

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

Matheus Vieira Lima

**Efeitos do Tratamento com Liraglutida Sobre o Estresse Oxidativo e Alterações
Metabólicas Induzidas pela Castração em Coração de Ratas**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**Efeitos do Tratamento com Liraglutida Sobre o Estresse Oxidativo e Alterações
Metabólicas Induzidas pela Castração em Coração de Ratas**

Autor: Matheus Vieira Lima

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Anapaula Sommer Vinagre

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, pela parceria e orientação nesse trabalho

Ao Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), pela amizade, companheirismo e todos os ensinamentos que irei levar para a vida

E principalmente a minha família, por todo o apoio nesses anos de graduação

RESUMO

O sobrepeso atualmente é um agravante da saúde tanto em humanos quanto em *Pets*. Dentre as complicações, o desenvolvimento de Diabetes Melito Tipo 2 (DM2) é uma das enfermidades mais comuns decorrente do quadro de sobrepeso ou obesidade. A ação prejudicada da insulina, bem como a hiperglicemia e aumento do uso de ácidos graxos como substrato energético, irá levar o paciente diabético a desenvolver diversos distúrbios metabólicos, os quais incluem cardiopatias e aumento do risco de ataque cardíaco. Sabe-se que o sobrepeso está relacionado com deficiência de estrogênios. Estudos apontam que mulheres após a menopausa, bem como animais de companhia após a castração, tendem a ganhar peso decorrente do acúmulo de tecido adiposo visceral. Assim, sendo um fator predisponente para DM2, além de ficarem mais expostas a ação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) devido ao efeito antioxidante dos estrogênios. Diante disso, para evitar o excessivo ganho de peso, bem como manter a efetiva sinalização da ação da insulina, tem sido utilizados fármacos agonistas de receptores do hormônio *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) para o tratamento dessa enfermidade. O GLP-1 é um hormônio produzido pelas células enteroendócrinas do intestino grosso e delgado. Durante a digestão, o GLP-1 é secretado e atua no pâncreas estimulando a liberação de insulina, atuando de forma glicose dependente no controle glicêmico, além de diminuir o esvaziamento gástrico, resultando em saciedade. Os fármacos agonistas dos receptores GLP-1 são empregados no tratamento de DM2 devido ao seu menor risco de crises hipoglicêmicas decorrente de seu mecanismo de ação. Além disso, observou-se que GLP-1 apresenta ainda efeito cardioprotetor, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos. Entretanto, o mecanismo cardioprotetor ainda não foi completamente elucidado. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do agonista de receptor de GLP-1, Liraglutida, em ratas castradas a fim de observar o seu efeito na formação de EROs, bem como sua ação no metabolismo de carboidratos nos ventrículos cardíacos. Os resultados mostraram que os grupos tratados com Liraglutida obtiveram menor concentração de glicogênio nos ventrículos cardíacos quando comparados ao grupo castrado controle. Em relação à formação de EROs, o tratamento, bem como a castração, não exerceram efeitos nas enzimas estudadas. Como conclusão, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o GLP-1 atua diretamente no metabolismo cardíaco, sugerindo mais estudos a respeito do metabolismo de glicose e ácidos graxos no coração.

ABSTRACT

Overweight is currently an aggravating health factor in both humans and pets. Among the complications of overweight or obesity, there is a risk for the development of Type 2 Diabetes Mellitus (DM2). Impaired insulin action, as well as hyperglycemia and increased use of fatty acids as an energetic substrate, will lead the diabetic patient to develop various metabolic disorders, which include heart disease and increased risk of heart attack. It is known that overweight is related to estrogen deficiency. Studies indicate that postmenopausal women, as well as companion animals after castration, tend to gain weight due to the accumulation of visceral adipose tissue. Therefore, castration and /or obesity are predisposing factors for DM2. Estrogen deficiency after castration or menopause can also increase Reactive Oxygen Species (ROS) due to the lack of the antioxidant effect of estrogens. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is a hormone produced by the enteroendocrine cells of the large and small intestine. It is secreted after a meal and acts on pancreas stimulating insulin release, in a glucose-dependent fashion with low risk of hypoglycemic crisis. GLP1 also decreases gastric emptying, resulting in satiety. Therefore, GLP-1 receptor agonist drugs are used for the treatment of DM2. Also, GLP-1 has a cardioprotective effect, decreasing cardiovascular diseases in diabetic patients. However, the cardioprotective mechanism of GLP1 has not yet been fully elucidated. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of the GLP-1 receptor agonist, Liraglutida, on neutered female rats in order to observe its effect on ROS formation and carbohydrate metabolism of the cardiac ventricles. Liraglutide treatment reduced glycogen concentration of the cardiac ventricles when compared to the control castrated group. Ovariectomy and liraglutide did not altered the activity of the studied antioxidant enzymes. As a conclusion, the results obtained in the present study indicate that GLP-1 acts on cardiac metabolism, suggesting further studies on the metabolism of glucose and fatty acids in the heart.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Ácido graxo

AGES: Produtos finais da glicação avançada

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

CAT: Catalase

CRP: Proteína C reativa

DM2: Diabetes melito tipo 2

DCV: Doenças cardiovasculares

DPP-4: Dipeptidil peptidase 4

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GLP-1: *Glucagon like peptide 1*

GLP-1R: Receptor de GLP-1

GLP-1RA: Agonista do receptor de GLP-1

GLUT-4: Transportador de glicose tipo 4

GPX: Glutathione peroxidase

IL-6: Interleucina 6

IP₃R: Receptor de inositol trifosfato

K_{ATP}: Canais de potássio sensíveis ao ATP

K_V: Canais de potássio sensíveis à voltagem

MVO₂: Consumo de oxigênio do miocárdico

NOX: NADPH Oxidase

RYR: Receptor de rianodina

S-RAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SOD: Superóxido Dismutase

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VDCC: Canais de cálcio dependentes de voltagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Homeostase redox

Figura 2: Mecanismos múltiplos responsáveis pela cardiomiopatia diabética

Figura 3: Processamento do GLP-1

Figura 4: Mecanismo insulínico do GLP-1

Figura 5: Moléculas análogas ao GLP-1

Figura 6: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre EROs Total

Figura 7: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da Catalase

Figura 8: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da Superóxido Dismutase

Figura 9: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da NADPH Oxidase

Figura 10: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre Sulfidrilas

Figura 11: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a Concentração de Glicogênio

Figura 12: Hipótese do mecanismo regulatório da Liraglutida sobre o metabolismo de carboidratos no coração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Objetivos.....	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 Animais.....	15
2.2 Procedimentos Cirúrgicos.....	16
2.3 Tratamento.....	16
2.4 Eutanásia e Coleta do Tecido.....	16
3 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
3.1 Homogeneização.....	17
3.2 Quantificação de Proteínas.....	17
3.3 Espécies Reativas de Oxigênio Totais.....	17
3.4 Catalase.....	18
3.5 Superóxido Dismutase.....	18
3.6 NADPH Oxidase.....	18
3.7 Sulfidrilas.....	19
4 ANÁLISE DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS.....	19
4.1 Concentração de Glicogênio.....	19
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
6 RESULTADOS.....	20
6.1 Espécies Reativas de Oxigênio Totais.....	20
6.2 Catalase.....	21
6.3 Superóxido Dismutase.....	22
6.4 NADPH Oxidase.....	23
6.5 Sulfidrilas.....	24
6.6 Concentração de Glicogênio.....	25
7 Discussão.....	26
8 Conclusão.....	28
9 Referências.....	28

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tem se mostrado um problema que vem se agravando tanto em humanos quando em animais de companhia (*pets*). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a obesidade em humanos triplicou desde 1975. Em um levantamento feito em 2016, observou-se que aproximadamente 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso. Em relação aos *pets*, a *Pet Obesity Prevention* demonstrou que, em 2017, cerca de 56% dos cães e 60% dos gatos domésticos estavam obesos ou com sobrepeso nos Estados Unidos (POZZA; ISIDORI, 2018). A etiologia da obesidade apresenta muitas semelhanças entre humanos e animais de companhia (GODOY, SWANSON, 2014; OSTO, LUTZ, 2015; URIBE *et al.*, 2016). A domesticação alterou drasticamente o ambiente e o comportamento de cães e gatos, que passaram de um ambiente em que precisavam caçar e competir por alimento para um ambiente doméstico e rico em alimento (GODOY, SWANSON, 2014). Assim como em humanos, cães e gatos obesos apresentam maior tendência a desenvolver diabetes melito tipo 2 (DM2), reduzindo a expectativa de vida (GODOY, SWANSON, 2014).

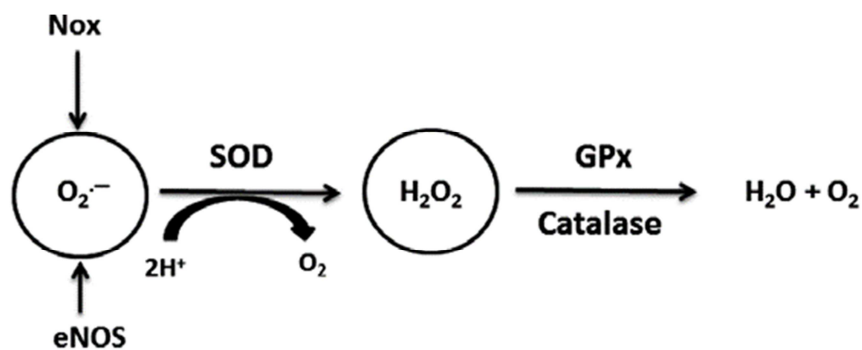
Após a menopausa, mulheres apresentam maior tendência à obesidade (HONG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2014; LIZCANO, GUZMÁN, 2014). A deficiência de estrogênios desencadeia alterações metabólicas que elevam o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCV), artrite, Diabetes Melito tipo 2 (DM2) e síndrome metabólica (GODOY, SWANSON, 2014; KANDER *et al.*, 2017, POZZA; ISIDORI, 2018). Roedores fêmeas ovariectomizadas também desenvolvem obesidade, reversível pela terapia de reposição estrogênica (KIM *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2015). Os hormônios estrogênicos atuam no metabolismo de glicose e lipídios e na diferenciação de adipócitos influenciando assim a distribuição de tecido adiposo no corpo (KIM *et al.*, 2014; LIZCANO, GUZMÁN, 2014). O tratamento com estrogênio exógeno atenua esse quadro decorrente da deficiência hormonal, além de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (BABAEI *et al.*, 2010; LIZCANO; GUZMÁN, 2014). Porém, há forte associação entre a terapia estrogênica e o desenvolvimento de carcinoma mamário (YAGER; DAVIDSON, 2006).

A predisposição às doenças cardiovasculares (DCV) é diferente entre homens e mulheres (BELLANTI *et al.*, 2013, KANDER *et al.*, 2017). Antes da menopausa, as mulheres apresentam menor risco de desenvolver DCV, porém, após a menopausa, a incidência de infarto agudo do miocárdio se eleva (KANDER *et al.*, 2017). Além de

apresentarem efeitos metabólicos, os estrogênios apresentam efeitos variados sobre parâmetros de estresse oxidativo ou homeostase redox (BARP *et al.*, 2002, BELLANTI *et al.*, 2013, KANDER *et al.*, 2017).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas como subproduto da atividade mitocondrial e apresentam papel fisiológico na sinalização celular (BELLANTI *et al.*, 2013, KANDER *et al.*, 2017). As EROs são mantidas em equilíbrio homeostático por mecanismos pró – e antioxidantes. A enzima NADPH oxidase (NOX) produz o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ao transferir elétrons do NADPH para o O_2 (Figura 1). Esse radical é convertido em peróxido de hidrogênio H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). As enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), dissociam o H_2O_2 em H_2O e O_2 (KALYANARAMAN, 2013; KANDER *et al.*, 2017). O estresse oxidativo ocorre quando essa homeostase redox é rompida em favor dos mecanismos pró-oxidantes, causando danos em proteínas (adição de sulfidrilas), lipídeos (lipoperoxidação) e ao DNA (BELLANTI *et al.*, 2013, KALYANARAMAN, 2013, KANDER *et al.*, 2017).

Figura 1: Homeostase redox

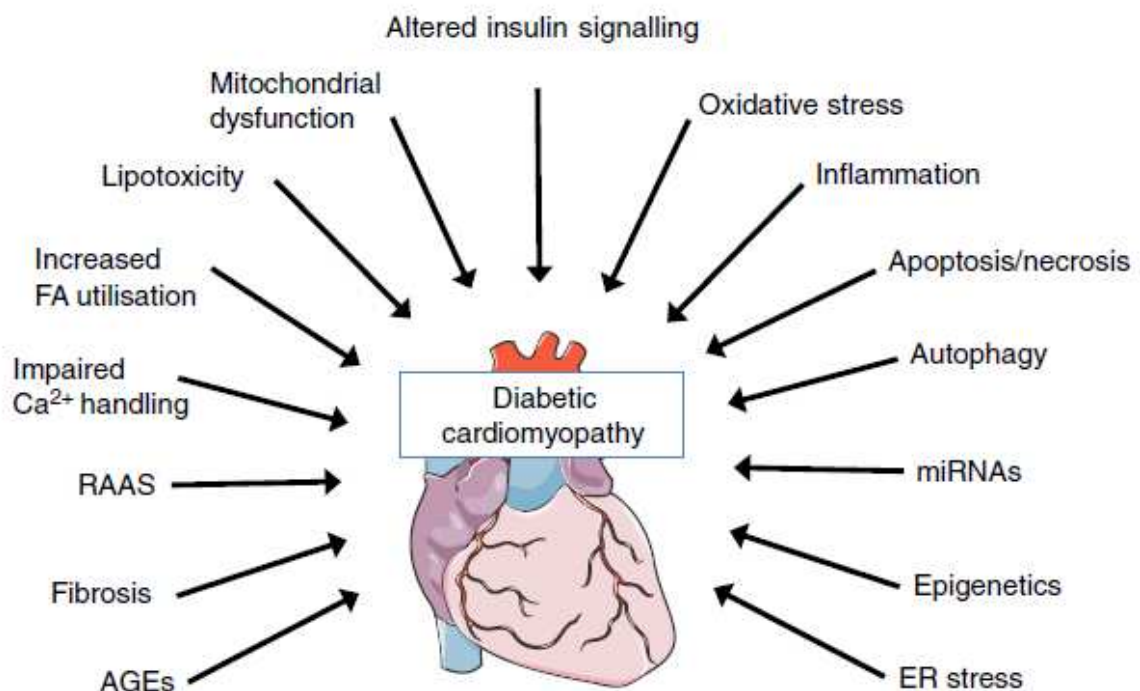


Fonte: KANDER *et al.*, (2017).

Pacientes com DM2 apresentam risco muito elevado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e falência cardíaca (Figura 2) (SARAIVA, SPOSITO, 2014; OKOSHI, 2007). O DM2 decorrente do sobrepeso resulta em desordens metabólicas, acarretando em estresse oxidativo, inflamação e remodelamento cardíaco (HAYAT *et al.*, 2004; VICENOVÁ *et al.*, 2009; MATHEUS *et al.*, 2013). O aumento do teor lipídico nos miócitos leva à disfunção da cascata de sinalização da insulina, o que resulta em inabilidade

no deslocamento no transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) do citosol para a membrana celular. O sobrepeso induz a superexpressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e proteína C reativa (CRP) (PARK; PARK; YU, 2005), as quais são responsáveis pela inflamação crônica, resultando em aterosclerose e DCV (VICENOVÁ *et al.*, 2009). O TNF- α inibe a lipase lipoproteica (LPL) e estimula a lipólise em adipócitos, o que resulta em aumento de ácidos graxos (AG) circulantes, contribuindo para a resistência insulínica (GODOY, SWANSON, 2014). Estudos apontam que a hiperglicemia crônica é um dos fatores que leva a danos oxidativos. O aumento da concentração intracelular de glicose induz a formação de produtos finais da glicação avançada (AGES) e como consequência o desenvolvimento de EROs, as quais causam danos ao tecido cardíaco, tais como prejuízos no relaxamento, contratilidade e rigidez miocárdica (MATHEUS *et al.*, 2013). Esse aumento da captação e oxidação de AG irá levar à lipotoxicidade, ocasionando disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático (BUGGER; ABEL, 2014). Esses fatores, por fim, resultam em aumento do risco de disfunção diastólica, diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e fibrose cardíaca, os quais podem levar a complicações na movimentação do Ca^{+2} e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (S-RAA), assim, prejudicando a sinalização de insulina e levando a um efeito deletério (Figura 2) (JIA; CONNELL; SOWERS, 2018).

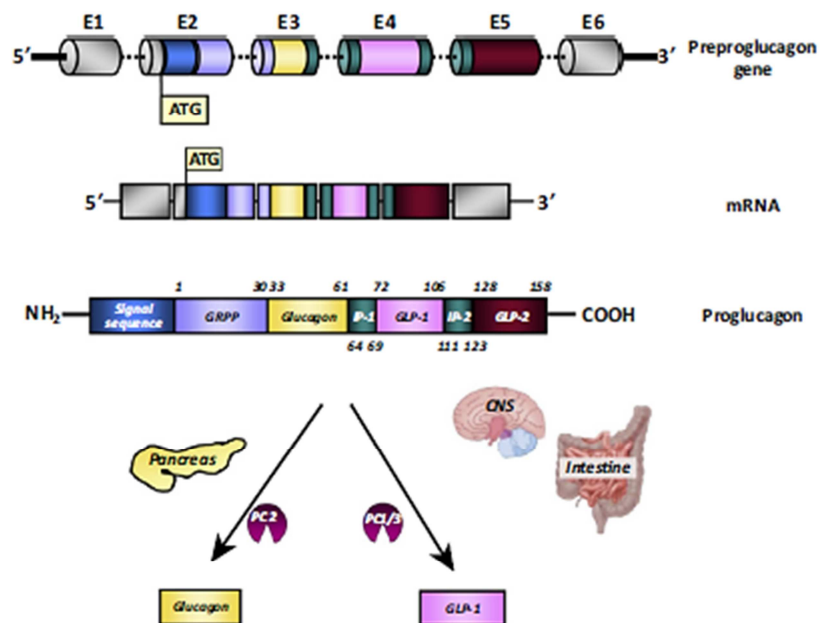
Figura 2: Mecanismos múltiplos responsáveis pela cardiomiopatia diabética



Fonte: BUGGER; ABEL, 2014

Diversos medicamentos são utilizados para o tratamento de DM2 a fim de evitar os danos causados por essa condição, entre eles, os agonistas do receptor de *glucagon-like peptide 1* (GLP-1RA). O *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) é um hormônio da classe das incretinas sintetizado pelas células L do intestino grosso e delgado (BAGGIO *et al.*, 2017) e, assim como o glucagon, o GLP-1 é proveniente do processamento do pré-pró-glucagon (Figura 3). Através de sucessivas clivagens, sua ativação ocorre através da enzima pró-convertase 1/3, a qual se encontra em maior quantidade nos enterócitos, diferente do pâncreas, onde a pró-convertase 2 se encontra mais abundante nas células alfa, o que leva a formação de glucagon (VRANG; LARSEN, 2010).

Figura 3: Processamento do pré-pró-glucagon

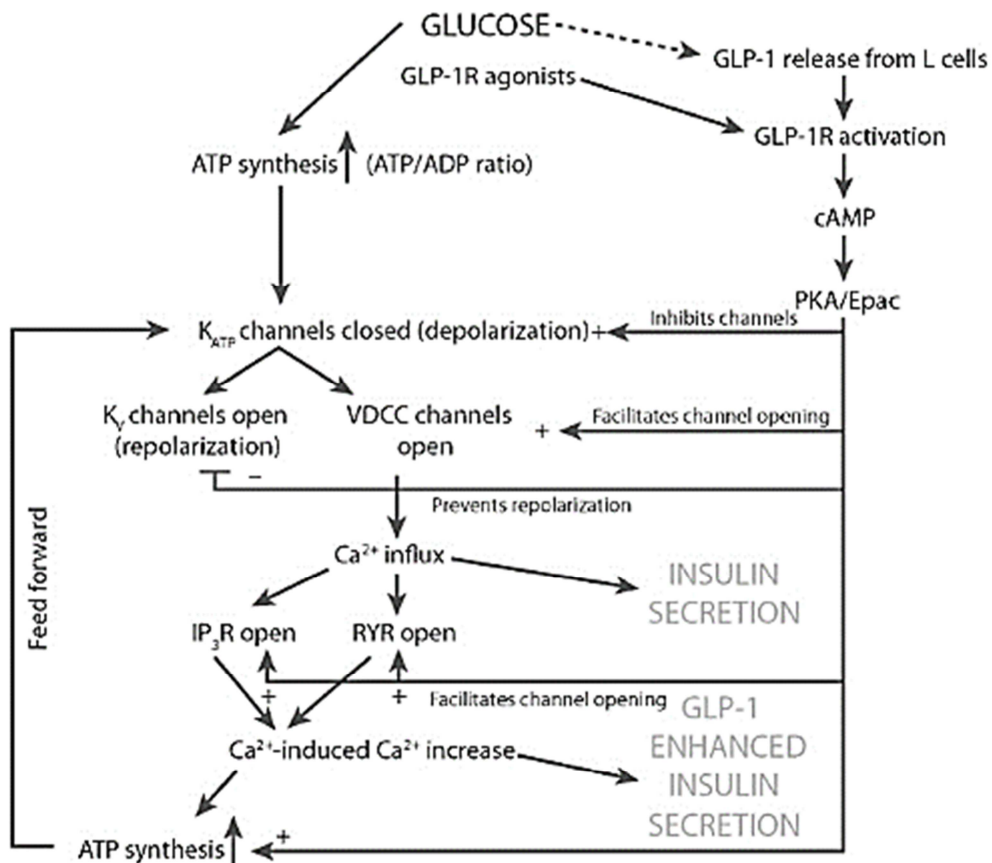


Fonte: CANTINI; MANNUCCI; LUCONI, 2016.

A secreção de GLP-1 ocorre fisiologicamente após a ingestão de alimentos, porém, poucos minutos após a alimentação, o GLP-1 já se encontra em concentrações séricas elevadas mesmo antes do alimento chegar às células enteroendócrinas, sugerindo uma estimulação neural para sua produção e liberação (BAGGIO; DRUCKER, 2007). O GLP-1 atua através de um receptor acoplado à proteína G, chamado de receptor de GLP-1 (GLP-1R), o qual é localizado em diversos tecidos, tais como pulmão, ilhotas pancreáticas, estômago, rins, hipotálamo e coração (CANTINI; MANNUCCI; LUCONI, 2016). No pâncreas, através da ligação do GLP-1 com o seu receptor localizado nas células β -pancreáticas, há estimulação

da atividade da adenilato ciclase e produção de Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A cascata de sinalização leva à inibição dos Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), fechamento dos Canais de potássio sensíveis à voltagem (K_V) e abertura dos Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) com conseqüente despolarização e influxo de Ca^{+2} . O GLP-1 ainda sensibiliza o Receptor de rianodina (RYR) e o Receptor de inositol trifosfato (IP_3R), o que potencializa o influxo de Ca^{+2} resultando na secreção de insulina (Figura 4) (MELONI *et al.*, 2013).

Figura 4: Mecanismo insulíntrópico do GLP-1

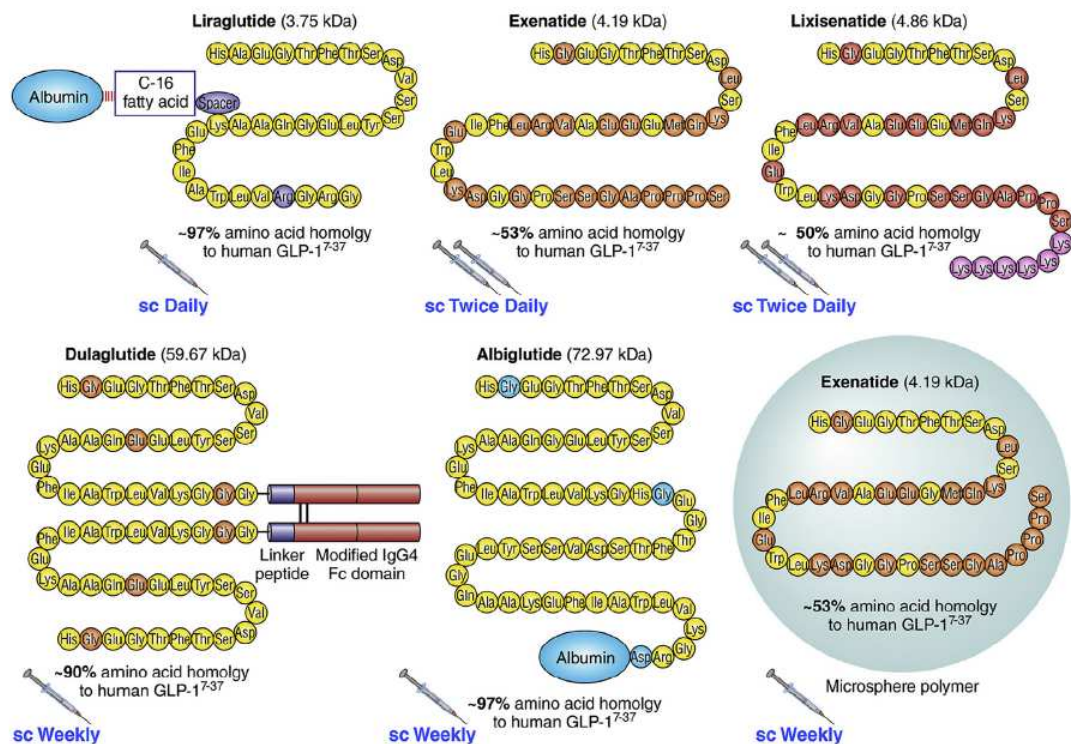


Fonte: MELONI *et al.*, 2012

Após sua secreção, o GLP-1 é rapidamente clivado de sua forma ativa GLP-1 (7-36) para forma inativa GLP-1 (9-36) através da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), assim, possuindo uma meia-vida sérica de aproximadamente 2 minutos *in vivo* (LOVSHIN; DRUCKER, 2009).

Devido ao seu mecanismo insulínico e de supressão de glucagon de forma glicose dependente, o qual resulta em menores riscos de hipoglicemia, os medicamentos GLP-1RA têm sido usados no tratamento de DM2 (CAN *et al.*, 2014). Entre as moléculas análogas ao GLP-1, estão a Liraglutida, Exenatida, Lixisenatida, Dulaglutida e Albiglutida, as quais são estruturalmente diferentes entre si, assim, variando na sua farmacocinética e meia vida em relação ao GLP-1 fisiológico (Figura 5) (LOVSHIN, 2017).

Figura 5: Moléculas análogas ao GLP-1. Em amarelo: sequência primária do GLP-1 (7-36) humano. Outras cores: aminoácidos diferentes da sequência humana. SC: forma de administração via subcutânea.



Fonte: LOVSHIN, 2017

Trabalhos recentes relatam que o GLP-1 apresenta efeito benéfico para o sistema cardiovascular. Utilizando modelo animal, observou-se que o tratamento com GLP-1-RA diminuiu danos cardíacos causados por falha cardíaca, isquemia/reperfusão e hipertensão, onde atuou na manutenção da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, diminuição do dano cardíaco e da frequência de arritmias, além de aumentar a captação de glicose (RAVASSA; ZUDAIRE; DÍEZ, 2012). Em pacientes humanos com DM2, a taxa de mortes por doenças

cardiovasculares e infartos apresentou menor incidência quando tratados com GLP-1-RA (MARSO *et al.*, 2016). Entretanto, o exato mecanismo dos benefícios do tratamento com GLP-1-RA no tecido cardíaco ainda não foi elucidado (ZHANG *et al.*, 2018).

1.1 OBJETIVOS

Apesar das diferenças no metabolismo entre diferentes espécies de mamíferos, estudos com roedores têm contribuído para o avanço da patofisiologia e genética da obesidade e da DM2 (OSTO, LUTZ, 2015). Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da Liraglutida sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo de glicose em ratas adultas castradas. Pretende-se, com os resultados apresentados, fornecer dados para a melhor compreensão dos mecanismos cardioprotetores que o GLP-1 possa vir a oferecer, agregando a literatura e visando um melhor controle e prevenção de doenças cardiovasculares mediante o uso de fármacos que utilizam o GLP-1 como princípio ativo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas com 60 dias de idade da espécie *Rattus norvegicus* provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais ficaram alojados no biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) nas condições padrões de biotério: ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar de 70% com fornecimento de ração para roedores (Nuvilab CR1®) e água *ad libitum*. Foram utilizadas caixas de polipropileno com 340 mm de largura x 410 mm de comprimento x 200 mm de altura, sendo feita três trocas de caixas por semana com aproximadamente 03 cm de cama de maravalha previamente autoclavada e lotação máxima de 3 animais por caixa, em conformidade com a Lei Arouca n° 11.794, de 8 de outubro de 2008 com credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Número de aprovação do comitê de ética: 32558.

2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a cirurgia, foi feita a sedação de cada animal com uma combinação de xilazina (10 mg/kg) + cetamina (90 mg/kg) por via intraperitoneal (volume máximo de 3 mL). Após a confirmação de ausência de reflexo interdigital, foi feita tricotomia do dorso e antissepsia com álcool 70°. Após, utilizando um bisturi, foi realizada uma incisão na musculatura dorsal perpendicular à última vértebra para acesso a cavidade abdominal, o ovário foi exteriorizado e feita uma ligadura junto ao corno uterino com fio de sutura (nylon) acompanhada da excisão do ovário. Ao término da ovariectomia, seguiu-se para miorrafia e dermorrafia com sutura em pontos simples isolados. A técnica foi utilizada para ambos os ovários (IDRIS, 2012). Os animais do grupo controle passaram pelo mesmo processo cirúrgico, porém sem remoção dos ovários, sendo feita apenas a incisão na musculatura seguido da sutura (*Sham*). As ratas ficaram sob observação até o término do efeito anestésico, sendo posteriormente colocadas de volta ao alojamento com Dipirona (1 mL/kg) diluída na água de beber (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013). Todos os procedimentos foram realizados por pesquisadores treinados e sob a supervisão de um médico veterinário.

2.3 TRATAMENTO

Uma semana após o procedimento cirúrgico, foi feita a retirada da sutura e iniciado o tratamento com Liraglutida (Victoza®) 4µg/kg uma vez ao dia (CAO *et al.*, 2014), o grupo controle foi tratado apenas com salina e o ajuste da dose foi feito de acordo com o ganho peso registrado semanalmente. Assim, os animais foram divididos em 4 grupos ao total: *Sham* tratado com salina (*Sham Ctrl*), *sham* tratado com liraglutida (*Sham Lira*), castrado tratado com salina (*OVX Ctrl*) e castrado tratado com liraglutida (*OVX Lira*). Todos os grupos foram alimentados igualmente com ração padrão para roedores e água *ad libitum* no decorrer do tratamento.

2.4 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS

Ao término do tratamento, os animais foram encaminhados para eutanásia, a qual foi feita por meio de decapitação por uma guilhotina específica para roedores e sem anestesia, sendo que para os animais *Sham*, a eutanásia ocorreu no diestro, tendo a fase do ciclo estral

determinado através de lavado vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002. A escolha do método de eutanásia foi feita considerando causar o mínimo de alterações fisiológicas nos tecidos (BROWN *et all.*, 2005). Após, realizou-se imediata toracotomia seguida da excisão do coração para coleta de dois fragmentos abrangendo os ventrículos esquerdo e direito, os quais foram armazenados em tubos tipo *ependorf* numerados e levados ao freezer à temperatura -20°C , sendo assim conservados para análises enzimáticas e bioquímicas.

3 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.1 HOMOGENEIZAÇÃO

A amostra foi homogeneizada na presença de uma solução tamponante inibidora de proteases constituída de KCl 1,15% + fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) equivalente à 5 mL/g de tecido em homogeneizador Ultra-Turrax por 30 segundos. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (4°C) a 3000 RPM durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e separado em tubos *ependorf* e congelados a -20°C para a realização dos ensaios enzimáticos (LLESUY *et all.*, 1985).

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada segundo o Método de Lowry, no qual se utilizou uma solução de NaHCO_3 2% em NaOH 1N (Reagente A), CuSO_4 (Reagente B1), Tartarato de Na e K 2% (Reagente B2) para constituição do Reativo C, além de Albumina sérica bovina e Folin. A absorbância foi mensurada com o uso de um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 625 nm. O cálculo para determinar a concentração de proteínas das amostras foi feito utilizando regressão linear e o resultados expressos em mg proteína/mL de amostra (LOWRY *et all.*, 1951).

3.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO TOTAIS

O método baseia-se na mensuração da fluorescência produzida pela oxidação do 2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) pelas espécies reativas de oxigênio presentes

na amostra. A absorbância foi avaliada utilizando espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado para 480 nm. Os resultados foram expressos em pmol de DCF formado/mg de proteína (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

3.4 CATALASE

A atividade da catalase foi avaliada através da decomposição de H_2O_2 monitorada diretamente pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante um ensaio de 1 minuto em espectrofotômetro, a diferença na absorbância por unidade de tempo foi utilizada como medida de atividade da catalase. O resultado foi expresso como Atividade da Catalase = mol/minuto/mg de proteína (AEBI, 1984).

3.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da SOD foi avaliada através da inibição do radical superóxido com o pirogalol. A oxidação do pirogalol leva a formação de um produto colorido que é detectado pelo espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado para 420 nm. O cálculo foi feito através do Δ dos valores de absorbância nos tempos 0,2 e 1,2 minutos e dividido pela concentração proteínas. O resultado foi expresso como U SOD/mg de tecido (MARKLUND, 1985).

3.6 NADPH OXIDASE

A atividade da NADPH Oxidase foi avaliada através do consumo do NADPH com o comprimento de onda ajustado para 340 nm. O cálculo foi feito utilizando o Δ dos valores de absorbância registrados nos tempos 0, 10, e 20 minutos e divididos pela concentração proteínas. O resultado foi expresso em μ mol de NADPH Oxidase/min/mg de proteína (WEI, 2006).

3.7 SULFIDRILAS

O método oxidativo é feito através de um reagente de cor contendo ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), o qual é reduzido por tióis gerando o derivado amarelo ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) e detectado no espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado para 412 nm. O resultado foi expresso em nmol de TNB/mg de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

4.1 CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO

Para realizar a extração do glicogênio, os fragmentos do tecido foram pesados e homogeneizados em tubos *falcon* na presença de KOH 30% em banho fervente por 60 minutos. Feita a homogeneização, as amostras são lavadas na presença de álcool absoluto (96%) e centrifugadas, o sobrenadante é descartado e o *pellet* ressuspenso com 0,5 mL de água destilada. Após, é retirada uma alíquota e colocada em banho fervente por 60 minutos na presença de HCl 4N. Ao término, é adicionado Na₂CO₃ 2M para parar a reação. A glicose é quantificada seguindo as orientações do kit comercial para análise em espectrofotômetro da Labtest® (VAN HANDEL, 1965).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

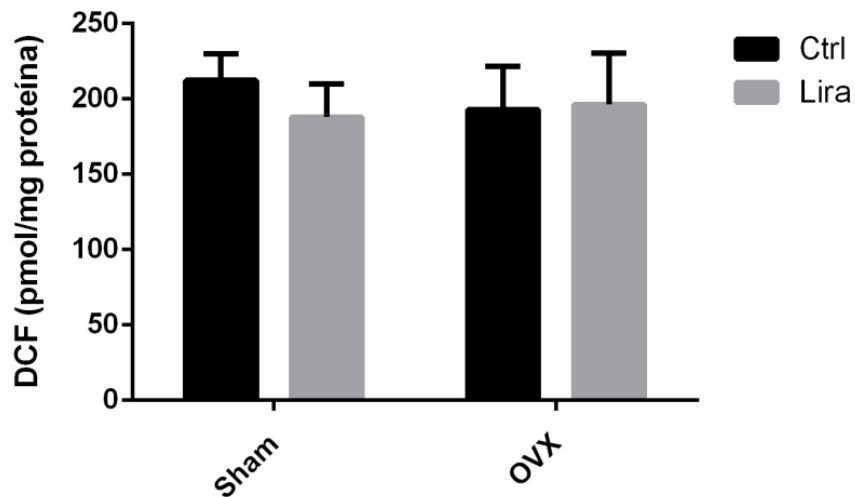
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação dos resultados paramétricos foi feita utilizando ANOVA de duas vias, complementado com o pós-teste de Tukey para detectar diferenças entre os grupos. A comparação dos resultados não paramétricos foi feita utilizando ANOVA de uma via, complementado com o pós-teste de Dunn. P<0,05 foi usado como critério de significância. O *software* utilizado para as análises estatísticas foi o Graphpad Prism® 6.

6 RESULTADOS

6.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO TOTAIS

Os resultados relacionados à produção de EROs (Figura 6) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento ou a castração ao final do período de 2 meses.

Figura 6: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre EROs Total. Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N = 6-7 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. Sham: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como média \pm desvio padrão. $P > 0,5$.

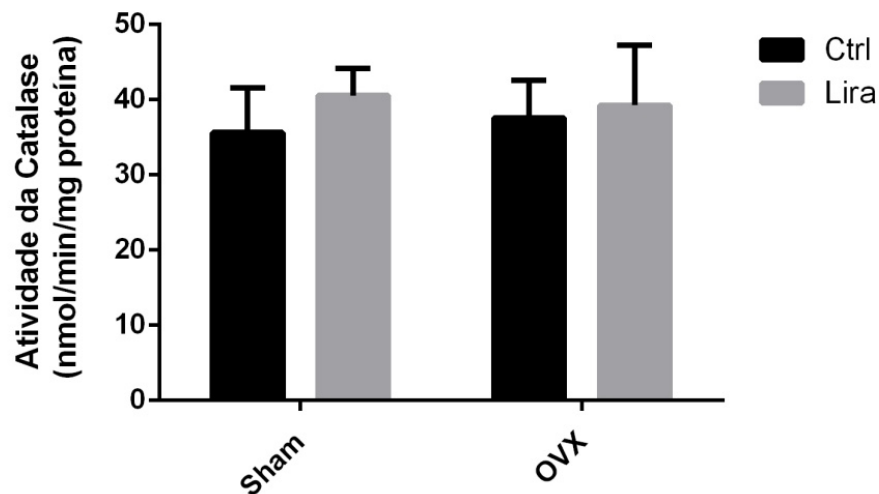


6.2 CATALASE

Os resultados relacionados à atividade da enzima catalase (Figura 7) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento ou a castração ao final do período de 2 meses.

Figura 7: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da Catalase.

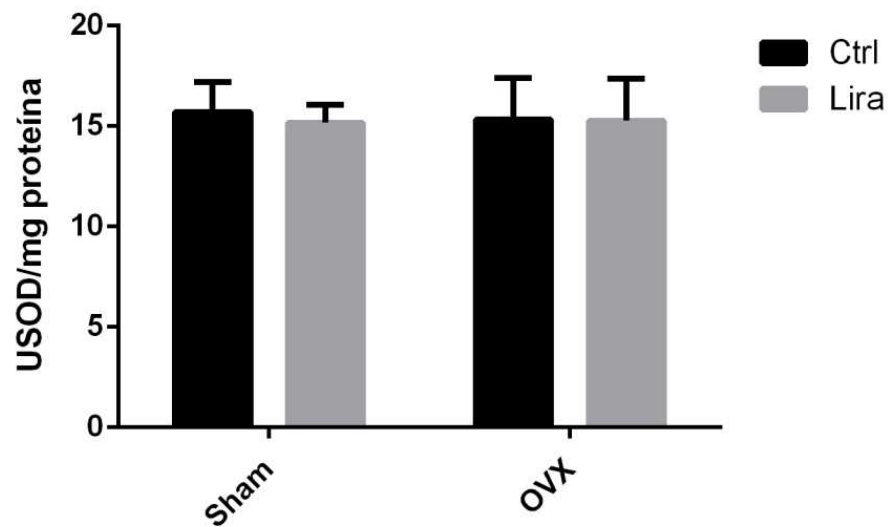
Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N = 6-7 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. Sham: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como média \pm desvio padrão. $P > 0,5$.



6.3 SUPERÓXIDO DISMUTASE

Os resultados relacionados à atividade da enzima SOD (Figura 8) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento ou a castração ao final do período de 2 meses.

Figura 8: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da Superóxido Dismutase. Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N = 6-7 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. Sham: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como média \pm desvio padrão. $P > 0,5$.

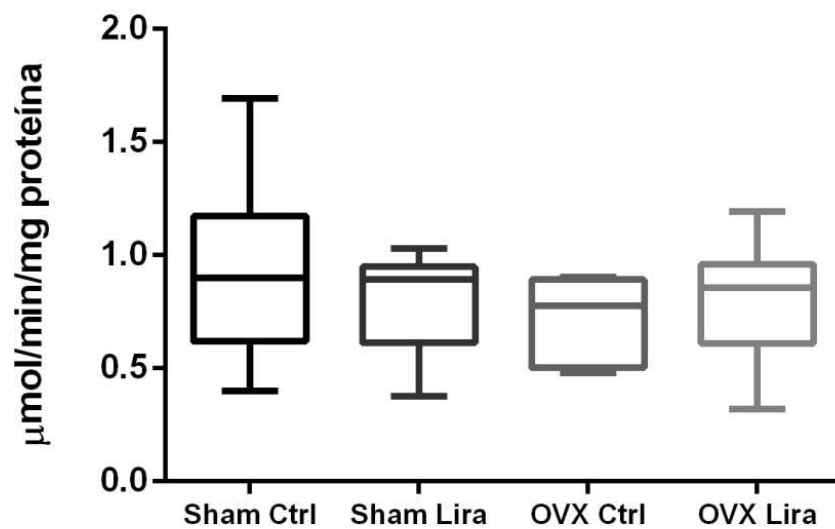


6.4 NADPH OXIDASE

Os resultados relacionados à atividade da enzima NADPH Oxidase (Figura 9) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento ou a castração ao final do período de 2 meses.

Figura 9: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a atividade da NADPH Oxidase.

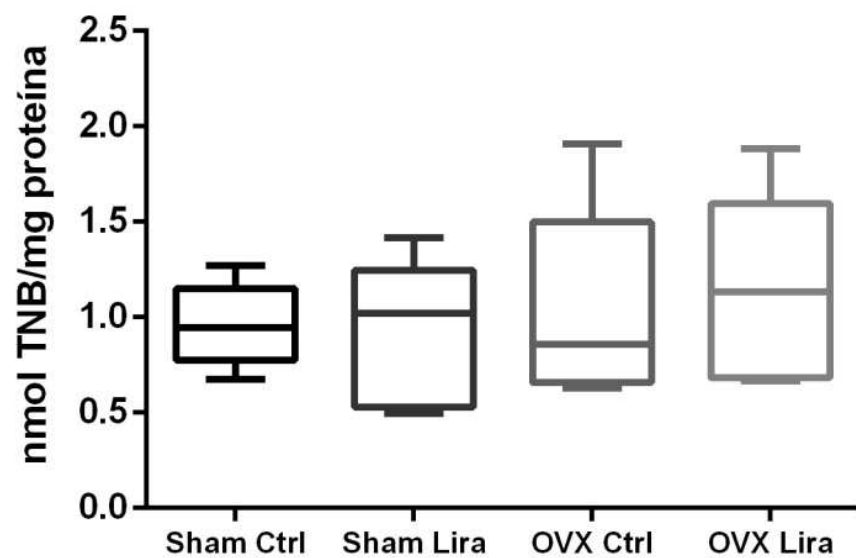
Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N=6-7 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. *Sham*: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como mediana \pm intervalo interquartílico. $P>0,5$.



6.5 SULFIDRILAS

Os resultados relacionados à oxidação de proteínas (Figura 10) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento ou a castração ao final do período de 2 meses.

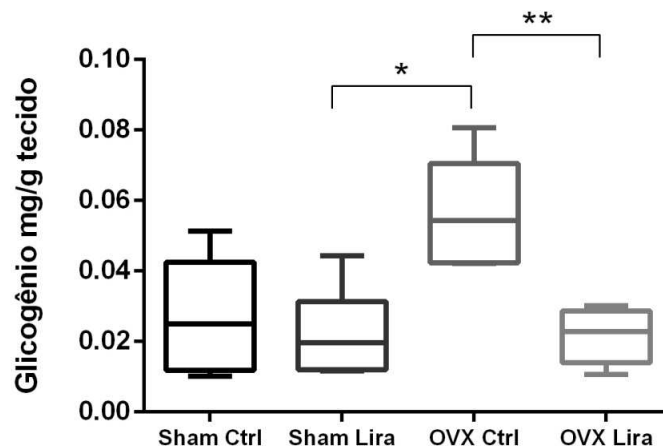
Figura 10: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre Sulfidrilas. Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N = 6-7 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. *Sham*: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como mediana \pm intervalo interquartílico. $P > 0,5$.



6.6 CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO

Os resultados relacionados à concentração de glicogênio (Figura 11) dos ventrículos demonstraram que o grupo castrado controle (tratado com salina) obteve maior concentração total de glicogênio em relação ao grupo castrado e ao grupo *Sham* tratados com Liraglutida. Entretanto, os grupos castrado e *Sham* tratados com Liraglutida não obtiveram diferenças estatísticas entre si, bem como os grupos tratados com Liraglutida (castrado e *Sham*) em relação ao grupo *Sham* controle.

Figura 11: Efeito da Liraglutida e da ovariectomia sobre a concentração total de glicogênio. Homogenato dos ventrículos esquerdo e direito. N = 6-8 para cada grupo. Ctrl: Tratados com salina. Lira: Tratados com Liraglutida. *Sham*: Cirurgia sem castração. OVX: Ovariectomizados. Valores expressos como mediana \pm intervalo interquartilico. *Diferença significativa entre OVX Ctrl e *Sham* Lira. **Diferença significativa entre OVX Ctrl e OVX Lira. $P < 0,5$



7 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi mostrada pela primeira vez a influência da redução dos estrogênios sobre o metabolismo do glicogênio cardíaco, associado ao impacto sobre o estado oxidativo ventricular. Além disso, o efeito benéfico da Liraglutida, um agonista dos receptores de GLP-1 e relevante na secreção da insulina, também foi demonstrado neste modelo.

A homeostase redox cardíaca das ratas foi avaliada pela determinação dos níveis de EROs total, da atividade da enzima pró-oxidante NOX, da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e dos níveis de danos oxidativos a proteínas pelos níveis de sulfidrilas. Não foram encontradas alterações significativas devido à castração ou ao tratamento com Liraglutida, sugerindo que a homeostase redox foi mantida. Em revisão bibliográfica detalhada sobre as diferenças sexuais em parâmetros de estresse oxidativo e mecanismos patofisiológicos cardíacos, Kander *et al.*, (2017) mostram que fêmeas apresentam tendência a ter menos estresse oxidativo do que machos e, quando analisados individualmente, os parâmetros apresentam resultados conflitantes. A atividade da CAT não apresentou diferenças após a castração no coração (BARP *et al.*, 2002) e no fígado de ratas (MORENO *et al.*, 2015), e a expressão gênica dessa enzima não modificou no plasma de mulheres submetidas a histerectomia total associada a salpingo-ooforectomia (BELLANTI *et al.*, 2013). A atividade da SOD diminuiu após a castração no coração (BARP *et al.*, 2002) mas não modificou no fígado de ratas (MORENO *et al.*, 2015). No plasma de mulheres submetidas à histerectomia total associada à salpingo-ooforectomia, a expressão gênica da SOD diminuiu (BELLANTI *et al.*, 2013). Logo ainda não há consenso sobre as alterações na SOD induzidas pela castração em fêmeas (KANDER *et al.*, 2017). Conforme KANDER *et al.*, (2017), ainda não há consenso se existem diferenças entre sexos na atividade da NADPH oxidase.

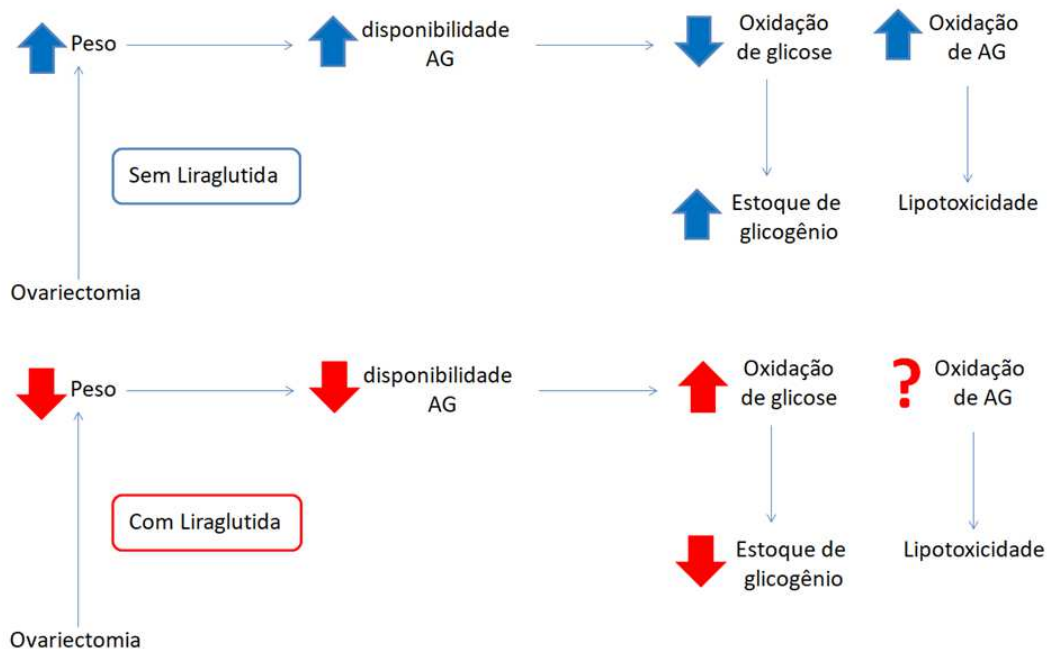
Apesar dos efeitos benéficos dos estrogênios sobre o dano oxidativo no tecido cardíaco (BARP *et al.*, 2002) e de estudos publicados demonstrarem depleção das enzimas SOD e catalase após a ovariectomia (CASTAÑEDA *et al.*, 2006), não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados em relação à ovariectomia ou ao tratamento com Liraglutida, o que seria sugestivo de adaptação do organismo ao longo de 2 meses de tratamento. A grande dispersão nos dados referentes a

danos oxidativos de proteínas nos grupos castrados tratados com Liraglutida e salina reforça essa hipótese.

A redução nos níveis de estrogênios durante a menopausa é acompanhada por várias alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos, desencadeadas por alterações na expressão de enzimas-chave em vias metabólicas, tais como a hexoquinase, frutose 2,6 bifosfatase, lipoproteína lipase (LPL) e transportadores de glicose (GLUT3, GLUT4) (LIZCANO, GUZMÁN, 2014). O estradiol modula a atividade da LPL, aumentando os níveis de AG plasmáticos (LIZCANO, GUZMÁN, 2014). O coração utiliza majoritariamente AG como fonte de energia, sendo esse responsável por aproximadamente 80% da formação de ATP (BROWNSEY; BOONE; ALLARD 1997), e essa preferência aumenta quando há maior disponibilidade de AG, como em casos de obesidade ou diabetes (BATRAN; ALMUTAIRI; USSHER, 2018). Porém, um desequilíbrio na utilização de substratos, como excessiva oxidação e captação de AG, leva a lipotoxicidade com conseqüente diminuição da eficiência cardíaca, seja por formação de ceramidas ou aumento do consumo de oxigênio do miocárdio (MVO_2) (BUGGER; ABEL, 2009). Aliado a isso, o prejuízo na sinalização da insulina e na sua cascata de sinalização leva ao acúmulo intracelular de Ca^{+2} , o que contribui para rigidez cardíaca. O acúmulo de AG, bem como ganho de peso de tecido adiposo decorrente da castração, é um fator predisponente para o desenvolvimento dessa patologia cardíaca (HONG *et al.*, 2009).

A castração aumentou a concentração de glicogênio no coração das ratas e o tratamento com liraglutida reverteu esse aumento (Figura 11). Em protocolo similar, a castração de ratas aumentou o peso corporal e o tratamento com Liraglutida reverteu esse ganho de peso, além de aumentar a oxidação de ^{14}C -Glicose nos tecidos adiposos gonadal e perirrenal (Model, dados ainda não publicados). Dessa forma sugere-se que após a castração, ocorreu possível resistência à insulina e aumento nos níveis de AG circulantes, os quais passaram a ser utilizados como principal substrato oxidativo pelo coração (LAUGHLIN *et al.*, 1994), possibilitando o acúmulo de glicose na forma de glicogênio. O tratamento com Liraglutida preveniu o desenvolvimento de resistência à insulina, possivelmente aumentou a oxidação da glicose como no tecido adiposo, melhorando o perfil glicêmico e de AG, induzindo a normalização do metabolismo cardíaco (Figura 12).

Figura 12: Hipótese do mecanismo regulatório da Liraglutida sobre o metabolismo de carboidratos no coração



8 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que a Liraglutida exerceu efeitos metabólicos no tecido cardíaco. A diminuição da síntese de glicogênio no grupo OVX Lira em relação ao grupo OVX Ctrl sugere que a Liraglutida exerce efeito benéfico no metabolismo cardíaco após a ovariectomia. Como perspectiva, é sugerido avaliar os efeitos da Liraglutida sobre a oxidação de lipídios e glicose, bem como avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo ao longo do tratamento para monitoramento da resposta adaptativa das ratas perante a diminuição de estrogênios.

9 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R.; Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.

BABAEI, P.; MEHDIZADEH, R.; ANSAR, M. M.; DAMIRCHI, A. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. **Menopause International**, v. 16, p. 100-104, 2010.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2131-2157, 2007.

BAGGIO, L. L.; USSHER, J. R.; MCLEAN, B. A.; CAO, X.; KABIR, M. G.; MULVIHILL, E. E.; MIGHIU, A. S.; ZHANG, H.; LUDWIG, A.; SEELEY, R. J.; HEXIMER, S. P.; DRUCKER, D. J. The autonomic nervous system and cardiac GLP-1 receptor control heart rate in mice. **Molecular Metabolism**, v. 6, p.1339, 1349, 2017.

BARP, J.; ARAÚJO, A. S. R.; FERNANDES, T. R. G.; RAGATOO, K. V.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1075-1081, 2002.

BATRAN, R. A.; ALMUTAIRI, M.; USSHER, J. R. Glucagon-like peptide-1 receptor mediated control of cardiac energy metabolism. **Peptides**, v.100, p. 94-100, 2018.

BELLANTI, F.; MATTEO, M.; ROLLO, T.; ROSARIO, F.; GRECO, P.; VENDEMIALE, G.; SERVIDDIO, G. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. **Redox biology**, v. 1, p. 340, 346, 2013.

BUGGER, H.; ABEL, E. D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. **Diabetologia**, v. 57, p. 600-671, 2014.

BUGGER, H.; ABEL, E. D. Rodents modelo of diabetic cardiomyopathy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, p. 454-466, 2009.

BROWN, E. T., UMINO, Y.; LOI, T., SOLESSIO, E. & BARLOW, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**, v. 22, p. 615–618, 2005.

BROWNSEY, R. W.; BOONE, A. N.; ALLARD, M. F. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. **Cardiovascular Research**, v. 34, p. 3-24, 1997.

CAN, J. V.; JENSEN, C. B.; FLIN, A.; BLAAK, E. E.; SARIS, W. H. M. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycaemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. **International Journal of Obesity**, v. 38, p. 784-793, 2014.

CAO, X.; XU, P.; OYOLA, M. G.; XIA, Y.; YAN, X.; SAITO, K.; ZOU, F.; WANG, C.; YANG, Y.; HINTON JR, A.; YAN, C.; DING, H.; ZHU, L.; YU, L.; YANG, B.; FENG, Y.; CLEGG, D. J.; KHAN, S.; DIMARCHI, R.; MANI, S. K.; TONG, Q.; XU, Y. Estrogens stimulate serotonin neurons to inhibit binge-like eating in mice. **The journal of clinical investigation**, v. 124, p. 4351-4362, 2014.

CANTINI, G.; MANNUCCI, E.; LUCONI, M. Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, p. 427- 438, 2016.

CASTAÑEDA, J. R. M.; MUNTANÉ, J.; MUÑOZ, M. C.; BUJALANCE, I.; MONTILLA, P.; TÚNEZ, I. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicology letters**, v. 160, p. 196-203, 2006.

GODOY, M. R. C.; SWANSON, K. S. Nutrigenomics: Using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. **Journal of animal science**, 2014.

HAYAT, S. A.; PATEL, B. KHATTAR, R. S.; MALIK, R. A. Diabetic Cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. **Clinical science**, v. 107, p. 539-557, 2004.

HONG, J.; STUBBINS, R. E.; SMITH, R. R.; HARVEY, A. E.; NÚÑEZ, N. P. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, p. 8-11, 2009.

IDRIS A.I. Ovariectomy/Orchidectomy in Rodents. **Methods in Molecular Biology In: Helfrich M., Ralston S. Bone Research Protocols**, Humana Press, Totowa, NJ, v. 816, p. 545-551, 2012.

JIA, G.; CONNELL, A. W.; SOWERS, J. R. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin-resistance-induced heart disease. **Diabetologia**, v. 61, p. 21-28, 2018.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v. 1, p. 244-257, 2013.

KANDER, M. C.; CUI, Y.; LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. **Journal of cellular and molecular medicine**, v.21, p. 1024-1032, 2017.

KIM, J. H.; CHO, T. C.; KIM, Y. J. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocrine Journal**, v. 61, p. 1055-1067, 2014.

LAUGHLIN, M. R.; TAYLOR, J.; CHESNICK, A. S.; BALABAN, R. S. Nonglucose substrates increase glycogen synthesis *in vivo* in dog heart. **American Physiological Society Journal**, v. 267, p. 219-223, 1994.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 2, p. 227-231, 1992.

LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. **Biomed research international**, v. 2014, 2014.

LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adrimycin and 4'-Epiadrimycin in Mice. **Tumori journal**, v. 71, p. 241-249, 1985.

LOVSHIN, J. A. Glucagon-like peptide 1 Receptor Agonists: A class update for treating type 2 diabetes. **Diabetes Canada**, v.41, p. 524-535, 2017.

LOVSHIN, J. A.; DRUCKER, D. J. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. **Nature reviews endocrinology**, v. 5, p. 262-269, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR, A. L.; RANDALL R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v 193,p. 265-275, 1951.

MARCONDES, F. K.; BIACHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phase of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARKLUND S. In: **Handbook of methods for oxygen radical research**. Boca Raton: CRC Press, p. 243-247, 1985.

MARSO, P. S.; BAIN, S. C.; CONSOLI A.; ELIASCHEWITZ, F. G.; JÓDAR, E.; LEITER, L. A.; LINGVAY, I.; ROSENSTOCK J.; SEUFERT, J.; WARREN, M. L.; WOO, V.; HANSEN, O.; HOLST, A. G.; PETTERSSON, J.; VILSBOLL, T. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 375, p. 1834-1844, 2016.

MATHEUS, A. S. M.; LUCIANNE, R. M. T.; COBAS, R. A.; PALMA, C. C. S.; NEGRATO, C. A.; GOMES, M, B. Impacto of diabetes on cardiovascular disease: na update. **Internation journal of hypertension**, v. 2013, 2013.

MELONI, A. R.; DEYOUNG, M. B.; LOWE, C.; PARKES, D. G. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, p. 15-27, 2013.

MORENO, F. V.; SHIMADA, L, B, C.; COSTA, S, C.; GARCIA, R. F.; CECCHINI, A. L.; NATALI, M. R. M.; VITORIANO, A. S.; IWAMOTO, E, L I.; PAGADIGORRIA, L. S. *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) improves the liver lipid metabolism and redox state in ovariectomized rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, 2015.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. **In: Manual de cuidados e procedimento cirúrgicos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**, p.141, 2013.

OKOSHI, K.; GUIMARÃES, J. F. C.; MUZIO, B. P. D.; FERNANDES, A. A. H.; OKOSHI, M. P. Miocardiopatia diabética. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabolismo**, v. 51, p. 160-167, 2007.

Organização Mundial da Saúde, 2016. Available at: www.who.int

OSTO, M.; LUTZ, T. A. Translational value of animal models of obesity-Focus on dog and cats. **European journal of phamacology**, v. 759, p. 240-252, 2015.

PARK, H. S.; PARK, J. Y.; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. **Diabetes research and clinical practice**, v. 69, p. 29-35, 2005.

Pet Obesity Prevetion, 2017. Available at: www.petobesityprevention.org

POZZA, C.; ISIDORI, A. M. What's behind the obesity pandemic. **Imaging in bariatric surgery**, p. 1-8, 2018.

RAVASSA, S.; ZUDAIRE, A.; DÍEZ, J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. **Cardiovascular research**, v. 94, p. 316-323, 2012.

SARAIVA, F. K.; SPOSITO, A. C. Cardiovascular effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists. **Cardiovascular diabetology**, p. 130-142, 2014.

URIBE, J. H.; VITGER, A. D.; RITZ, C.; FREDHOLM, M.; BJORNVAD, C. R.; CIRERA, S. Physical training and weight loss in dogs lead to transcriptional changes in genes involved in the glucose-transport pathway in muscle and adipose tissues. **The Veterinary Journal**, V. 208, P. 22–27, 2016.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 256-265, 1965.

VICENOVÁ, B.; VOPÁLENSKÝ, V.; BURÝSEK, L.; POSPÍSEK. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular disease. **Physiological research**, v. 58, p. 481-498, 2009.

VRANG, N.; LARSEN, P. J. Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: Role of peripherally secreted and centrally produced peptides. **Progress in neurobiology**, v. 92, p. 442-462, 2010.

WEI, Y.; SOWERS, J. R.; NISTALA, R.; GONG, H.; UPTERGROVE, G. M. E.; CLARK, S. E.; MORRIS, E. M.; SZARY, N.; MANRIQUE, C.; STUMP, C. S. Angiotensin II-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. **Journal of biological chemistry**, v. 281, p. 35137-35146, 2006.

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 354, p. 270-282, 2006.

ZHANG, Q.; XIAO, X.; ZHENG, J.; LI, M.; YU, M.; PING, F.; WANG, T.; WANG, X. Liraglutide protects cardiac function in diabetic rats through the PPAR α pathway. **Bioscience reports**, v. 38, 2018.