

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE MEDICINA

DANILO MALMONGE BARBOSA LUCIANO

Influência do análogo de GLP-1 na musculatura esquelética de ratos tratados agudamente com doxorrubicina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu 2023

DANILO MALMONGE BARBOSA LUCIANO

Influência do análogo de GLP-1 na musculatura esquelética de ratos tratados agudamente com doxorrubicina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Cínica Médica.

Orientadora: Prof.ª Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Luciano, Danilo Malmonge Barbosa. Influência do análogo de GLP-1 na musculatura esquelética de ratos tratados agudamente com doxorrubicina / Danilo Malmonge Barbosa Luciano. - Botucatu, 2022 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu Orientador: Bertha Furlan Polegato Capes: 40101002 1. Doxorrubicina. 2. Estresse oxidativo. 3. Mitocôndria. 4. Músculo esquelético.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	

RESUMO

A Doxorrubicina é um quimioterápico altamente efetivo no tratamento de tumores hematológicos e sólidos. No entanto, apresenta efeitos colaterais no sistema cardíaco e na musculatura esquelética, condição resultante de inúmeras alterações, dentre elas, o aumento do estresse oxidativo, da inflamação e disfunções mitocondriais. Análogos de GLP-1 podem prevenir a degeneração muscular, atenuar a inflamação, modular o metabolismo e reduzir a atrofia muscular. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da administração análogo de GLP-1 liraglutida na musculatura esquelética de ratos tratados agudamente com doxorrubicina. Para isso, foram utilizados 60 ratos Wistar machos, divididos em 4 grupos com 15 animais cada: Controle (C), Doxorrubicina (D), administração de liraglutida (análogo de GLP-1) (LG) e Doxorrubicina + administração de liraglutida (DLG). Os grupos LG e DL receberam liraglutida 0,6mg/kg, subcutâneo, diariamente por 14 dias, e os grupos C e D receberam soro fisiológico. Após 12 dias, os grupos D e DLG receberam injeção intraperitoneal de doxorrubicina 20mg/kg, dose única, e os grupos C e LG receberam soro fisiológico. Após 48 horas da injeção de doxorrubicina, os animais foram submetidos à eutanásia e foram coletados músculo sóleo e gastrocnêmio (porção branca e vermelha). Foram avaliados na musculatura esquelética o estresse oxidativo, e quantificação das proteínas Sirt1, PGC1-α e PPARr (envolvidas na biogênese mitocondrial), e também NF-kB, GLUT-4 e Troponina T por Western blot. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via e foi considerado o nível de significância estatística de 5%. Observamos menor ingestão de ração e ganho de peso nos animais que receberam liraglutida. Após a injeção de doxorrubicina, os animais que receberam o quimioterápico também tiveram redução da ingestão de ração e do peso corporal. Em relação ao estresse oxidativo, os grupos D e DLG apresentaram maior atividade da catalase no tecido muscular quando comparados ao grupo C e o grupo DLG apresentou menor carbonilação proteica que o grupo C. Não observamos diferenças na expressão proteica de Sirt1, PGC1- α , PPAR γ , NF-kB, GLUT-4 e Troponina T, apesar de observarmos tendência de diminuição de troponina T no grupo D em relação aos outros grupos. Em conclusão, a doxorrubicina não foi capaz de aumentar o estresse oxidativo na musculatura esquelética periférica e não modificou a quantidade de proteínas relacionadas ao funcionamento mitocondrial em ratos tratados com o quimioterápico. Portanto, o efeito da liraglutida na atenuação do dano ao músculo periférico induzido pela doxorrubicina permanece por ser esclarecido.

Palavras-chave: doxorrubicina, análogo GLP-1, mitocôndria, músculo esquelético, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doxorubicin is a highly effective chemotherapeutic in the treatment of hematological and solid tumors. However, it has side effects on the cardiac system and skeletal muscles, a condition resulting from numerous changes, including increased oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction. GLP-1 analogues can prevent muscle degeneration, attenuate inflammation, modulate metabolism and reduce muscle atrophy. The aim of the study was to evaluate the influence of the administration of the GLP-1 analogue liraglutide in the skeletal muscles of rats acutely treated with doxorubicin. For this, 60 male Wistar rats were divided into 4 groups (15 rats each group): Control (C), Doxorubicin (D), administration of Liraglutide (LG) and Doxorubicin + administration of Liraglutide (DLG). LG and DL groups received liraglutide 0.6mg/kg, subcutaneously, daily for 14 days, and groups C and D received saline solution. After 12 days, groups D and DLG received intraperitoneal injection of doxorubicin 20mg/kg, single dose, and groups C and LG received saline solution. After 48 hours of doxorubicin injection, the animals were euthanized and soleus and gastrocnemius muscle (white and red portion) were collected. Oxidative stress and quantification of Sirt1, PGC1-α, PPAR_Y, NF-kB, GLUT-4 and Troponin T by Western blot were evaluated in skeletal muscle. The results were analyzed by oneway ANOVA and a statistical significance level of 5% was considered. We observed a decrease in chow intake and weight gain in the animals treated with liraglutide. After doxorubicin administration, animals that received the drug decreased body weight and chow ingestion too. Regarding oxidative stress, the D and DLG groups showed higher catalase activity in muscle tissue when compared to the C group and the DLG group showed less protein carbonylation than the C group. We did not observe differences in Sirt1, PGC1- α , PPAR_Y, NF-kB, GLUT-4 and Troponin T protein expression, although we observed a trend towards a decrease in troponin T in group D compared to the other groups. In conclusion, doxorubicin was not able to increase oxidative stress in peripheral skeletal muscles and did not modify the proteins related to mitochondrial functioning in rats treated with chemotherapy. Therefore, the effect of liraglutide in attenuating peripheral muscle damage induced by doxorubicin remains to be clarified.

Keywords: doxorubicin, GLP-1 analogue, mitochondria, skeletal muscle, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A incidência de casos de câncer no mundo vem aumentando progressivamente e, em 2022 ocorreram mais de 1 milhão de novos casos e mais de 600 mil mortes por câncer nos Estados Unidos (1,2).

Uma das modalidades terapêuticas para o importante número populacional afetado pelo câncer são os quimioterápicos, dentre eles os antracíclicos, como a doxorrubicina (DOX) (3) Essas drogas estão entre as mais eficazes para o tratamento de tumores hematológicos e sólidos, como pulmão e mama (4) e fazem parte da maioria dos esquemas quimioterápicos em crianças, estando presentes em, aproximadamente, 60% dos protocolos de tratamento nessa população (5).

A DOX originou-se do fungo *Streptomyces peucetius* e se compõe de um núcleo quinona tetracene e um açúcar daunosamina. Esse fármaco apresenta uma região hidrofílica e outra hidrofóbica permitindo que a mesma interaja com proteínas plasmáticas e com a membrana celular, além de serem anfotéricas, podendo reagir como ácido ou base. Essas características permitem a esse fármaco a atuação em vários locais do organismo (6).

A farmacocinética da DOX é qualificada pela abundante ligação da droga às proteínas e aos tecidos, sendo as concentrações teciduais superiores às concentrações plasmáticas (7) e é capaz de penetrar mais facilmente nas células com alta atividade de divisão (6).

Seu mecanismo de ação deve-se à intercalação na dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA), inibindo a atividade da topoisomerase II, com consequente inibição da síntese de DNA, indução de apoptose e redução da síntese de macromoléculas. Além disso, a DOX promove formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no decorrer de sua metabolização, promovendo dano direto ao DNA (6, 8). Infelizmente, a DOX não afeta somente células cancerígenas. Ela pode gerar danos ao sistema neural, hepático, renal, cardíaco e na musculatura esquelética periférica (9,10).

O músculo esquelético corresponde a, aproximadamente, 40% da massa corporal total em adultos jovens saudáveis e desempenha papel essencial na geração de força para a locomoção e respiração (11 – 13). O tecido muscular

esquelético é altamente vascularizado, inervado e composto por células musculares voluntárias. É considerado, também, um órgão endócrino e parácrino devido a ação das miocinas, proteínas que medeiam interações entre tecido muscular esquelético e demais órgãos, como o tecido adiposo, fígado, pâncreas e o sistema cardiovascular (14).

Além disso, a musculatura esquelética participa de mecanismos metabólicos e regulatórios, contribuindo de forma eficiente para a produção energética e homeostase celular. Portanto, é essencial que a musculatura esquelética funcione de forma precisa e coordenada, pois qualquer agressão a este tecido pode resultar em perda da integridade e função muscular, assim como prejudicar o metabolismo energético e celular (15).

A perda ou lesão da musculatura esquelética, inicialmente, implica na redução considerável de peso corporal, associando-se à fragilidade e incapacidade física. Posteriormente, a perda progressiva e generalizada de massa muscular pode contribuir para doenças metabólicas como diabetes, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica e morte (14).

Na presença de doenças cardíacas, envelhecimento ou câncer, em que há reduções drásticas na musculatura esquelética, o declínio da saúde muscular não é apenas preditor de mortalidade, como também se associa à capacidade reduzida de responder à doença ou às terapias instituídas (16).

Dessa forma, compreender a fisiopatologia da lesão muscular induzida pela DOX e desenvolver estratégias para minimizar esse dano é de suma importância e pode contribuir para melhor qualidade de vida e prognóstico desses pacientes.

Os mecanismos envolvidos na toxicidade da musculatura esquelética induzida pela DOX envolvem alterações na estrutura do músculo, nas vias de sinalização intracelulares, nas vias de crescimento celular e síntese proteica, na apoptose e na estrutura e função mitocondriais (17, 18, 19).

Na presença de DOX há o aumento da ativação da calpaína-1 e caspase-3, que são proteases responsáveis por, respectivamente, promover atrofia muscular por clivagem de proteínas estruturais e degradação de proteínas miofibrilares intactas, resultando em proteólise (20, 18). Também há aumento expressivo de mRNA de REDD1, proteína que participa da atrofia muscular e redução da síntese proteica (21).

A ativação da via ubiquitina-proteossoma pode levar a aumento da proteólise muscular. As ligases E3 estão diretamente associadas a degradação de proteínas do tecido muscular esquelético e a DOX promove aumento da expressão gênica de ubiquitina ligase E3 (22, 23). A DOX também aumenta a expressão gênica de miostatina na musculatura, que leva à ativação de fatores de transcrição da família forkhead-box O (FOXO) e aumento de atrogina-1/MaFbx e MuRF-1, proteínas relacionadas com a diferenciação e regeneração das células musculares e com a proteólise (22). Também é possível observar aumento da autofagia e apoptose de miócitos esqueléticos na presença de DOX. Em condições normais, a proteína Beclin-1 forma um complexo com Bcl-2, porém, a proteína Bcl-2 libera Beclin-1 em situações de estresse para se ligar ao BNIP3, o que resulta em aumento de apoptose (22).

Adicionalmente, um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade tecidual gerada pela DOX é o aumento do estresse oxidativo (6, 24), que pode ser definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e a capacidade antioxidante do organismo (25). O aumento do estresse oxidativo pode mediar a atrofia muscular tanto diretamente quanto indiretamente. A lesão direta ocorre por dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídeos de membrana, mediado principalmente pelo fator nuclear kappa B (NF-κB). Indiretamente, a DOX pode modificar proteínas de sinalização de vias proteolíticas (26).

Uma das principais vias intracelulares de produção de EROs é o metabolismo mitocondrial (27). O próprio aumento do estresse oxidativo pode causar lesão e disfunção desta organela e ativar vias de sinalização proteolíticas, gerando ciclo vicioso de lesão (17). Como a musculatura esquelética tem alta densidade mitocondrial, ela constitui importante alvo para a toxicidade induzida pela DOX (24, 28).

Da mesma forma que ocorre em outros órgãos e tecidos, também na musculatura esquelética há alteração significativa da capacidade respiratória mitocondrial e aumento do desacoplamento fosforilativo, levando a aumento formação de EROs e comprometimento na geração de ATP e prejuízo no metabolismo celular (24, 29, 30).

Por ser uma organela dinâmica, a mitocôndria apresenta um ciclo denominado fusão e fissão, processos responsáveis pela conservação e regulação da atividade mitocondrial, apoptose, homeostase do cálcio e sobrevivência celular, o qual mantém a qualidade e integridade das mitocôndrias (31, 32).

O processo de fusão é ativado em condições de déficit energético ou situações de estresse. Tal processo é controlado por três proteínas: 1) Atrofia Ótica I (OPA1), que medeia a fusão da porção interna da membrana mitocondrial; 2) Mitofusina I (Mfn1); e 3) Mitofusina II (Mfn2), estando as duas últimas proteínas presentes na membrana externa mitocondrial mediando a fusão desta membrana. A fusão gera mitocôndrias com dimensões e capacidade metabólica superiores às mitocôndrias convencionais, o que favorece a redução da produção de EROs (32, 33).

De modo oposto, a fissão é promovida quando a célula é exposta a ambiente com excesso de nutrientes. Este processo é mediado pela Proteína 1 Relacionada com a Dinamina (Drp1) e Proteína de Fissão 1 (Fis1) (32). A interação destas resulta na divisão mitocondrial, sendo crucial também para a remoção de mitocôndrias danificadas (34).

O coativador de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 α (PGC1 α) é um coativador transcricional fundamental na regulação das funções mitocondriais e na manutenção da homeostase mitocondrial. A expressão de PGC1 α e Sirtuína1 (SIRT1) são diretamente afetadas com a presença de DOX, ocasionando dano mitocondrial (35 – 38).

Em condições fisiológicas, o metabolismo energético mitocondrial abrange reações anabólicas, que necessitam de ATP para a formação de moléculas mais complexas, e catabólicas, nas quais a produção de ATP é fundamental para o catabolismo de macromoléculas. Parte da energia obtida de processos catabólicos é utilizada para a obtenção de ATP, fundamental para contração muscular, processos secretórios de citocinas, funcionamento de bombas iônicas, entre outras funções. Para sua obtenção, utiliza-se aminoácidos, ácidos graxos e glicose, provenientes da alimentação (39).

A produção de ATP, definida como "respiração celular", é o resultado de três fases. A primeira é a formação de acetil-CoA a partir de piruvato e ácidos graxos. Na segunda fase, ocorre a quebra dos resíduos do acetil e liberação de

coenzimas reduzidas (NADH e FADH2) a partir do ciclo do ácido cítrico, ou ciclo de Krebs. Por fim, na terceira fase, ocorre a transferência dos elétrons para o oxigênio molecular pelo citocromo c, onde acontece a fosforilação do ADP em ATP mediada pela enzima ATP sintase (39).

Além disso, na presença de DOX, ocorre diminuição da expressão gênica de GLUT-4, aumento da concentração sérica de glicose, ácidos graxos e insulina e diminuição da sensibilidade à insulina, o que nos leva a crer que pode haver comprometimento da captação da glicose pela célula muscular (17, 40).

A DOX também favorece a redução da expressão de PPARγ, um fator de transcrição ativado por ligantes pertencentes à superfamília de receptores nucleares, que apresenta papel central contra a inflamação celular e toxicidade (41).

O glucagon-like peptide (GLP-1) é um hormônio peptídico de 30 aminoácidos da classe das incretinas, sintetizado e secretado pelas células L intestinais em períodos pós prandiais em decorrência do aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea (42). O efeito mais bem definido do GLP-1 é a melhora da absorção celular de glicose a partir do aumento da secreção de insulina mediada pelas proteínas G acopladas a receptores das células beta pancreáticas. Consequentemente, o GLP-1 resulta na redução da liberação de glucagon e retardo do esvaziamento gástrico (43, 44). As funções extra pancreáticas descritas do GLP-1 são alterações da motilidade intestinal e aumento da saciedade, o que torna o GLP-1 alvo de grande interesse clínico para tratamento de desordens metabólicas (45).

Nas últimas décadas foram desenvolvidas diversas medicações que tem efeito análogo ao do GLP-1 endógeno. Uma delas é a liraglutida. Em 2010, o uso da liraglutida no tratamento do Diabetes Mellitus tipo II foi aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA (46). Mais recentemente, essa classe de medicamentos tem mostrado benefícios adicionais ao controle glicêmico, como perda de peso, diminuição da progressão da doença renal e redução do risco cardiovascular (47, 48).

Em modelos experimentais de cardiotoxicidade induzida por DOX em ratos, a liraglutida mostrou-se eficiente na redução da troponina I e creatina quinase-MB, atenuou a atividade de superóxido dismutase, e de AMPK, IL-6,

TNF- α , TGF- β 1, Bcl-2 e de caspase-3, com redução da inflamação e necrose (49).

Os efeitos do GLP-1 na musculatura esquelética ainda não são bem esclarecidos. Em estudo utilizando modelo de atrofia muscular induzida por dexametasona em camundongos foi mostrado atenuação da atrofia muscular após a administração de GLP-1 na dosagem de 1mg/kg/semana durante 3 semanas (50). Adicionalmente, as incretinas exercem regulação positiva na expressão e translocação de GLUT-4, tanto no tecido cardíaco quanto no tecido muscular periférico em ratos espontaneamente hipertensos, favorecendo o metabolismo da glicose (51).

Como a inflamação mediada pela sinalização de NF-kB é fator de risco conhecido para o desenvolvimento da atrofia muscular em diversas situações de patológicas (18) e o GLP-1 possui ação anti-inflamatória em diferentes condições clínicas (52), o uso de GLP-1 poderia atuar preventivamente no processo atrófico da musculatura periférica (50).

Diante do exposto, elaboramos a hipótese de que a administração de análogo do GLP-1 atenuará as alterações na musculatura esquelética induzidas por doxorrubicina em ratos.

OBJETIVO

Avaliar os efeitos da administração de análogo de GLP-1 (liraglutida) no estresse oxidativo e na expressão de proteínas relacionadas à regulação mitocondrial no musculo sóleo e gastrocnêmio de ratos tratados agudamente com doxorrubicina.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O presente projeto utilizou amostras coletadas de projeto anteriormente aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA 1400/2021). Sucintamente, o delineamento do projeto principal foi o seguinte: os animais foram alocados aleatoriamente em 4 grupos, com 15 animais cada: Controle (C), Doxorrubicina (D), análogo de GLP-1 (LG) e doxorrubicina + análogo de GLP-1 (DLG). Os animais dos grupos L e DL receberam injeção subcutânea (SC) de liraglutida (análogo do GLP-1) 0,6mg/kg de peso e os grupos C e D receberam injeção SC de soro fisiológico 0,9% em volume equivalente, diariamente, por 14 dias. Após 12 dias, os animais dos grupos D e DL receberam injeção intraperitoneal (IP) de doxorrubicina 20 mg/kg de peso, dose única, e os grupos C e L receberam injeção IP de soro fisiológico 0,9% em volume equivalente. A dose de liraglutida foi baseada na equivalência à dose utilizada em humanos de 6,8mg em humanos (o dobro da dose terapêutica), calculada pela formula de Regan-Shaw (83). O tempo de 14 dias foi baseado em estudo de Taşkiran, et al. 2019 (84). Após 48 horas da injeção de doxorrubicina, todos os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de tiopental (120mg/kg, IP), seguida de decapitação (método secundário de eutanásia, que foi realizada após confirmação da total ausência de resposta do animal). O tórax e abdome foram abertos e coletados coração, intestinos, fígado, rins, testículos, epidídimo, músculos sóleo, gastrocnêmio, além de coleta de sangue (3-5ml). Os materiais biológicos estão armazenados em freezer a -80°C na Unipex-FMB. Para esse estudo, foram utilizados somente os músculos periféricos (sóleo e gastrocnêmio branco).

Estresse oxidativo

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase no músculo gastrocnêmio branco. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de malondialdeído e proteínas carboniladas no músculo gastrocnêmio branco. Amostras de 50mg de tecido foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado a 12000 rpm, por 30 minutos a -4°C. A concentração de proteínas totais (g/100g de tecido) foi determinada no sobrenadante. Todas as medidas foram realizadas por espectrofotometria.

- Malondialdeído (MDA): a concentração de MDA foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica. Em resumo, 250 µL de sobrenadante de tecido foram adicionados a 750 µL de ácido tricloroacético a 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm, durante 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ácido tiobarbitúrico (ATB) na proporção de 0,67% (1:1) e as amostras foram aquecidas por 15 minutos a 100°C. O MDA reage com ATB na proporção 1:2 (MDA:ATB). Após o resfriamento, a leitura a 535nm foi realizada no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de MDA foi obtida pelo coeficiente de extinção molar (1,56 x 105 M-1-cm-1) e a absorção das amostras e o resultado final relatado em nmol/g de proteína (53).
- Carbonilação de Proteínas: para a quantificação da carbonilação de proteínas foram utilizados 100 µL de homogenato para 100 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10mM em HCI 2M). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, 50 µL de hidróxido de sódio (NaOH 6M) foram adicionados e incubados novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura de 450 nm foi realizada no leitor de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram obtidos pelo coeficiente de extinção molar (22,000 M -1 cm -1) de DNPH e expresso em nmol/g de proteína. Os níveis de carbonilação de proteínas são expressos em nmol de DNPH/mg de proteína (53).

 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT): a atividade da SOD foi medida com base na inibição da reação do radical superóxido com pyrogalol, e os valores de absorbância foram medidos em 420 nm. Uma unidade de atividade da SOD (U) é definida como a quantidade da enzima que inibiu 50% da auto-oxidação do pyrogalol, e os resultados foram expressos em U/mg de proteína/minuto. A atividade de CAT foi avaliada seguindo a diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a absorbância foi medida em 240 nm. Os resultados foram expressos em picomol por miligrama de proteína (pmol/mg de proteína) (54).

Western blot

Foram quantificadas as proteínas Sirt1, PGC1-α e PPARx, envolvidos na biogênese mitocondrial. Avaliamos também as proteínas GLUT-4 e, NF-kB. Foram utilizadas amostras de músculo sóleo de 5 animais de cada grupo homogeneizadas com 500 µl de tampão de extração (Nacl 1M, Triton 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, Tris base, PIC 1%, Orvanadato de sódio 1%, NaF 1M-1%) no equipamento Bullet Blender Standard® (disrupt or homogenize cells and tissue BBX24, made in EUA), durante 5 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 4°C e 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. Para a quantificação da concentração proteica de cada amostra, foi realizado o método de Bradford utilizando a curva padrão de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

A seguir, as amostras foram submetidas à eletroforese. Para isso, foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β-mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 min. Foi utilizado sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e a corrida ocorreu a 4°C, na presença de tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%) em gel bifásico: de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 15 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do

gel de resolução variou de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína a ser estudada.

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Min -Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 min à temperatura ambiente sob constante agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos por 1,5 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodetecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare. A quantificação de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel-Pro Analyzer 32 (Media Cybernetics).

- GAPDH SC32233 LOTE k0315
- SIRT1 SC15404 LOTE c1414
- NFKB SC8008 LOTE j2318
- NFKB FOSFORILADO SC8008 LOTE J2318
- PPARγ SC7273 LOTE h0720
- PGC1α SC517380 LOTE a2918
- GLUT4 AB48547 LOTE 854344
- TROPONINA T– SC515899 LOTE B2420
- Anticorpo secundário AB6728 LOTE gr3383345-2

Análise estatística

Os dados foram avaliados em relação à distribuição normal utilizando o teste Shapiro-Wilk. Para a avaliação da ingestão de ração e peso corporal, utilizamos ANOVA de duas vias, com pós teste de Tukey. Quando houve significância estatística para a interação, foram comparados os grupos de interesse. Como o efeito da liraglutida na musculatura periférica não está completamente elucidado, primeiramente, realizamos comparação entre os grupos C e LG. Após não observarmos diferenças entre os dois grupos, optamos por comparar apenas os grupos C, D e DLG. Para isso, utilizamos ANOVA de 1 via ou ANOVA on Ranks com pós teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa SigmaPlot 14.0 e para todas as análises foi considerada significância estatística de 5%.

RESULTADOS

Peso corporal e consumo de ração dos animais

Em relação ao peso inicial não houve diferença entre os grupos. Os animais que receberam LIRA apresentaram redução do peso corporal e do consumo de ração ao longo do período experimental. Os animais que receberam DOX também apresentaram redução do peso corporal e do consumo de ração após a aplicação de DOX, conforme mostrado na Figura 1.



Figura 1. Consumo de ração e evolução do peso corporal dos animais

C: controle; D: doxorrubicina; LG: liraglutida; DLG: doxorrubicina + liraglutida. D1 e D3: média do consumo de ração diária entre o primeiro e o terceiro dia do experimento; D3 e D5: média do consumo de ração diária entre o terceiro e o quinto dia de experimento; D7 e D9: média de consumo de ração diária entre o sétimo e o nono dia de experimento; D12 e D14: média do consumo de ração entre o décimo segundo e o décimo quarto dia de experimento, que corresponde ao período após a injeção de doxorrubicina ou salina. Foi calculada a área sob a curva para cada animal e apresentada a média por grupo. O valor de p apresentado é referente à comparação entre a áreas sob as curvas. Valor de p : ANOVA de 2 vias. pi: valor de p da interação dox vs lira; p_{dox}: valor de p para o fator doxorrubicina; plira: valor de p grupo LG; \$ diferente do grupo D.

Efeitos do análogo de GLP-1 na musculatura saudável

Ao compararmos os animais que receberam apenas liraglutida com o grupo controle, não observamos qualquer diferença nas variáveis analisadas, exceto aumento do MDA no grupo LG em relação ao controle. Todos os resultados das comparações entre os dois grupos podem ser vistos no anexo 2. Com isso, concluímos que a liraglutida não causa nenhum efeito expressivo em músculos saudáveis, o que nos permitiu comparar apenas os grupos C, D e DLG, conforme apresentado abaixo.

Estresse Oxidativo no músculo gastrocnêmio branco dos animais

Ao avaliar o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio branco (tabela 1), não foi possível observar diferença estatisticamente significante na quantificação de malondialdeido total (MDA). Também não houve diferença na atividade da superóxido dismutase (SOD). No entanto, o grupo DLG apresentou menor valor de proteína carbonilada quando comparado com o grupo C. Apesar de numericamente inferior que os valores de grupo D, a diferença na carbonilação proteica não foi estatisticamente significante entre os grupos D e DLG. Em relação à atividade da catalase, os grupos D e DLG apresentaram maior valor quando comparado ao grupo C. Cabe ressaltar que o grupo DLG apresentou valor numericamente inferior ao grupo D, porém sem diferença estatisticamente significante.

Variável	C (n=5)	D (n=5)	DLG (n=5)	p
Carbonilação proteica (DNPH/mg proteína)	7,82 ± 3,71	5,00 ± 4,27	1,23 ± 0,40 *	0,025
Malondialdeido (nmol/mg proteína)	20,31 ± 10,56	17,21 ± 8,91	16,15 ± 3,49	0,932
Superóxido Dismutase (pmol/mg proteína)	10,91 ± 1,69	9,99 ± 0,45	9,90 ± 1,11	0,367
Catalase (pmol/mg proteína)	0,18 ± 0,31	1,15 ± 0,31 *	$0,66 \pm 0,34$ *	0,002

Tabela 1. Estresse Oxidativo no músculo gastrocnêmio branco dos animais

C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de 1 via. Nessa situação, foi considerado p<0,05 como significância estatística. * diferente do grupo C.

Quantificação proteica no músculo sóleo dos animais por Western Blot

Foram determinadas as expressões das proteínas do PPARγ, PGC1α, SIRT1, NF-κB Total, NF-κB Fosforilado, GLUT4 e Troponina T, conforme mostrado na tabela 3 e nas figuras 1 a 8. Não observamos diferença estatisticamente significante entre os grupos para toda as proteínas analisadas. Destacamos que, apesar de não estatisticamente significante, houve tendência de diminuição da troponina T no grupo D quando comparado aos outros grupos.

Variável	C (n=5)	D (n=5)	DLG (n=5)	р
ΡΡΑRγ	1,28 ± 0,59	1,01 ± 0,56	1,40 ± 0,97	0,470
PGC1α	0,69 ± 0,41	0,78 ± 0,57	0,38 ± 0,51	0,379
SIRT1	0,43 ± 0,35	0,55 ± 0,30	0,74 ± 0,34	0,714
NF-кВ Total	0,84 ± 0,16	0,57 ± 0,31	5,87 ± 7,34	0,151
NF-кВ Fosforilado	1,17 ± 1,10	0,32 ± 0,15	2,48 ± 1,19	0,125
Razão NF-кВ total/fosforilado	1,12 ± 0,57	1,85 ± 0,60	2,20 ± 2,36	0,386
GLUT4	1,95 ± 1,96	3,37 ± 2,96	3,26 ± 1,66	0,201
Troponina T	1,14 ± 0,58	0,30 ± 0,20	1,16 ± 0,87	0,079

Tabela 2. Expressão proteica no músculo sóleo dos animais por Western Blot

C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida; PPARy: proliferadores de peroxissoma gama; PGC1: coativador-gama ativado por proliferador de peroxissoma 1 alfa; SIRT1: sirtuína 1; NFkB: fator nuclear kappa B; GLUT4: transportador de glicose tipo 4. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.





K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.



K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística. Banda quantificada: superior.





K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.

Figura 4. SIRT1



K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.

D.G

Ď

10

5

0



Figura 6. NF-KB fosforilado

0

K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.

D.G

ò



K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.

ċ

D

<u>n</u>G



Figura 8. Troponina T

K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; DLG: doxorrubicina + liraglutida. Dados expressos em média ± desvio padrão em unidades arbitrárias. Valor de p: ANOVA de 1 via. Foi considerado valor de p<0,05 como significância estatística.

DISCUSSÃO

Diversos estudos abordam a toxicidade muscular ocasionada pela DOX e destacam a necessidade de terapias assertivas para esta condição (14, 16, 17) dada a importância da saúde e integridade do tecido muscular para pacientes oncológicos. Sabe-se que o GLP-1 apresenta efeitos benéficos contra a cardiotoxicidade ocasionada pela DOX (49), no entanto, seus efeitos na musculatura esquelética ainda não estão bem estabelecidos. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do GLP-1 na musculatura esquelética em ratos tratados com DOX.

A liraglutida, é comumente utilizada no tratamento de diabetes e obesidade (46), visto que seu mecanismo de ação envolve a redução do esvaziamento gástrico, aumento de saciedade e supressão da liberação de glucagon, contribuindo para a redução da ingestão alimentar e, consequentemente, redução de peso corporal (42, 55, 56).

Tal situação foi notada no presente estudo, em que os animais apresentaram redução do consumo de ração nos primeiros dias após a administração de liraglutida. Também foi possível observar perda de peso nos animais concomitantemente à redução da ingestão alimentar em decorrência da administração de liraglutida.

Pacientes que realizam terapia com DOX apresentam náuseas, vômitos, alteração do paladar e anorexia, o que resulta em perda de massa muscular e desidratação (57). Estes efeitos provavelmente ocorreram no presente estudo, uma vez que houve redução do consumo de ração e consequente perda de peso dos animais logo após a administração da DOX.

O estresse oxidativo apresenta papel central na toxicidade tecidual em decorrência da administração de DOX (6, 24, 30) e pode mediar a atrofia e o dano muscular (26). Diferentemente do esperado, não observamos aumento do MDA e da carbonilação de proteínas no músculo esquelético periférico em decorrência da administração de doxorrubicina.

O MDA é um subproduto gerado a partir da oxidação de lipídios das membranas celulares e sua concentração é utilizada para mensurar a peroxidação lipídica e aumento do estresse oxidativo, sendo um dos marcadores mais populares e confiáveis de estresse oxidativo (58). Embora diversos estudos apontem a capacidade da liraglutida em reduzir as concentrações de MDA (59, 60) em nosso estudo, não notamos diferença estatisticamente significante entre os grupos.

A carbonilação proteica é definida como a introdução de uma porção carbonil reativa em uma proteína, como um aldeído ou uma cetona, resultando na geração de radicais hidroxila altamente reativos (68). Por isso, é um importante marcador do estresse oxidativo. No presente estudo, observamos que os animais que receberam a liraglutida associada a DOX apresentaram redução da carbonilação quando comparados aos animais do grupo C. Enquanto o valor do grupo D foi intermediário entre o C e o DLG, porém sem diferença estatisticamente significante.

Em relação a atividade enzimática, sabemos que a DOX reduz a atividade da catalase e SOD (69 – 72). Em nosso estudo não observamos diferenças na atividade da SOD em nenhum dos grupos, entretanto houve aumento da atividade da catalase no grupo D quando comparado ao grupo C, assim como no grupo DLG quando comparado ao grupo C. Achados que corroboram outros estudos que mostram a capacidade antioxidante da liraglutida (84,85).

Outros estudos também observaram a capacidade da liraglutida em reduzir ou controlar o estresse oxidativo, porém em outros modelos animais e em outros tecidos, como o coração e fígado (84, 89).

O efeito da liraglutida na musculatura esquelética foi avaliada em três estudos segundo a nossa pesquisa (86 - 88), todos eles utilizando ratos diabéticos dos quais foram avaliados músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor dos dedos. No estudo de Chai, et al. (88), a dose administrada de liraglutida foi de 50 µg/kg duas vezes/dia a 200 µg/kg duas vezes/dia durante 8 dias, ou seja, a cada 2 dias a dose foi aumentada em 100 µg/kg. Chai, et al. (88) observaram que a liraglutida foi capaz de melhorar a capilarização muscular e o transporte de insulina.

Já no estudo de Yamada, et al (86), a dose administrada de liraglutida foi de 0,2 mg/kg durante a semana 1, 0,4 mg/kg durante a semana 2 e 0,6 mg/kg nas 6 semanas subsequentes, o tecido analisado foi o músculo sóleo. Neste estudo foi observado que a liraglutida foi capaz de contribuir com a síntese e preservação mitocondrial no músculo sóleo no diabetes tipo 2 e não forneceu

nenhum efeito benéfico ao músculo extensor dos dedos. Ji, et al (87) administrou liraglutida durante 6 semanas em ratos, na dose de 250 µg/kg/dia e não especificou qual músculo da coxa dos animais foram avaliados. Neste estudo, foi observado que a liraglutida melhorou lesões miofibrilares e mitocondriais na musculatura esquelética dos animais.

Não encontramos nenhum estudo que avaliou os efeitos da liraglutida na musculatura na presença de DOX, tornando o nosso estudo original neste aspecto.

O dano mitocondrial é importante causa de atrofia muscular por DOX. O SIRT1 é uma desacetilase altamente sensível a alterações no metabolismo e tem efeito na biogênese mitocondrial por meio da desacetilação da proteína PGC1α (73). Em nosso estudo não observamos diferença estatisticamente significante na expressão de SIRT1.

Outras vias da biogênese mitocondrial são o PGC1 α , que também é um estimulador de transcrição gênica no tecido muscular esquelético (76), e o PPAR γ , que além de regular a biogênese mitocondrial, é um regulador do metabolismo lipídico e de defesa antioxidante (77, 78). Em nosso estudo, não observamos diferença estatisticamente significante nas expressões de PGC1 α e PPAR γ .

O funcionamento mitocondrial adequado depende da disponibilidade e oferta de nutrientes para a cadeia fosforilativa. Nesse sentido, o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) apresenta papel importante na transdução de insulina e captação de glicose para o meio intramuscular (82), sendo essencial para o metabolismo energético muscular. No entanto, não observamos diferença entre os grupos na quantificação de GLUT-4.

Nossos resultados, avaliados em conjunto, não nos permite concluir se houve, de fato, injúria muscular esquelética induzida pela DOX. Acreditamos que pode ter ocorrido algum grau de lesão devido à tendência de diminuição da quantidade de troponina T no grupo D, porém não suficiente para alterar as vias metabólicas analisadas no presente estudo. Outro ponto a ser levado em consideração é o tipo de modelo utilizado para avaliar a musculatura. O modelo agudo utilizado em nosso estudo já está bem estabelecido para avaliação da cardiotoxicidade, no entanto, a musculatura periférica esquelética pode se comportar de maneira diferente do músculo cardíaco. Adicionalmente, o fato do grupo DLG apresentar menor carbonilação proteica e maior atividade de CAT que o grupo C pode sugerir que, se avaliado em modelo de toxicidade muscular diferente (tempo mais longo de tratamento), poderíamos observar efeito benéfico da liraglutida mais pronunciado.

Algumas limitações do estudo decorrem do fato de não termos avaliado a função ou estrutura dos músculos esqueléticos. Essas análises poderiam adicionar importantes informações a respeito do efeito da liraglutida. Também não foi possível avaliar de maneira profunda o metabolismo, estrutura e função mitocondrial, que parece ser o ponto de gatilho da lesão muscular induzida pela DOX.

CONCLUSÃO

A doxorrubicina não foi capaz de aumentar o estresse oxidativo na musculatura esquelética periférica e não modificou a quantidade de proteínas relacionadas ao funcionamento mitocondrial em ratos tratados com o quimioterápico. No entanto, a liraglutida parece reduzir a carbonilação proteica e aumentar a atividade da catalase, sugerindo que essa droga possa ter efeito benéfico na musculatura por seu efeito antioxidante.

REFERÊNCIAS

- SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2021. Ca Cancer J Clin, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35020204/</u>
- XIA, Changfa et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. Chinese medical journal, v. 135, n. 05, p. 584-590, 2022. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35143424/</u>
- CRUZ, M.; DUARTE-RODRIGUES, J.; CAMPELO, M. Cardiotoxicity in anthracycline therapy: prevention strategies. **Rev Port Cardiol**. v. 35, n. 6, p. 359-371, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255173/</u>.
- MENNA, P.; SALVATORELLI, E. Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. Chemotherapy. v. 62, p. 159–168, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28122377/</u>.
- FERNANDES, Ricardo Ribeiro Alves *et al.* Economic assessment of dexrazoxane in prophylaxis of cardiotoxicity in children undergoing chemotherapy with anthracyclines. Cadernos de saude publica, v. 35, n. 9, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31531521/</u>.
- MITRY, Maria A.; EDWARDS, John G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. IJC heart & vasculature, v. 10, p. 17-24, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27213178/</u>.
- TALLARICO, Demetrio, *et al.* Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. *Angiology*, v. 54, n. 2, p. 219-227, 2003. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12678198/</u>.
- OJHA S. *et al.* Cardioprotective potentials of plant-derived small molecules against doxorubicin associated cardiotoxicity. **Oxid Med Cel Longev**. v. 23, p. 1-19, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313831/</u>.
- KOSOKO A. M, OLURINDE O. J, AKINLOYE O. A. Doxorubicin induced neuro- and cardiotoxicities in experimental rats: Protection against oxidative damage by Theobroma cacao Sterm bark. Biochem Biophys Rep, v. 10, p. 303-317, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28955758/</u>.
- POWERS, Scott K. *et al.* Disease-induced skeletal muscle atrophy and fatigue. Medicine and science in sports and exercise, v. 48, n. 11, p. 2307, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27128663/</u>.
- KARSTOFT, Kristian; PEDERSEN, Bente K. Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, v. 19, n. 4, p. 270-275, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27101470/</u>.
- HOPPELER, Hans. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. Journal of Experimental Biology, v. 219, n. 2, p. 205-213, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26792332/</u>.
- GIUDICE, Jimena; TAYLOR, Joan M. Muscle as a paracrine and endocrine organ. Current opinion in pharmacology, v. 34, p. 49-55, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28605657/</u>
- KIM, Gyuri; KIM, Jae Hyeon. Impact of skeletal muscle mass on metabolic health. Endocrinology and Metabolism, v. 35, n. 1, p. 1-6, 2020. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32207258/</u>.
- MUKUND, Kavitha; SUBRAMANIAM, Shankar. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, v. 12, n. 1, p. e1462, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31407867/</u>.

- BARACOS, Vickie E.; MAZURAK, Vera C.; BHULLAR, Amritpal S. Cancer cachexia is defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass. **Annals of palliative medicine**, v. 8, n. 1, p. 3-12, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30685982/</u>
- 17. HIENSCH, Anouk E. *et al.* Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: elucidating the underlying molecular pathways. **Acta Physiologica**, v. 229, n. 2, p. e13400, 2020. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31600860/</u>.
- YU, A. P. *et al.* Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle. Acta physiologica, v. 211, n. 1, p. 201-213, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24581239/</u>.
- SMUDER, Ashley J. *et al.* Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. Journal of applied physiology, v. 111, n. 4, p. 1190-1198, 2011. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778418/</u>.
- SORENSEN, James C. *et al.* Mitochondria: inadvertent targets in chemotherapy-induced skeletal muscle toxicity and wasting?. Cancer chemotherapy and pharmacology, v. 78, n. 4, p. 673-683, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27167634/</u>.
- NISSINEN, T. A. *et al.* Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapyinduced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27666826/</u>.
- KAVAZIS, Andreas N.; SMUDER, Ashley J.; POWERS, Scott K. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. Journal of applied physiology, v. 117, n. 3, p. 223-230, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24947024/</u>.
- HULMI, Juha J. *et al.* Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, v. 9, n. 2, p. 417-432, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29230965/</u>.
- GILLIAM, Laura AA *et al.* The anticancer agent doxorubicin disrupts mitochondrial energy metabolism and redox balance in skeletal muscle. Free Radical Biology and Medicine, v. 65, p. 988-996, 2013. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24017970/</u>.
- SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. Annual review of biochemistry, v. 86, p. 715-748, 2017. Disponível em: <u>https://doi.org/10.1146/annurevbiochem-061516-045037</u>.
- VAUGHAN, Vanessa C.; MARTIN, Peter; LEWANDOWSKI, Paul A. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, v. 4, n. 2, p. 95-109, 2013. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23097000/</u>.
- 27. SANTOS, Priscila P. *et al*. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. PLoS One, v. 9, n. 12, p. e113739, 2014. Disponível em: <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113739</u>.
- GERSHUNI, Victoria M.; YAN, Stephanie L.; MEDICI, Valentina. Nutritional ketosis for weight management and reversal of metabolic syndrome. **Current nutrition reports**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2018. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30128963/</u>.
- GILLIAM, Laura AA *et al.* Targeted overexpression of mitochondrial catalase protects against cancer chemotherapy-induced skeletal muscle dysfunction. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 311, n. 2, p. E293-E301, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329802/</u>.
- MIN, Kisuk *et al.* Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. The Journal of physiology, v. 593, n. 8, p. 2017-2036, 2015. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25643692/.</u>

- MONTGOMERY, Magdalene K.; TURNER, Nigel. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. Endocrine connections, v. 4, n. 1, p. R1-R15, 2015. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25385852/</u>.
- ROVIRA-LLOPIS, Susana *et al.* Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications. Redox biology, v. 11, p. 637-645, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28131082/</u>.
- FUJIMAKI, Shin; KUWABARA, Tomoko. Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 10, p. 2147, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29036909/</u>.
- HESSELINK, Matthijs KC; SCHRAUWEN-HINDERLING, Vera; SCHRAUWEN, Patrick. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. Nature reviews endocrinology, v. 12, n. 11, p. 633, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27448057/</u>.
- 35. YUAN, Haitao et al. A PGC-1α-mediated transcriptional network maintains mitochondrial redox and bioenergetic homeostasis against doxorubicin-induced toxicity in human cardiomyocytes: implementation of TT21C. Toxicological Sciences, v. 150, n. 2, p. 400-417, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26781513/</u>.
- VEJPONGSA, Pimprapa; YEH, Edward TH. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. Journal of the American College of Cardiology, v. 64, n. 9, p. 938-945, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25169180/.</u>
- LIU, Dong et al. AMPK/PGC1α activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine, v. 129, p. 59-72, 2018. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30172748/.</u>
- QUAN, Nanhu et al. Sestrin2 prevents age-related intolerance to post myocardial infarction via AMPK/PGC-1α pathway. Journal of molecular and cellular cardiology, v. 115, p. 170-178, 2018. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29325933/.</u>
- 39. DOS SANTOS, Tanila Wood *et al*. Efeitos das erva-mate (Ilex paraguariensis) na modulação do metabolismo energético mitocondrial associado à obesidade: Effects of yerba mate (Ilex paraguariensis) on modulation of mitochondrial energetic metabolism associated with obesity. 2018. Disponível em: <u>http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332434</u>.
- DE LIMA JUNIOR, Edson Alves *et al.* Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, v. 7, n. 5, p. 615-625, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27239415/</u>.
- PAKRAVAN, Golnaz et al. Downregulation of miR-130a, antagonized doxorubicin-induced cardiotoxicity via increasing the PPARγ expression in mESCs-derived cardiac cells. Cell death & disease, v. 9, n. 7, p. 1-10, 2018. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29988029/</u>
- 42. NAUCK, Michael A. et al. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes-stateof-the-art. **Molecular metabolism**, v. 46, p. 101102, 2021.
- LEE, Young-Sun; JUN, Hee-Sook. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. Metabolism, v. 63, n. 1, p. 9-19, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140094/</u>.
- NAUCK, Michael A.; MEIER, Juris J. Incretin hormones: Their role in health and disease. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 20, p. 5-21, 2018. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29364588/</u>.
- LI, Zhu *et al.* Liraglutide enhances glucose transporter 4 translocation via regulation of AMPactivated protein kinase signaling pathways in mouse skeletal muscle cells. **Metabolism**, v. 63, n. 8, p. 1022-1030, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972503/</u>.

- 37
- SHANG, Junjie *et al.* Liraglutide-induced structural modulation of the gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. **PeerJ**, v. 9, p. e11128, 2021. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33850659/</u>.
- MARSO, Steven P. et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. New England Journal of Medicine, v. 375, n. 4, p. 311-322, 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27295427/.
- SIMEONE, Paola et al. Effects of liraglutide vs. lifestyle changes on soluble suppression of tumorigenesis-2 (sST2) and galectin-3 in obese subjects with prediabetes or type 2 diabetes after comparable weight loss. Cardiovascular diabetology, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2022. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35277168/
- ABBAS, Noha AT; KABIL, Soad L. Liraglutide ameliorates cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats through the Akt/GSK-3β signaling pathway. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, v. 390, n. 11, p. 1145-1153, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780599/</u>.
- 50. HONG, Yeonhee et al. Amelioration of muscle wasting by glucagon-like peptide-1 receptor agonist in muscle atrophy. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 10, n. 4, p. 903-918, 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31020810/.
- 51. GIANNOCCO, Gisele *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibition upregulates GLUT4 translocation and expression in heart and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **European journal of pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 74-86, 2013. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23051671/</u>.
- LEE, Young-Sun; JUN, Hee-Sook. Anti-inflammatory effects of GLP-1-based therapies beyond glucose control. Mediators of inflammation, v. 2016, 2016. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27110066/</u>.
- GARCIA, Jéssica Leite et al. Rice (Oryza sativa L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. European Journal of Nutrition, v. 61, n. 2, p. 901-913, 2022. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34636986/.
- 54. COSTA, Mariane et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. Antioxidants, v. 8, n. 8, p. 276, 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387231/
- 55. DRUCKER, Daniel J. Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1. **Cell metabolism**, v. 27, n. 4, p. 740-756, 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29617641/.
- ARD, Jamy et al. Weight loss and maintenance related to the mechanism of action of glucagon-like peptide 1 receptor agonists. Advances in therapy, v. 38, n. 6, p. 2821-2839, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33977495/.
- 57. DE VRIES, Y. C. et al. Differences in dietary intake during chemotherapy in breast cancer patients compared to women without cancer. Supportive Care in Cancer, v. 25, n. 8, p. 2581-2591, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303381/.
- GIERA, Martin; LINGEMAN, Henk; NIESSEN, Wilfried. Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. Chromatographia, v. 75, n. 9, p. 433-440, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593603/.
- 59. ZHANG, Lihui et al. Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analog, inhibits high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. Experimental and therapeutic medicine, v. 17, n. 5, p. 3734-3740, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30988759/</u>.
- QI, Liqin et al. Liraglutide reduces oxidative stress and improves energy metabolism in methylglyoxal-induced SH-SY5Y cells. **NeuroToxicology**, v. 92, p. 166-179, 2022. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35985417/</u>.
- MITCHELL, Simon; VARGAS, Jesse; HOFFMANN, Alexander. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, v. 8, n. 3, p. 227-241, 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26990581/.

- 62. HOU, Jun et al. Mangiferin suppressed advanced glycation end products (AGEs) through NFκB deactivation and displayed anti-inflammatory effects in streptozotocin and high fat dietdiabetic cardiomyopathy rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 94, n. 3, p. 332-340, 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26751764/.
- CAO, Bing et al. Neuroprotective effects of liraglutide against inflammation through the AMPK/NF-κB pathway in a mouse model of Parkinson's disease. Metabolic Brain Disease, v. 37, n. 2, p. 451-462, 2022. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34817756/</u>.
- 64. DI, Beibing et al. Liraglutide inhibited AGEs induced coronary smooth muscle cell phenotypic transition through inhibiting the NF-κB signal pathway. **Peptides**, v. 112, p. 125-132, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30513352/</u>.
- 65. LI, Ziyi et al. Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses osteoclastogenesis through the inhibition of NF-κB and MAPK pathways via GLP-1R. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 130, p. 110523, 2020. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32702632/</u>.
- LUSTGARTEN, Michael S. et al. MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. Aging cell, v. 10, n. 3, p. 493-505, 2011. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21385310/</u>.
- ANDERSON, Ethan J.; NEUFER, P. Darrell. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H2O2 generation. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 290, n. 3, p. C844-C851, 2006. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16251473/</u>.
- 68. STADTMAN, Earl R.; BERLETT, Barbarra S. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 26, p. 17201-17211, 1991. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1894614/
- Mathias LMBS, et al. Euterpe oleracea Mart.(Açai) supplementation attenuates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Cell Physiol Biochem, v. 53, p. 388-399, 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31403269/
- RAWAT, Pushkar Singh et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 139, p. 111708, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34243633/.
- 71. DE CARVALHO, Paula Bernardo et al. Pamidronate attenuates oxidative stress and energetic metabolism changes but worsens functional outcomes in acute doxorubicininduced cardiotoxicity in rats. Cellular Physiology and Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 431-442, 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889760/.
- 72. RIBEIRO, Ana Paula Dantas et al. 'Pera'orange (Citrus sinensis) and 'Moro'orange juice (Citrus sinensis (L.) Osbeck) attenuates left ventricular dysfunction and oxidative stress and improves myocardial energy metabolism in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Nutrition**, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34265580/.
- CUI, Lan et al. Erythropoietin activates SIRT1 to protect human cardiomyocytes against doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and toxicity. **Toxicology letters**, v. 275, p. 28-38, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28456571/.
- LEE, Donghoon; GOLDBERG, Alfred L. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 42, p. 30515-30526, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24003218/.
- 75. ALWAY, S. E. et al. Functional and structural adaptations in skeletal muscle of trained athletes. **Journal of Applied Physiology**, v. 64, n. 3, p. 1114-1120, 1988. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3366734/.
- 76. HANDSCHIN, Christoph; SPIEGELMAN, Bruce M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. **Endocrine**

reviews, v. 27, n. 7, p. 728-735, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17018837/.

- 77. KIM, Teayoun; YANG, Qinglin. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. World journal of cardiology, v. 5, n. 6, p. 164, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23802046/
- 78. AHMADIAN, Maryam et al. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. Nature medicine, v. 19, n. 5, p. 557-566, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652116/.
- MYERS, Matthew J. et al. Skeletal muscle gene expression profile in response to caloric restriction and aging: A role for sirt1. Genes, v. 12, n. 5, p. 691, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34063079/.
- 80. QI, Liqin et al. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3β pathway in an amyloid β protein induced alzheimer disease mouse model. European journal of pharmacology, v. 783, p. 23-32, 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27131827/.
- 81. QI, Liqin et al. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3β. American Journal of Translational Research, v. 9, n. 2, p. 247, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28337257/.
- JI, Wenjun et al. Liraglutide exerts antidiabetic effect via PTP1B and PI3K/Akt2 signaling pathway in skeletal muscle of KKAy mice. International Journal of Endocrinology, v. 2014, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25183970/</u>.
- REAGAN-SHAW, Shannon; NIHAL, Minakshi; AHMAD, Nihal. Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB journal, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942826/</u>.
- TAŞKIRAN, Emin et al. Therapeutic effects of liraglutide, oxytocin and granulocyte colonystimulating factor in doxorubicin-induced cardiomyopathy model: an experimental animal study. Cardiovascular Toxicology, v. 19, p. 510-517, 2019. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31054117/</u>.
- LUO, Ying et al. Liraglutide improves non-alcoholic fatty liver disease in diabetic mice by modulating inflammatory signaling pathways. Drug Design, Development and Therapy, p. 4065-4074, 2019. Disponível em: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6896910/</u>.
- YAMADA, Shohei et al. Effect of GLP-1 receptor agonist, liraglutide, on muscle in spontaneously diabetic torii fatty rats. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 539, p. 111472, 2022. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34606964/</u>
- JI, Wenjun et al. Liraglutide exerts antidiabetic effect via PTP1B and Pl3K/Akt2 signaling pathway in skeletal muscle of KKAy mice. International Journal of Endocrinology, v. 2014, 2014. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25183970/</u>.
- CHAI, Weidong et al. Liraglutide prevents microvascular insulin resistance and preserves muscle capillary density in high-fat diet-fed rats. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 311, n. 3, p. E640-E648, 2016. Disponível em: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142002/</u>.
- LUO, Ying et al. Liraglutide improves non-alcoholic fatty liver disease in diabetic mice by modulating inflammatory signaling pathways. Drug Design, Development and Therapy, p. 4065-4074, 2019. Disponível em: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6896910/</u>.
- 90. ABBAS, Noha AT; KABIL, Soad L. Liraglutide ameliorates cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats through the Akt/GSK-3β signaling pathway. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, v. 390, p. 1145-1153, 2017. Disponível em: <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780599/</u>

ANEXOS ANEXO 1







K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; LG: liraglutida; DLG: doxorrubicina + liraglutida.



K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; LG: liraglutida; DLG: doxorrubicina + liraglutida.





K: Kaleidoscope; C: controle; D: doxorrubicina; LG: liraglutida; DLG: doxorrubicina + liraglutida.



ANEXO 2

Apresentação de resultados em teste-t entre grupos CONTROLE e LIRAGLUTIDA

Tabela 3. Estresse Oxidativo no músculo gastrocnêmio branco dos animais

Variável	C (n=5)	LG (n=5)	р
Carbonilação proteica (DNPH/mg proteína)	7,82 ± 3,71	3,14 ± 2,80	0,057
Malondialdeido (nmol/mg proteína)	20,31 ± 10,56	45,94 ± 17,89 [*]	0,030
Superóxido Dismutase (pmol/mg proteína)	10,91 ± 1,69	10,75 ± 0,39	0,846
Catalase (pmol/mg proteína)	0,18 ± 0,31	0,44 ± 0,08	0,128

Tabela 4. Expressão proteica no músculo sóleo dos animais por Western Blot

Variável	C (n=5)	LG (n=5)	р
PPARγ	1,28 ± 0,59	1,73 ± 1,34	0,375
PGC1α	0,69 ± 0,41	$0,56 \pm 0,40$	0,895
SIRT1	0,43 ± 0,35	0,87 ± 0,29	0,714
NF-кВ Total	0,84 ± 0,16	2,40 ± 1,72	0,103
NF-кВ Fosforilado	1,17 ± 1,10	1,97 ± 0,70	0,074
GLUT4	1,95 ± 1,96	3,47 ± 3,05	0,236
TROPONINA	1,14 ± 0,58	1,11 ± 0,63	0,941