- in mice fed on a high-fat diet. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;770:144–52.
- Ligumsky H, Wolf I, Israeli S, Haimsohn M, Ferber S, Karasik A, Kaufman B, Rubinek T. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(2):449–61.
- Liu J, Yang K, Yang J, Xiao W, Le Y, Yu F, Gu L, Lang S, Tian Q, Jin T, Wei R, Hong T. Liver-derived fibroblast growth factor 21 mediates effects of glucagon-like peptide-1 in attenuating hepatic glucose output. *EBioMedicine*. 2019;41:73–84.
- Loos RJJ. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;26(2):211–26.
- Lopes G, Pullig E, Netto G, Matos I, Ribeiro J, Oliveira. Liraglutida e outros análogos do glp-1: nova perspectiva no tratamento do sobrepeso e obesidade. *Revista Atenas Higeia*; 2020;
- Luciano TF, De Souza CT, Pinho RA, Marques SDO, Luiz GP, Tramontin NDS, Silveira PCLD, De Andrade VM, Muller AP. Effects of *Zingiber officinale* extract supplementation on metabolic and genotoxic parameters in diet-induced obesity in mice. *Br J Nutr*. 2021;126(7):970–81.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111–7.
- Macan TP, De Amorim TA, Damiani AP, Beretta ÂCDL, Magenis ML, Vilela TC, Teixeira JP, Andrade VMD. Brazil nut prevents oxidative DNA damage in type 2 diabetes patients. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022;45(3):1066–72.
- Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalinske KL. Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. *Advances in Nutrition*. 2014;5(1):71–81.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1990;239(1):29–80.
- Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção*. 2017.
- Nauck M, Frid A, Hermansen K, Shah NS, Tankova T, Mitha IH, Zdravkovic M, Düring M, Matthews DR, for the LEAD-2 Study Group. Efficacy and Safety Comparison of Liraglutide, Glimpiride, and Placebo, All in Combination With Metformin, in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(1):84–90.
- OCDE. *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. This Guideline was adopted by the OCDE. 2016.

Oliveira D. Bases moleculares e bioquímicas da patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por carboidratos simples: foco na reprogramação epigenética e no metabolismo lipídico hepático. [Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto]; 2020.

Oliveira DTD, Fernandes IDC, Sousa GGD, Santos TAPD, Paiva NCND, Carneiro CM, Evangelista EA, Barboza NR, Guerra-Sá R. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in ad libitum -fed rats irrespective of caloric intake. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2020;64(1):71–81.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Obesidade e sobrepeso. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Pacheco-Martínez MM, Cortés-Barberena E, Cervantes-Ríos E, Del Carmen García-Rodríguez M, Rodríguez-Cruz L, Ortiz-Muñoz R. Moderate malnutrition in rats induces somatic gene mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2016;789:26–32.

Poblete-Aro C, Russell-Guzmán J, Parra P, Soto-Muñoz M, Villegas-González B, Co-fré-Bola-Dos C, Herrera-Valenzuela T. Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev méd Chile*. 2018;146(3):362–72.

Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*. 2012;70(1):3–21.

Rizza RA. Pathogenesis of Fasting and Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: Implications for Therapy. *Diabetes*. 2010;59(11):2697–707.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemergen AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*. 2011;19(6):1109–17.

Shimizu T, Kitajima A, Nonaka K, Yoshioka T, Ohta S, Goto S, Toyoda A, Fujiyama A, Mochizuki T, Nagasaki H, Kaminuma E, Nakamura Y. Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes. Fang DD, organizador. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166969.

Silva CB, Fassini PG, Ramalho LNZ, Da Conceição EC, Zordan AJCM, Carlos D, Suen VMM. Curcuma supplementation in high-fat-fed C57BL/6 mice: no beneficial effect on lipid and glucose profile or prevention of weight gain. *Eur J Nutr*. 2020;59(1):93–102.

Silva LRB, Gentil P, Seguro CS, De Oliveira GT, Silva MS, Zamunér AR, Beltrame T, Rebelo ACS. High Fasting Glycemia Predicts Impairment of Cardiac Autonomic Control in Adults With Type 2 Diabetes: A Case-Control Study. *Front Endocrinol*. 2021;12:760292.

Singla P. Metabolic effects of obesity: A review. *WJD*. 2010;1(3):76.

Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent Advances in Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol*. 2013;4.

Wanderley EN, Ferreira VA. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciênc saúde coletiva*. 2010;15(1):185–94.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111–9.

White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, R. Neto JMD, Marçal AC, Machado UF, Camargo EA, Santos MRV, Brito LC. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(5):339–45.

Würth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discovery Today*. 2016;21(1):190–9.

Yang JL, Liu DX, Jiang H, Pan F, Ho CS, Ho RC. The Effects of High-fat-diet Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress on Depression-like Behavior and Leptin/LepRb in Male Rats. *Sci Rep*. 2016;6(1):35239.

Yang X, Ko GTC, So WY, Ma RCW, Yu LWL, Kong APS, Zhao H, Chow C-C, Tong PCY, Chan JCN. Associations of Hyperglycemia and Insulin Usage With the Risk of Cancer in Type 2 Diabetes: The Hong Kong Diabetes Registry. *Diabetes*. 2010;59(5):1254–60.

Yin W, Xu S, Wang Z, Liu H, Peng L, Fang Q, Deng T, Zhang W, Lou J. Recombinant human GLP-1(rhGLP-1) alleviating renal tubulointestinal injury in diabetic STZ-induced rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;495(1):793–800.

Zhao H, Wang L, Wei R, Xiu D, Tao M, Ke J, Liu Y, Yang J, Hong T. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits tumorigenicity and metastasis of human pancreatic cancer cells via PI3K /Akt pathway. *Diabetes Obesity Metabolism*. 2014;16(9):850–60.

ANEXO

ANEXO A – CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **04/10/2022**.

Titulo do projeto	Efeitos da liraglutida sobre parâmetros de comportamento, inflamação e estresse oxidativo em cérebro de camundongos Swiss submetidos a um modelo animal de dieta para indução de diabetes
Project title	Effects of liraglutide on behavior, inflammation and oxidative stress in brain of Swiss mice submitted to an animal model of diet for induction of diabetes
Número do protocolo Protocol number	58/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	Emilio Luiz Streck
Pesquisadores Researchers	Adriani Paganini Damiani, Alex Paulo Zeferino Padilha, Carla de Oliveira Bauer, Beatriz da Costa Chade, Galon Alves Rodrigues, Carolina Glassl Alano, Catharina de Bem Ribeiro, Fernanda Daminelli Eugenio, Isabela da Silva Lemos, Isadora de Oliveira Monteiro, Isadora Luciano Machado, João Vitor Antunes de Lima, Lara Resendes Cichella, Larissa Raupp Maciel, Laura Schmitt Quinsari, Laura Uggioni Elibio, Letícia Zanatta Alberton, Lívia Simoni Maccari, Ludmila Quelroz Oliveira, Maria Eduarda Carlos Martins, Maria Eduarda Mendes Botelho, Marina Lummerz Magenis, Micaela Rabelo Quadra, Monique Cardoso André, Natália Colombo Bonassi, Natália Maciel Andrade, Nicolay Serafim Martinello, Nicollas dos Santos da Silva, Otávio Lúcio Possamai, Rafael Orestes Canarim, Rafaela Tezza Matiola, Rejane de Figueiredo Seidenreich, Thaine Possamai, Thiago Amorim Cunha do Nascimento, Schellen de Córdova Kindermann, Vanessa Moraes de Andrade, Vitória Alexandre Costa, Wanessa de Favéri.
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/10/2022 a 10/10/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / Swiss
Idade/Peso	60 dias /30-35g
Número de animais	Masculino 64
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 04 de outubro de 2022

Josiane Buchni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA