

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JULIANA ROMEU MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIRAGLUTIDA, UM ANÁLOGO DO GLP-1, NA  
PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3 E1**

Porto Alegre

2016

JULIANA ROMEU MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIRAGLUTIDA,  
UM ANÁLOGO DO GLP-1, NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS PRÉ-  
OSTEOBLÁSTICAS MC3T3 E1**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2016

"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes."

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e minha irmã pelo incentivo, apoio, amor incondicional, compreensão e por acreditarem no meu sucesso. Agradeço aos meus pais por me darem a oportunidade de estudar, de realizar meus sonhos, de me mostrarem que sou capaz de ir longe e não deixarem que eu desistisse dos meus sonhos. Muito obrigada!

À minha tia Regina por todo carinho e apoio, mesmo não estando na mesma cidade, e pela ajuda para concluir a minha dissertação.

Ao meu orientador, por todos os momentos de sabedoria e ensinamentos, por acreditar no meu potencial e pelo seu incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS, a CAPES pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus colegas Eduardo Carbelon, Gabriela Viegas Haute, Gabriele Catyana Krause e Ana Letícia Vargas Barcelos, pela amizade e por todos os ensinamentos.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biofísica Celular e Inflamação pelo companheirismo.

Aos meus avós e à Pera por estarem sempre ao meu lado, me dando apoio durante todas as etapas da minha vida.

Aos meus familiares e meus amigos por compreenderem os meus momentos de ausência, pelo incentivo de ir atrás do meu sonho e por dividirem comigo momentos de alegrias e tristezas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

A liraglutida é uma terapia baseada no hormônio GLP-1 utilizada como tratamento alternativo para a diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O medicamento, além do efeito hipoglicemiante, tem sido associado à prevenção de doenças cardiovasculares, diminuição dos lipídeos no sangue e à ação anti-inflamatória. Relatos indicam, porém, que a liraglutida pode aumentar o risco de câncer de tireoide e provocar pancreatite. Além disso, estudos demonstram que alguns análogos do GLP-1 têm efeito ósseo deletério, enquanto outros têm efeito benéfico. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da liraglutida sobre o crescimento de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1). Os resultados têm demonstrado que a liraglutida diminuiu significativamente o número de células sem induzir a apoptose. O mecanismo deste efeito está associado à produção de espécies reativas de oxigênio, que resulta em um aumento da autofagia das células, indicando, desta forma, que pode afetar a formação óssea.

Palavras-chaves: Liraglutida, MC3T3-E1, autofagia, apoptose, pré-osteoblastos

## ABSTRACT

The liraglutide is a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) based therapy and an alternative treatment to type 2 diabetes mellitus (T2DM). Apart from its hypoglycemic effect, the drug has been also associated with the prevention of cardiovascular diseases, regulation of blood lipid and anti-inflammatory action. Reports indicate, however, that liraglutide can increase the risk of thyroid cancer and cause pancreatitis. Besides, studies demonstrated that some analogues of GLP-1 have a deleterious bone effect, while others demonstrated to be benefic to the bone. The aim of this study was to evaluate the effect *in vitro* of liraglutide in mouse pre-osteoblastic cells, MC3T3-E1. The results demonstrated that liraglutide significantly decreased the number of viable cells without inducing apoptosis. The mechanism of this effect is associated to the reactive oxygen species production (ROS), which resulted in an increase of cell autophagy. The decreased number of viable cells indicates therefore that liraglutide may affect the bone formation.

Keywords: Liraglutide, MC3T3-E1, autophagy, apoptosis, pre-osteoblast

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ambra 1 – Molécula ativadora na autofagia regulada por beclina-1

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APAF-1 – Fator apoptótico de ativação protease 1

ATP – Adenosina trifosfato

BAK – Assassino 1 antagonista de BCL-2

BAX – Proteína X associada ao BCL-2

BCL-2 – Proteína 2 de linfoma de célula  $\beta$

BCL-XL – Gene relacionado ao BCL-XI, isoforma longa

Bif-1 – Fator de interação BAX-1/ endofilina B

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPP-IV – Dipeptil-peptidase IV

DRAM – Gene modulador de autofagia induzida por dano

EMEA – Agência Europeia de Medicamentos

ER – Retículo endoplasmático

ERK 1 /2 – Proteína cinase ativada por sinal extracelular 1/2

FADD – Domínio de morte associada a Fas

FasL – Fas ligante

FDA – Food and Drug Administration

GIP – Polipeptídeo inibidor gástrico

GLP-1 – Glucagon-like peptide-1

GLP-1R – Glucagon-like peptide 1 receptor

GLUT 1/2 – Transportador de glicose por difusão facilitada 1/2

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$

LC3 – Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos

LPS – Lipopolissacarídeo

MCL-1 – Leucemia de células mielóides 1

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

PI3K – Fosfatidilinositol3-quinase

TGF $\beta$ 1 – Fator de transformação do crescimento  $\beta$ 1

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

UVRAG – Gene associado à resistência à irradiação UV

VDCC – Canais Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem do tipo L

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
1.1 GLP-1 .....	8
1.1.1 Mecanismo de Ação.....	8
1.1.2 Efeitos Sistêmicos do GLP-1.....	9
1.1.2.1 Efeitos anti-inflamatórios.....	10
1.1.2.2 Efeitos no controle do apetite e do peso.....	10
1.1.2.3 Efeitos ósseos.....	11
1.2 Liraglutida.....	12
1.3 Principais sistemas que regulam a proliferação celular.....	15
1.3.1 Apoptose.....	15
1.3.2 Autofagia.....	16
1.3.3 Ciclo celular.....	18
1.4 Estresse oxidativo.....	18
1.5 Células MC3T3 E1 .....	19
2 JUSTIFICATIVA .....	21
3 OBJETIVOS .....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
4 ARTIGO CIENTÍFICO .....	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
6 REFERÊNCIAS.....	58
7 ANEXO.....	64

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GLP-1

O *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) é uma substância que regula o metabolismo da glicose através do aumento da liberação de insulina e inibição da secreção de glucagon, portanto é uma incretina (1). Secretado pelas células L intestinais em resposta à glicose e outros nutrientes ingeridos, o GLP-1 induz a secreção de insulina através do *glucagon-like peptide 1 receptor* (GLP-1R), mecanismo este regulado pela glicose. O GLP-1R também está envolvido no controle da glicose pelos agonistas do GLP-1 (2).

### 1.1.1 Mecanismo de Ação

O seu mecanismo de ação inclui a interação com um receptor que pertence à subfamília dos receptores de glucagon acoplados à proteína G nas células  $\beta$ - pancreáticas, que leva a liberação de insulina quando há um aumento da glicemia (3). Esse mecanismo começa com a entrada da glicose nas células  $\beta$  pancreáticas através dos transportadores de glicose por difusão facilitada 1/2 (GLUT1/2). O metabolismo da glicose leva a um aumento das concentrações de adenosina trifosfato (ATP) que atuam inibindo os canais de  $K^+$ -ATP dependentes, impedindo a saída deste íon da célula, o que leva à despolarização da membrana e abertura de canais  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L (VDCC). Além desses efeitos, os canais de cálcio do retículo endoplasmático (ER) são ativados, o que permite a liberação de cálcio das reservas intracelulares, ajudando na exocitose da insulina, conforme a figura 1 (2). O GLP-1 é rapidamente degradado pela enzima dipeptil-peptidase IV (DPP-IV), com isso resultando a uma meia-vida curta da forma ativa do GLP-1 (<2 minutos) (4, 5).

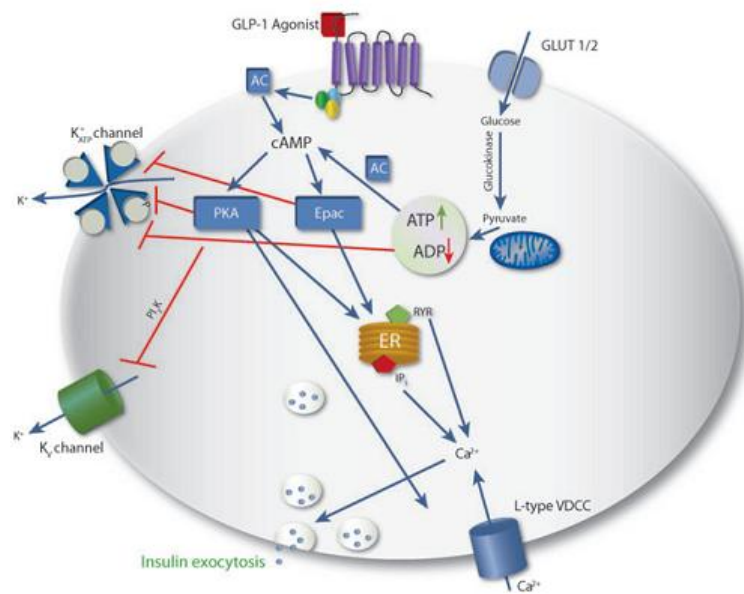


Figura 1. Visão geral esquemática das principais cascatas de sinalização envolvidas na secreção de insulina (2).

### 1.1.2 Efeitos Sistêmicos do GLP-1

Além do seu efeito sobre o metabolismo da glicose, outras importantes ações fisiológicas do hormônio foram identificadas no fígado, nas células lipídicas, no rim, nos vasos sanguíneos, no músculo esquelético, no pâncreas, no coração e no cérebro, como está demonstrado na figura 2. Com a intensificação dos estudos sobre essa substância, recentemente foram identificados efeitos anti-inflamatórios, no controle do apetite e do peso e sobre o tecido ósseo (6).

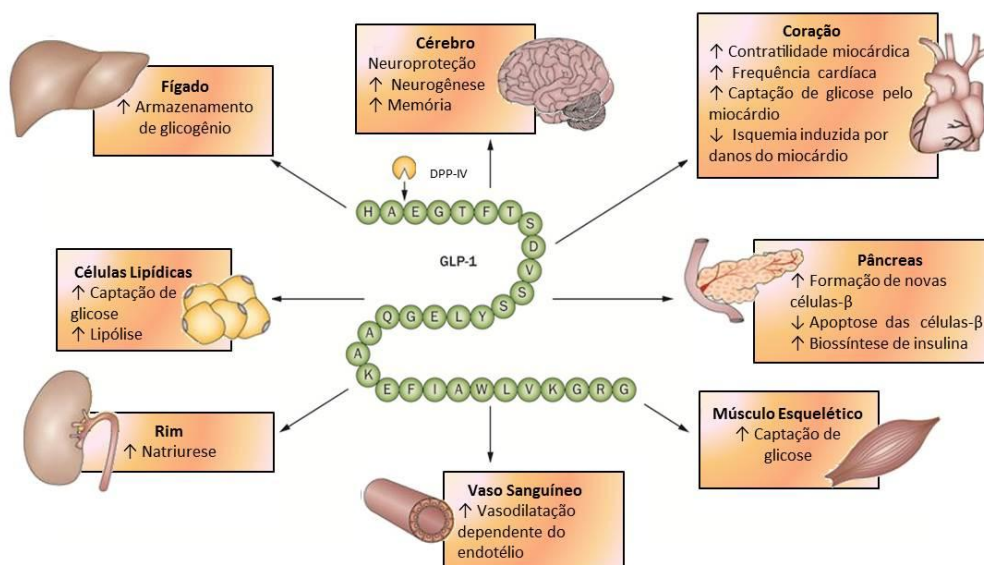


Figura 2 Efeitos pleiotrópicos do GLP-1 ou agonistas do GLP-R em vários tecidos e órgãos em condições experimentais (adaptado de Meier J.J, 2012) (6).

### 1.1.2.1 Efeitos anti-inflamatórios

O GLP-1 e seus análogos possuem propriedades anti-inflamatórias (7) e têm se mostrado capazes de reduzir os mediadores pró-inflamatórios, como interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (8) e o estresse oxidativo induzido por fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (9). A IL1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que reduz a transmissão neuronal, enquanto aumenta a sinalização relacionada com a apoptose (8). Além disso, um agonista do GLP-1R, exendin-4, pode reduzir a adesão dos monócitos ao endotélio da aorta em uma resposta inflamatória na aterosclerose (10). Um outro estudo verificou que o GLP-1 protege o endotélio mesentérico da lesão provocada por LPS através da redução da liberação de citocinas e quimiocinas em camundongos (10, 11).

### 1.1.2.2 Efeitos no controle do apetite e do peso

O GLP-1 tem efeito no comportamento alimentar, estando relacionado com a redução da motilidade intestinal e a efeitos diretos sobre os centros hipotalâmicos, já que os GLP-1R são encontrados em núcleos específicos no hipotálamo (2, 12-14). A administração aguda do GLP-1 em humanos e roedores induz a saciedade e reduz a ingestão calórica. A administração de um

antagonista do GLP-1R, exendin 9-39, anulou o efeito do GLP-1 e pode promover o ganho de peso (15). Em humanos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), a administração a curto prazo de GLP-1 ou exendin-4 inibe o apetite e a ingestão de alimentos, sugerindo que a longo prazo poderia promover a perda de peso nos diabéticos (14, 16, 17).

### **1.1.2.3 Efeitos ósseos**

O papel fisiológico do GLP-1 no osso não está completamente definido. O GLP-1R é expresso nas células C da tireóide que sintetizam calcitonina. A calcitonina é um potente inibidor da reabsorção óssea osteoclástica, e o GLP-1 pode contribuir para reduzir a reabsorção óssea. A ausência do GLP-1R em camundongos por knockout induziu a uma osteopenia cortical e a um aumento da fragilidade óssea, assim como a um aumento do número e da atividade de osteoclastos. Embora o GLP-1 não tenha tido nenhum efeito direto nos osteoclastos e osteoblastos, os camundongos knockout para o GLP-1R mostraram níveis elevados de deoxipiridinolina urinária, que é um marcador de reabsorção óssea, e uma menor transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de calcitonina em células C da tireóide. Esses resultados confirmam que o GLP-1 endógeno contribui para o controle da reabsorção óssea, provavelmente através de uma via dependente de calcitonina (18). Além disso, esses resultados mostram que a alteração genética na sinalização do GLP-1R resulta em osteopenia cortical e fragilidade óssea devido ao aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos, em associação com a redução da expressão da calcitonina na tireóide (18).

Estudos em modelos animais sugerem que as incretinas, como o GLP-1 e o polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), podem aumentar a densidade mineral óssea (13, 19). Um estudo investigou a resistência óssea em um modelo de ratos com deficiência no GLP-1R para compreender como o GLP-1/GLP-1R poderia afetar a resistência óssea. Eles observaram a partir dos seus resultados que há uma redução na resistência óssea nesses animais. O GLP-1R também é expresso nos núcleos paraventricular, arqueado e dorsomedial do hipotálamo, sendo que algumas dessas regiões estão envolvidas no controle central da remodelação óssea pelos osteoblastos, como por exemplo,

as alterações na qualidade do osso podem ser resultado do revezamento da ativação/inativação de centros específicos (20).

## **1.2 Liraglutida**

A terapia baseada no hormônio GLP-1 tem atraído atenção como uma alternativa de tratamento para a DM2. O GLP-1 se mostrou eficaz em melhorar o controle glicêmico em estudos preliminares se administrado por injeção subcutânea em pacientes com DM2. Contudo, o GLP-1 é rapidamente degradado pela DPP-IV, fazendo com que seja a principal limitação do seu uso no tratamento da diabetes (5). Com isso, agonistas do GLP-1R resistentes ao DPP-IV foram desenvolvidos para solucionar esse problema.

O primeiro análogo do hormônio a ser licenciado foi a exenatida, em 2005, que apresenta 53% de homologia com o GLP-1 humano (21). O segundo a ser lançado foi a liraglutida, aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em julho de 2009, pelo Food and Drug Administration (FDA) em janeiro de 2010 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em março de 2010. A liraglutida tem 97% de homologia com o GLP-1 humano (22). A diferença entre eles é que uma lisina é substituída por uma arginina no N-terminal e é adicionada uma cadeia de ácido graxo a uma lisina, como mostra a figura 3 (23).

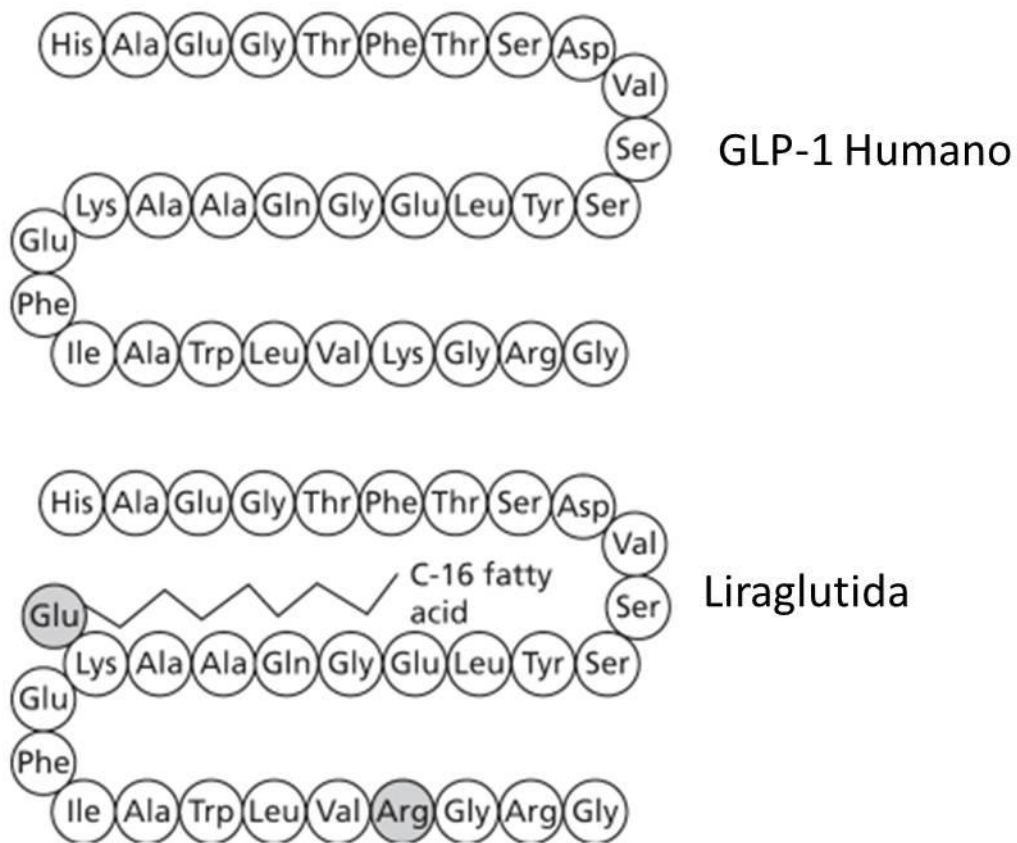


Figura 3. Estrutura do GLP-1 humano e da liraglutida (adaptado de Knudsen L.B, 2010) (23).

Os agonistas dos receptores GLP-1 e inibidores da enzima DPP-IV têm mostrado eficácia em melhorar o controle glicêmico, minimizando tanto a hiperglicemia quanto a hipoglicemia (2, 9). O mecanismo de ação da liraglutida é estimular a liberação de insulina pelo pâncreas de uma forma proporcional aos níveis de glicose (24, 25), mas também pode reduzir o glucagon, caso este esteja elevado, em relação inversa à glicose. Desta forma, caso a glicose esteja elevada, o fármaco irá estimular a secreção da insulina e inibirá o glucagon (24, 25). No caso de hipoglicemia, o fármaco diminui a liberação de insulina, não afetando, portanto, os níveis de glicose em pessoas não diabéticas (24, 25).

Quanto aos efeitos anti-inflamatórios desses agonistas, verificou-se que a exenatida e a liraglutida podem reduzir os níveis séricos de Proteína C reativa, do inibidor do plasminogênio-1 e de outros marcadores inflamatórios que têm sido associados à doenças inflamatórias e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (26). Os efeitos anti-inflamatórios do GLP-1 também

foram relatados em células endoteliais vasculares humanas, nas quais a liraglutida diminuiu a produção de óxido nítrico e suprimiu o fator de ativação nuclear KB (26).

Os análogos do GLP-1 podem apresentar efeitos adversos nas glândulas da tireoide, já que o GLP-1R está expresso em humanos e em roedores (27). Em longo prazo, a ativação do GLP-1R está associada com os níveis aumentados de calcitonina, com a proliferação das células C e com a formação de tumor em ratos e camundongos (27, 28). Estudos pré-clínicos com animais demonstraram que roedores tratados com liraglutida tinham uma maior incidência de formação de tumores das células C e hiperplasia (29). Bjerre Knudsen et al observaram que os agonistas do GLP-1R, como a exenatida e a liraglutida, ativam a liberação de calcitonina nas células C da tireoide de roedores de uma maneira dependente da calcitonina, sugerindo que os análogos do GLP-1 estão associados com um aumento do risco de hiperplasia das células de tireoide e tumores de células C. Contudo, o mesmo estudo verificou que após a administração da liraglutida em macacos, não houve um aumento na liberação da calcitonina ou na proliferação das células C da tireoide. Os pesquisadores observaram que a expressão dos GLP-1R em células C da tireoide humana foi menor que em células C de rato (27).

A liraglutida apresenta eventos gastrointestinais adversos, especialmente náuseas, vômitos, diarreia e constipação (30). Estudos têm observado que a liraglutida pode aumentar o risco de pancreatite. Um estudo clínico da liraglutida no tratamento da diabetes relatou setes casos de pancreatite aguda entre 4 257 pacientes tratados com liraglutida, e somente um caso em 2 381 pacientes no grupo que não fez o uso do medicamento (29). Contudo, Davies et al não observaram casos de pancreatite aguda quando avaliaram a eficácia da liraglutida para o controle de peso em adultos com sobrepeso ou obesos com diabetes tipo 2 (30).

Zhao et al, relataram que a liraglutida aumentou os níveis de proteínas pró-apoptóticas proteína X associadas ao BCL-2 (BAX) e caspase-3 clivada quando investigaram seu efeito em duas linhas celulares de câncer pancreático humano (MIA PaCa-2 and PANC-1), promovendo a apoptose. Além disso, observaram que a liraglutida atenua o crescimento do tumor pancreático em xenoinxerto. O estudo sugere que esses efeitos são dependentes e mediados



pela ativação da adenosina monofosfato cíclico (cAMP), pela inibição da Akt e na sinalização da proteína cinase ativada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1 /2) (31). Outro estudo observou que a liraglutida também tem um efeito benéfico em esteatose hepática, já que aumenta a autofagia em células com esteatose hepática, podendo, com isso, ser um mecanismo que leva a uma melhora dessa condição (32). Uma pesquisa demonstrou que a adição da liraglutida em meio com alta concentração de glicose aumentou significativamente a viabilidade das células da linhagem de células epiteliais tubulares renais humanas (HK-2), pois inibiu a apoptose e diminuiu significativamente a autofagia (33).

Pacientes com DM2 têm um risco elevado de fraturas e fragilidade óssea, mesmo que não seja tradicionalmente visto como uma das suas complicações (34). Uma meta-análise mostrou que a liraglutida está associada a uma redução do risco de fraturas ósseas em pacientes com DM2, enquanto a exenatida pode ser associada ao aumento do risco de fraturas, em comparação com outras drogas ativas ou placebo (35). Esses resultados mostram que os fármacos têm efeitos opostos sobre as fraturas ósseas, mesmo que outros estudos pré-clínicos e meta-análises usando inibidores de DPP-IV levassem a acreditar que o tratamento com o agonista de GLP-1R pudesse ter os mesmos efeitos benéficos sobre a saúde dos ossos (35).

### **1.3 Principais sistemas que regulam a proliferação celular**

#### **1.3.1 Apoptose**

A apoptose é melhor descrita como uma forma de morte celular programada que desempenha um papel tanto no desenvolvimento embrionário quanto no envelhecimento do organismo (36, 37). A apoptose envolve uma ativação controlada de proteases e outras hidrolases que rapidamente degradam as estruturas celulares (38, 39). Diferentemente da morte celular por necrose, na qual a membrana celular é rompida e há uma resposta inflamatória, a apoptose acontece dentro das fronteiras da membrana plasmática, sem afetar as células vizinhas (39). A condensação nuclear e citoplasmática, a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), a ativação das caspases e a remoção da célula morta por fagocitose e degradação lisossomal são características bioquímicas e morfológicas da apoptose (40,

41). Há duas vias principais para iniciar a apoptose, a intrínseca (ou mitocondrial) e a via extrínseca (38). Na via extrínseca há diversos sensores, como p53, que reagem em resposta a diferentes condições de estresse ou dano no DNA e ativam a cascata de sinalização que conduz a permeabilização da membrana mitocondrial externa. A apoptose iniciada ao nível mitocondrial é regulada pela família de proteínas proteína 2 de linfoma de célula  $\beta$  (BCL-2), entre elas estão as anti-apoptóticas (BCL-2, gene relacionado ao BCL-XI, isoforma longa (BCL-XL) e leucemia de células mielóides 1 (MCL-1)) e as pró-apoptóticas (BAX e assassino 1 antagonista de BCL-2 (BAK)) (38, 41). As diversas interações internas entre os membros da família de proteínas BCL-2, adicionadas aos vários caminhos que modulam os níveis e a atividade dessas proteínas, podem induzir ou evitar a apoptose mitocondrial (42). A liberação de proteínas no espaço intermembranar das mitocôndrias permeabilizadas permite a montagem do apoptossomo, um complexo de ativação de caspase formado por fator apoptótico de ativação protease 1 (Apaf-1), caspase-9 e citocromo c, resultando na ativação de caspases efetoras, que são responsáveis pela desmontagem das estruturas da célula (38). A via extrínseca é desencadeada com a ativação dos receptores extracelulares de morte, como TNF- $\alpha$  e Fas ligante (FasL). Essa ativação resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras como domínio de morte associadas a Fas (FADD), que se associam a pró-caspase 8 para formar um complexo de sinalização que induz a morte celular resultando na ativação da caspase 8. A caspase-8 cliva e ativa as caspases efetoras que desencadeiam a cascata de eventos proteolíticos levando a morte celular (41). Além disso, a p53 pode mediar a apoptose em resposta à agentes danificadores de DNA. Após o estresse, uma associação citoplasmática de p53 desloca-se rapidamente para a superfície mitocondrial, onde interage com membros da família de proteínas BCL-2, tanto os anti- e pró-apoptóticos, inibindo ou ativando, respectivamente, as suas funções e levando a apoptose (43, 44).

### **1.3.2 Autofagia**

Autofagia é uma degradação lisosomal e um processo de autodigestão (45-47), desempenha um papel importante no crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e homeostase celular (48). A autofagia protege a

célula contra vários estímulos citotóxicos através da degradação das organelas danificadas em estágios iniciais, contudo a autofagia excessiva pode levar a morte celular (45-47). Hipóxia, falta de nutrientes e estresse oxidativo são alguns dos vários estímulos citotóxicos que podem induzir autofagia (45, 48, 49). Níveis basais de autofagia são essenciais para a manutenção da homeostase celular pela remoção de organelas danificadas, agregados protéicos e proteínas de longa duração (50). Há três principais tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é a mais descrita, sendo responsável pela quebra de proteínas e organelas na célula (51). A microautofagia implica no recrutamento de componentes específicos em proximidade com a membrana lisossomal, que são diretamente englobados pelo lisossomo por meio de invaginações da membrana lisossomal. A autofagia mediada por chaperonas é especializada na quebra de proteínas citosólicas, na qual as proteínas com conformação incorreta permanecem com as proteínas chaperonas ligadas na sua estrutura e são translocadas para a membrana lisossomal através do reconhecimento da chaperona (51, 52). A macroautofagia normalmente é referida como autofagia e será assim referida na dissertação.

Na autofagia, há a formação de uma organela de membrana dupla que engloba os componentes celulares próprios, conhecida como autofagosossomo, que se funde com os lisossomos. Depois da fusão com o lisossomo, forma estruturas de membrana simples, chamadas de autofagolisossomos, onde o conteúdo é degradado (38). Um dos marcadores cruciais da autofagia é a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3), estando envolvida na elongação e na formação do autofagossomo (48, 53). A conversão da LC3I citosólica para a forma associada ao autofagossomo LC3II tem sido utilizada para monitorar o fluxo autofágico (54).

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) ativa um complexo enzimático multiprotéico formado pela fosfatidilinositol3-quinase (PI3K), Vps34, beclina 1, Vps15, gene associado à resistência à irradiação UV (UVRAG), fator de interação BAX-1/ endofilina B (Bif-1), molécula ativadora na autofagia regulada por beclina-1 (Ambra 1) e por outras proteínas. Esse complexo está envolvido na indução da autofagia. A mTOR é o principal alvo da rapamicina, que é um regulador negativo da autofagia (38). Além disso, tem se observado

uma relação entre a p53 e a autofagia. A autofagia pode ser induzida pela inibição da mTOR, por ativação da AMP quinase ou pela ativação do gene modulador de autofagia induzida por dano (DRAM), que codifica uma proteína lisossomal que induz a autofagia. Esses mecanismos podem ser estimulados pela p53 (44).

### **1.3.3 Ciclo celular**

O ciclo celular desempenha um papel importante no crescimento tecidual, no desenvolvimento e na regeneração de organismos multicelulares, apresentando uma série de eventos compostos por quatro fases: intervalo antes da replicação - fase G1, síntese de DNA - fase S, intervalo após a replicação do DNA - fase G2 e a mitose - fase M (55).

A parada do ciclo celular permite as células repararem os defeitos detectados pelos pontos de verificação durante a síntese de DNA e a segregação de cromossomos. A ativação destes pontos de verificação ativa a parada do ciclo celular, desta forma impedindo a transmissão dos defeitos para as células filhas (56). A p53 é um dos pontos de verificação que desencadeiam a parada do ciclo celular e a apoptose em resposta a diversos estresses celulares, como dano ao DNA, sinais hiperproliferativos, hipóxia, estresse oxidativo e falta de nutrientes (57). p53 pode induzir a parada do ciclo celular em G1 através da ativação da transcrição do inibidor quinase dependente de ciclina p21 e também pode regular a transição G2/M de acordo com o tipo de estresse celular (43).

### **1.4 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre o aumento da produção de oxidantes e/ou a diminuição das defesas antioxidantes, levando ao acúmulo de oxidantes. Estresse oxidativo pode estar relacionado ao dano da membrana celular a partir da peroxidação lipídica, alterações na estrutura e função da proteína devido à oxidação da proteína e aos danos estruturais ao DNA (58, 59). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são geradas como subprodutos do metabolismo celular tanto em condições normais quanto patológicas. Elas apresentam um papel importante na homeostase regulando os sinais de transdução envolvidos na proliferação e sobrevivência (51, 60). Quando a

formação de EROs e ERNs está desregulada e supera as defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo. O estresse oxidativo acontece quando ocorre a diminuição da capacidade das células de reparar a oxidação de biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, levando ao dano oxidativo. O estresse oxidativo e a formação de EROs/ERNs têm demonstrado que regulam a sinalização celular envolvida na morte celular programada por apoptose e/ou necrose (51, 61). Também foi verificado que o acúmulo de autofagossomos pode ser devido ao estresse oxidativo (51).

### **1.5 Células MC3T3 E1**

As células MC3T3-E1 são uma linhagem de células osteoblásticas estabelecidas a partir da calota craniana de camundongos C57BL/6 e selecionadas com base na elevada atividade da fosfatase alcalina no estado de repouso (62). Essas células têm a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e osteócitos e, ainda, depositarem hidroxiapatita na matriz óssea desenvolvida a partir da cultura (63). Esse processo pode ser observado em três fases diferentes: proliferação, diferenciação e mineralização (63, 64), conforme está demonstrado na figura 4. A MC3T3 E1 passa pela fase de proliferação durante os 10 primeiros dias (64). Esse período de desenvolvimento apresenta a expressão dos genes relacionados com o ciclo celular, com o crescimento celular e com os genes da matrix extracelular, como o colágeno tipo 1 (64). Em torno do 10<sup>o</sup> dia ao 20<sup>o</sup> dia ocorre a segunda fase do desenvolvimento, que seria a diferenciação. Há uma diminuição da taxa de proliferação dos pré-osteoblastos e eles se diferenciam para formar os osteoblastos (64). Durante esse estágio, a formação/maturação da matriz óssea é marcada pela elevação da expressão das proteínas da matrix extracelular, como colágeno tipo 1, fibronectina, fator de transformação do crescimento  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), osteonectina, fosfatase alcalina e osteopontina (64, 65). A última fase do desenvolvimento, a mineralização da matrix extracelular, é caracterizada pela expressão de proteínas envolvidas no processo de mineralização, como osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina (64). A MC3T3-E1 tem a capacidade de produzir colágeno e diferenciar-se em células semelhantes a osteoblastos, formando tecido calcificado *in vitro* de forma semelhante aos seus correspondentes *in vivo* (62, 63).

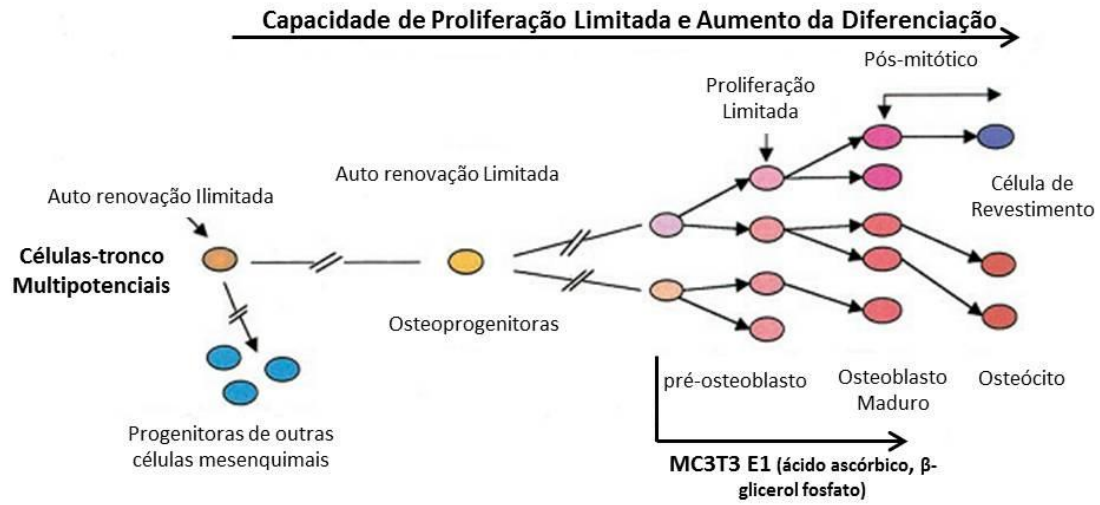


Figura 4. Sequência presumida de eventos envolvidos na diferenciação de osteoblastos a partir de uma população de células-troncos pluripotentes (adaptado de Raouf A.; Seth A., 2000) (64).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O GLP-1 pode ter um efeito sobre as células e a densidade óssea, contudo estudos realizados com agonistas do GLP-1R têm mostrado resultados conflitantes. Sendo assim, torna-se importante aprofundar os estudos sobre a ação da liraglutida sobre a homeostase do tecido ósseo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito da liraglutida sobre o crescimento de células pré-osteoblásticas (MC3T3 E1).

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar o efeito da liraglutida sobre o crescimento das células;
- Avaliar o efeito da liraglutida sobre a apoptose das células;
- Avaliar o efeito da liraglutida sobre a autofagia das células;
- Avaliar o efeito da liraglutida sobre o estresse oxidativo das células.



#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*

Fator de Impacto: 3.350

# Liraglutide induces autophagy in MC3T3-E1 by the increase of ROS production

Juliana Romeu Marques<sup>1</sup>, Gabriela Viegas Haute<sup>1</sup>, Gabriele Catyana Krause<sup>1</sup>, Bruno de Souza Basso<sup>1</sup>, Bianca Andrade Martha<sup>1</sup>, João Vitor Paim da Silva<sup>1</sup>, Paula Bacaicoa Caruso<sup>1</sup>, Denizar Alberto da Silva de Melo<sup>1</sup>, Betânia Souza de Freitas<sup>2</sup>, Leonardo Pedrazza<sup>1</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre-RS, Brasil.

\* To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, E-mail: julianarm08@gmail.com

## ABSTRACT

The liraglutide is a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) based therapy and an alternative treatment to type 2 diabetes mellitus (T2DM). Apart from its hypoglycemic effect, the drug has been also associated with the prevention of cardiovascular diseases, regulation of blood lipid and anti-inflammatory action. Reports indicate, however, that liraglutide can increase the risk of thyroid cancer and cause pancreatitis. Besides, studies demonstrated that some analogues of GLP-1 have a deleterious bone effect, while others demonstrated to be benefic to the bone. The aim of this study was to evaluate the effect *in vitro* of liraglutide in mouse pre-osteoblastic cells, MC3T3-E1. The results demonstrated that liraglutide significantly decreased the number of viable cells without inducing apoptosis. The mechanism of this effect is associated to the reactive oxygen species production (ROS), which resulted in an increase of cell autophagy. The decreased number of viable cells indicates therefore that liraglutide may affect the bone formation.

Keywords: Liraglutide, MC3T3-E1, autophagy, apoptosis, pre-osteoblast

## 1. INTRODUCTION

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a substance that regulates the glucose metabolism by stimulating the release of insulin and inhibiting the glucagon secretion (Parker et al., 2013). This mechanism is regulated by glucose (Meloni et al., 2013).

Therapy based on GLP-1 has drawn attention as an alternative treatment to type 2 diabetes mellitus (T2DM). The GLP-1 proved to be effective in enhancing glycemic control in preliminary studies of subcutaneous injections in patients with T2DM. However, the major limitation of the use of GLP-1 in the treatment of diabetes is its short half-life due to rapid degradation by dipeptidyl-peptidase IV enzyme (DPP-IV), which degrades the GLP-1 (Mentlein et al., 1993). To solve this problem, GLP-1R agonists and DPP-IV inhibitors have been developed. These drugs have demonstrated efficacy in improving glycemic control while minimizing both hyperglycemia and hypoglycemia (Meloni et al., 2013; Shiraki et al., 2012).

The first licensed analog of GLP 1 was the exenatide and the second the liraglutide (Drucker and Nauck, 2006; Madsen et al., 2007). The mechanism of action of these analogs is to stimulate the release of insulin by the pancreas in a manner proportional to glucose levels (Agersø and Vicini, 2003; Vella et al., 2002), although it can also reduce glucagon, in case it is high, in an inverse relation to glucose. Thus, if glucose is high, the drug will stimulate insulin secretion and inhibit glucagon (Agersø and Vicini, 2003; Vella et al., 2002). In case of hypoglycemia, the drug decreases the insulin release, not affecting therefore the glucose levels in non-diabetics (Agersø and Vicini, 2003; Vella et al., 2002).

Important physiological actions of the GLP-1 have been identified besides its effect on glucose metabolism, such as anti-inflammatory effects, effects on appetite control and weight loss, as well as effects on bone tissue. Even if not traditionally seen as one of its complications, patients with T2DM have bone fragility and a high fracture risk (Janghorbani et al., 2007). A meta-analysis demonstrated that liraglutide is associated with a reduced risk of bone fractures in patients with T2DM, while exenatide can be associated to increased risk of bone fractures, in comparison with other active drugs or placebo (Su et

al., 2014). These results indicate that the drugs have opposite effects on bone fractures, even if other preclinical studies and meta-analyses using DPP-IV inhibitors would lead to believe that treatment with GLP-1R agonist could provide the same beneficial effects on bone health (Su et al., 2014).

MC3T3-E1 cells are a pre-osteoblastic cell line established from the calvaria of C57BL/6 mice and selected based on the high activity of alkaline phosphatase in the rest state (Kodama et al., 1981). These cells have the capacity to differentiate into osteoblasts and osteocytes and also deposit hydroxyapatite bone matrix developed from the culture (Sudo et al., 1983). This process can be observed in three phases: proliferation, differentiation and mineralization (Raouf and Seth, 2000; Sudo et al., 1983). MC3T3-E1 cells have the ability to produce collagen and differentiate into similar osteoblast cells, forming *in vitro* calcified tissue similar to their correspondent *in vivo* (Kodama et al., 1981; Sudo et al., 1983). The objective of this study was to evaluate the effect of liraglutide in MC3T3-E1 cell proliferation.

## 2. MATERIALS & METHODS

2.1 MATERIALS: Following reagents were used: Liraglutide (Novo Nordisk), Minimum essential medium alpha medium ( $\alpha$ -MEM), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin/streptomycin, Trypan blue stain (0.4%) (Gibco - Life Technologies), TRIzol reagent, Rabbit anti-Mouse IgG, Mouse anti-GAPDH (Invitrogen), GoScript™ reverse transcription system (Promega), Lactate dehydrogenase assay kit (Labtest), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies), LC3 A/B antibody, Anti-rabbit IgG (Cell Signaling), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), Acridine orange, Rapamycin (Sigma-Aldrich), Enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting substrate kit (Abcam).

2.2 CELL CULTURE: The mouse pre-osteoblastic cells, MC3T3-E1, were a gift from PhD Francesc Ventura of Universitat de Barcelona, Spain. Cells were maintained in  $\alpha$ -MEM, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and incubated at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

2.3 LIRAGLUTIDE TREATMENT: Liraglutide was diluted in  $\alpha$ -MEM at a concentration of 6, 12 and 24 $\mu$ M. MC3T3-E1 cells were incubated and analyses were performed 96 hours after treatment. All experiments were performed in triplicates.

2.4 CELL VIABILITY: MC3T3-E1 cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well and treated with different concentrations of liraglutide (6, 12 and 24 $\mu$ M). The viability was performed by trypan blue exclusion assay. The experiment was repeated five times.

2.5 CITOTOXICITY: MC3T3-E1 cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well. Cell toxicity of different concentrations of liraglutide (12 and 24 $\mu$ M) was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) activity. LDH activity was assessed in culture supernatants using a commercial kit after treatment. The experiment was repeated four times.

2.6 RNA EXTRACTION AND RT-PCR: MC3T3-E1 cells were seeded into 6-well plates at a density of  $7.5 \times 10^4$  cells/well and treated with 12 $\mu$ M liraglutide for 96

hours. Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed into cDNA, using GoScript™ Reverse Transcription System according to the manufacturer's instructions. Table 1 shows the primers sets used. Polymerase chain reaction products were electrophoresed using 1.5% agarose gel containing ethidium bromide 5µg/mL. The gel was visualized using ultraviolet light and photographed. Band intensities were measured using the public domain National Institutes of Health Image program (Image J) and signals were expressed relatively to the intensity of the β-actin amplicon in each coamplified sample. The experiment was repeated three times.

**2.7 VISUALIZATION OF NUCLEAR MORPHOLOGY OF MC3T3-E1:** The cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well. After treatment with 12µM liraglutide, the supernatant was removed and cells were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 2 hours. Next, cells were washed again with PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 30minutes and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 2 minutes. Changes in nuclear morphology were visualized by fluorescence microscopy (Olympus IX71), for example, DAPI staining reveal that apoptotic cells shows nuclei with chromatin condensation and apoptotic bodies (Filippi-Chiela et al., 2012). The experiment was repeated four times.

**2.8 QUANTIFICATION OF ACIDIC VESICULAR ORGANELLES (AVOs):** Autophagy is characterized by the formation of AVOs. To detect AVOs, vital staining with acridine orange was performed (Kanzawa et al., 2003). Briefly, the cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well. After 96 hours of treatment with 12µM liraglutide and 10nM rapamycin (a positive control of autophagy), the cells were collected by trypsinization and resuspended in α-MEM medium with 1µg/mL acridine orange. Then, the cells were incubated for 10 minutes. To quantify the percentage of AVOs and the intensity of the red fluorescence, the acridine orange stained cells were measured with FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience) and analyzed using the FlowJo 10.0.8 software (Tree Star Inc., Ashland, OR). The experiment was repeated four times.

2.9 AVOs VISUALIZATION: Briefly, the cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well. After 96 hours of treatment with  $12\mu\text{M}$  liraglutide and  $10\text{nM}$  rapamycin (positive control), the supernatant was removed and the cells were stained with  $1\mu\text{g/mL}$  acridine orange in  $\alpha$ -MEM medium for 10 minutes. AVOs were visualized by fluorescence microscopy (Olympus IX71). The experiment was repeated four times.

2.10 WESTERN.BLOT: MC3T3-E1 cells were seeded into 6-well plates at a density of  $7.5 \times 10^4$  cells/well and treated with  $12\mu\text{M}$  liraglutide for 96 hours. Previously treated cells were lysed in lysis buffer ( $10\text{mM}$  pH 7.5 Tris-HCl,  $100\text{mM}$  NaCl,  $0.3\%$  CHAPS,  $50\text{mM}$  NaF,  $\beta$ -glycerol phosphate and protease inhibitors). The lysates ( $30\mu\text{g}$ ) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were stained with primary polyclonal antibodies - LC3 A/B (1:500) and GAPDH (1:2000) in a blocking buffer overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The membranes were incubated with the secondary antibodies - Rabbit Anti-Mouse IgG (1:5000) and Anti-Rabbit IgG (1:2500) for 2 hours at  $4^\circ\text{C}$ . The bands were detected using ECL Western Blotting Substrate kit. Band intensities were obtained using the ImageJ 3.0 program. The experiment was repeated three times.

2.11 MEASUREMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION: The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) of MC3T3-E1 cells was evaluated based on the intracellular peroxide-dependent oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), which forms a fluorescent compound, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, the cells were seeded into 12-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well. After 96 hours of treatment with  $12\mu\text{M}$  of liraglutide, the culture medium was removed. Cells were collected by trypsinization, washed twice with PBS and then incubated with  $250\mu\text{L}$ /well of phosphate buffer containing  $10\mu\text{M}$  of DCFH-DA at  $37^\circ\text{C}$  for 30 minutes. The fluorescence intensity was monitored with a VICTOR® microplate reader at an excitation wavelength of  $485\text{nm}$  and an emission wavelength of  $520\text{nm}$ . The experiment was repeated four times.



2.12 STATISTICS: The normality of the data was analyzed by the Shapiro-Wilk test. Measures were parametric, and the mean and standard deviation of the mean for each of the variables were calculated and then analyzed. The analysis of variance (ANOVA) and post hoc LSD Test were applied for multiple comparisons and Student's t-test was used for group comparisons. Differences were considered significant if the statistical analysis gave  $P < 0.05$ . Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 18.0 for Windows was used as a computational tool to analyze statistical data.

### 3. RESULTS

**3.1 EFFECT OF LIRAGLUTIDE ON CELL VIABILITY:** MC3T3-E1 cells were exposed to different concentrations of liraglutide (6, 12 and 24 $\mu$ M) in order to evaluate its effects on cell viability. After 96 hours of treatment, the concentrations of 6, 12 and 24 $\mu$ M demonstrated a significant decrease in the number of viable cells when compared with the control group (Figure 1). Therefore, we chose only the more relevant concentrations (12 and 24 $\mu$ M) for the following experiments.

**3.2 CYTOTOXIC EFFECT OF LIRAGLUTIDE:** The cell toxicity was tested through the release of LDH. The 24 $\mu$ M concentration increased significantly the LDH activity (Figure 2). Therefore, we chose for the next experiments the 12 $\mu$ M concentration that did not possess cytotoxic effects.

**3.3 EFFECT OF LIRAGLUTIDE ON BAX, BCL-2 AND p53 ON mRNA EXPRESSION AND ON APOPTOSIS:** To analyze the effect of liraglutide on apoptosis, we exposed the cells with 12 $\mu$ M concentration and analyzed the mRNA expression of BAX, BCL-2 and p53 to evaluate the effect of liraglutide. The treated cells did not show significant difference of BAX, BCL-2 and p53 expression when compared with the control group (Figure 3A, 3B and 3C). For the analysis of DAPI, the liraglutide did not show changes on the nuclear morphology when compared with the control group (Figure 4), suggesting that liraglutide does not have action on apoptosis and confirming the results demonstrated on Figure 3.

**3.4 EFFECT OF LIRAGLUTIDE ON AUTOPHAGY OF MC3T3-E1 CELLS:** To evaluate the effect on autophagy, cells were exposed to 12 $\mu$ M of liraglutide and 10nM of rapamycin. Rapamycin treatment was used as positive control because it is known to induce autophagy. We analyzed the autophagy by the acridine orange stained cells and measured it with flow cytometer. After treatment, it was observed that liraglutide and rapamycin induced significantly the autophagy in MC3T3-E1 cells when compared with the control group (Figure 5A and 5B). This effect was also visualized using a fluorescence microscopy (Figure 6).

**3.5 EFFECT OF LIRAGLUTIDE ON PROTEIN EXPRESSION LC3 A/B:** As liraglutide demonstrated to induce autophagy, we decided to evaluate the protein expression of LC3 A/B to confirm these results. Cells treated with 12 $\mu$ M of liraglutide and 10nM of rapamycin exhibited a significant increase of LC3 A/B when compared with the control group (Figure7). These data confirm the results obtained on acridine orange staining.

**3.6 EFFECT OF LIRAGLUTIDE ON MC3T3-E1 ROS RELEASE:** We observed that the liraglutide (12 $\mu$ M) increased significantly the ROS release when compared to the control group (Figure 8).

#### 4. DISCUSSION

Osteoblasts are some of the most important cells in bone tissue and critical for bone formation and normal bone density (Yang et al., 2015; Yang et al., 2013). Bone remodeling is a balance between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts (Lv et al., 2015). Osteoblasts play an important role in bone remodeling (Jilka et al., 2014; Lv et al., 2015). The imbalance of homeostasis on bone remodeling can cause the decrease of bone formation, which may be due to an injury on osteoblasts, the dysregulation of the bone remodeling process by local and systemic mediators conduct to pathological diseases such as osteoporosis and osteoarthritis (Lv et al., 2015; Son et al., 2010; Yang et al., 2015).

Liraglutide has been reported to reduce blood glucose, body weight, blood pressure and also regulate blood lipids (Wang et al., 2015). Studies have demonstrated that liraglutide has advantages in treating T2DM and preventing cardiovascular diseases (Wang et al., 2015). However, other researches in rodents suggest that liraglutide has been associated with an increased risk of thyroid C-cell focal hyperplasia and C-cell tumors (Parks and Rosebraugh, 2010). Therefore, it is important to study the effects of liraglutide in other tissues and cells. For that reason, our study proposes to investigate the *in vitro* action of liraglutide in mouse pre-osteoblastic cell, MC3T3-E1.

Our initial results demonstrated that liraglutide could decrease the cell number in the concentrations of 6, 12 and 24 $\mu$ M. We found that 24 $\mu$ M concentration could significantly increase the LDH activity and was not suitable for therapeutic purposes. Therefore, the 12 $\mu$ M concentration was chosen for the following study.

In order to verify if the decrease on growth of MC3T3-E1 cells was caused by apoptosis, we evaluated the effect of liraglutide on the mRNA expression of BAX, BCL-2 and p53. These proteins are involved on the pathway of apoptosis, which consists of anti-apoptotic proteins, like BCL-2, BCL-XL; and pro-apoptotic proteins, like BAX and BAK (Gu et al., 2013; Liang et al., 2013). A research demonstrated that the addition of liraglutide to high glucose medium significantly increased the viability cell of the HK-2 cells (human renal tubular epithelial cell line). Besides, they found that liraglutide inhibited the apoptosis of

HK-2 cells, followed by a significant decrease in autophagy (Zhao et al., 2015). Besides, others studies demonstrated the cytoprotection on  $\beta$  cells by liraglutide, predominantly through the reduction in apoptosis (Gleizes et al., 2014; Miao et al., 2013; Zhao et al., 2013). Based on our results, liraglutide could not modify the mRNA expression of BAX and BCL-2, suggesting that it does not induce pre-osteoblasts apoptosis.

p53 is a transcription factor that governs the gene expression cluster that arrests the cell cycle or initiates the apoptotic process. This protein mediates apoptosis in response to DNA damaging agents (Flores et al., 2002). The p53 protein has ample range of biological functions, like regulation of the cell cycle, apoptosis, autophagy, senescence, DNA metabolism, angiogenesis, cellular differentiation and the immune response (Kaminsky and Zhivotovsky, 2014; Suzuki and Matsubara, 2011). After stress, a cytoplasmic pool of p53 translocates rapidly to the mitochondrial surface, where it physically interacts activating pro-apoptotics BCL-2 family and inhibiting the anti-apoptotics BCL-2 family, leading apoptosis (Nikoletopoulou et al., 2013; Suzuki and Matsubara, 2011). Researchers have demonstrated the functional link between p53 and autophagy (Nikoletopoulou et al., 2013). The autophagy could be induced by the inhibition of mTOR via activation of the AMP kinase or through the transactivation of damage-regulated autophagy modulator (DRAM), that are gene encoding a lysosomal protein that induces autophagy. These could be stimulated by p53 protein (Nikoletopoulou et al., 2013), that not only induces apoptosis but also can causes cell cycle arrest (Suzuki and Matsubara, 2011). Based on our results, liraglutide not alter the mRNA expression of p53. The fact that it does not alter the BAX, BCL-2 and p53 suggests that liraglutide could not induce apoptosis, demonstrating that there is no connection between reduced cell number and apoptosis induction.

Autophagy is a lysosomal degradation and self-digesting process (Liu et al., 2012; Yang et al., 2014; Younce and Kolattukudy, 2010). This plays an important role in cell growth, survival, differentiation and homeostasis (Lv et al., 2015). It safeguards the cell against various cytotoxic stimuli by degrading damaged organelles in the early stages, although excessive autophagy leads to cell death (Liu et al., 2012; Yang et al., 2014; Younce and Kolattukudy, 2010). Hypoxia, starvation and oxidative stress are some of various cytotoxic stimuli

that can induce autophagy (Kuma et al., 2004; Lv et al., 2015; Yang et al., 2014).

A study suggests not only that liraglutide treatment reduces INS-1 cell (insulinoma pancreatic islet cell line) apoptosis induced by FFA (free fatty acid), but also that INS-1 cells treated with liraglutide significantly activated autophagy in the cells. These results demonstrated that liraglutide protects the pancreatic  $\beta$ -cells from FFA-induced apoptosis by activating autophagy (Wang et al., 2015). Another study observed that liraglutide increases the mRNA and protein expression of LC3B-II, which is widely used as a marker for autophagosome and demonstrated that liraglutide was capable to induce autophagosome formation. Their data suggested that FFA-induced INS-1 cell apoptosis was inhibited with liraglutide treatment by stimulating autophagy (Jing Yin et al., 2013). A research demonstrated that liraglutide reduced lipid accumulation in steatotic L-02 cell model (normal human hepatocyte-derived cell line) and mimicked the pathogenic features of NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) in humans. It also suggested the potential mechanism insights that liraglutide enhance autophagy and improves hepatic steatosis (Zhou et al., 2014).

Since studies have demonstrated that liraglutide could induce autophagy, we have decided to evaluate the effect of liraglutide on autophagy in MC3T3-E1 cells. Autophagy is morphologically characterized by an accumulation of autophagosome that fuses with lysosome to form autophagolysosome (Paglin et al., 2001; Yang et al., 2015). Our results demonstrated that liraglutide increase acidic autophagolysosome vacuoles detected by acridine orange staining. To confirm this result, we analyzed the expression of the protein LC3A/B which showed a significant increase in the expression of this protein. These could suggest that liraglutide could enhance autophagy in MC3T3-E1 cells. Autophagy has a dual role which is cell protective and cell destructive, depending on different conditions (Yang et al., 2015). Studies are reported that autophagy can be cytoprotective against cell death or may induce cell death depending of the type of stimulus and the cell type (Hamacher-Brady et al., 2006; He et al., 2014; Yang et al., 2015). So, the role of autophagy is controversial (Yang et al., 2015). Our results could suggest that in this case the autophagy may induce cell death.

Since it was observed that liraglutide stimulates autophagy, we have decided to verify if liraglutide induced reactive oxygen species (ROS) production, which is one of several autophagy inducing stimuli. Shiraki et al. (2012) demonstrated that a pretreatment with liraglutide for 30 minutes could inhibit ROS generation in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exposed to TNF- $\alpha$ . They also found that liraglutide inhibited NF- $\kappa$ B activation and reduced ROS generation. Thus, the number of apoptotic cells was consequently reduced with liraglutide treatment. This study suggests that liraglutide has important antioxidant and anti-inflammatory effects on endothelial cells (Shiraki et al., 2012). Another study investigated the effects of liraglutide on oxidative stress and fatty degeneration in foam cells and observed a potential role of liraglutide in ameliorating oxidative stress and lipid accumulation in the macrophage derived foam cell model. This study suggests that liraglutide inhibited oxidative stress and fatty degeneration, following by the activation on the AMPK/SREBP1 pathway (Wang and Yang, 2015). Our results do not corroborate with these studies. Liraglutide could have diverse effects in different kinds of cell lines. We found that liraglutide significantly increases the production of ROS in MC3T3-E1 cells, and this increase of ROS could be the reason for the decrease of the cell numbers of MC3T3-E1 cells when exposed to treatment. This may suggest that liraglutide enhanced the production of ROS and this increase could induce autophagy on bone cells.

## 5. CONCLUSION

In conclusion, our study demonstrates that liraglutide significantly decreases the cell growth of MC3T3-E1. The mechanism of this effect is related to the increase of ROS production, which consequently induces autophagy. This suggests that liraglutide could affect bone formation.



## 6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Capes grant. J.R.M. received a fellowship from PUCRS. G.V.H. is the recipient of a CNPq doctor grant from PUCRS. F.V from Universitat de Barcelona, Spain.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Agersø, H., Vicini, P., 2003. Pharmacodynamics of NN2211, a novel long acting GLP-1 derivative. *Eur J Pharm Sci* 19, 141-150.
- Drucker, D.J., Nauck, M.A., 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368, 1696-1705.
- Filippi-Chiela, E.C., Oliveira, M.M., Jurkovski, B., Callegari-Jacques, S.M., da Silva, V.D., Lenz, G., 2012. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS one* 7, e42522.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., Jacks, T., 2002. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560-564.
- Gleizes, C., Constantinescu, A., Abbas, M., Bouhadja, H., Zobairi, F., Kessler, L., Toti, F., 2014. Liraglutide protects Rin-m5f beta cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 27, 733-740.
- Gu, Y.X., Du, J., Si, M.S., Mo, J.J., Qiao, S.C., Lai, H.C., 2013. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part A* 101, 748-754.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Gottlieb, R.A., 2006. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 281, 29776-29787.
- He, H., Feng, Y.S., Zang, L.H., Liu, W.W., Ding, L.Q., Chen, L.X., Kang, N., Hayashi, T., Tashiro, S., Onodera, S., Qiu, F., Ikejima, T., 2014. Nitric oxide induces apoptosis and autophagy; autophagy down-regulates NO synthesis in physalin A-treated A375-S2 human melanoma cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 71, 128-135.

Janghorbani, M., Van Dam, R.M., Willett, W.C., Hu, F.B., 2007. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American journal of epidemiology* 166, 495-505.

Jilka, R.L., O'Brien, C.A., Roberson, P.K., Bonewald, L.F., Weinstein, R.S., Manolagas, S.C., 2014. Dysapoptosis of osteoblasts and osteocytes increases cancellous bone formation but exaggerates cortical porosity with age. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29, 103-117.

Jing Yin, J., Bo Li, Y., Ming Cao, M., Wang, Y., 2013. Liraglutide Improves the Survival of INS-1 Cells by Promoting Macroautophagy. *International journal of endocrinology and metabolism* 11, 184-190.

Kaminsky, V.O., Zhivotovsky, B., 2014. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 21, 86-102.

Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., Germano, I., 2003. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer research* 63, 2103-2108.

Kodama, H.-a., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S., 1981. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria, *Jpn. J. Oral Biol*, pp. 899-901.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., Mizushima, N., 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Liang, Q.H., Liu, Y., Wu, S.S., Cui, R.R., Yuan, L.Q., Liao, E.Y., 2013. Ghrelin inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells through ERK and AKT signaling pathway. *Toxicology and applied pharmacology* 272, 591-597.

Liu, S.Y., Chen, C.L., Yang, T.T., Huang, W.C., Hsieh, C.Y., Shen, W.J., Tsai, T.T., Shieh, C.C., Lin, C.F., 2012. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 17, 1156-1169.

Lv, X.H., Zhao, D.H., Cai, S.Z., Luo, S.Y., You, T., Xu, B.L., Chen, K., 2015. Autophagy plays a protective role in cell death of osteoblasts exposure to lead chloride. *Toxicology letters* 239, 131-140.

Madsen, K., Knudsen, L.B., Agersoe, H., Nielsen, P.F., Thogersen, H., Wilken, M., Johansen, N.L., 2007. Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness. *Journal of medicinal chemistry* 50, 6126-6132.

Meloni, A.R., DeYoung, M.B., Lowe, C., Parkes, D.G., 2013. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes Metab* 15, 15-27.

Mentlein, R., Gallwitz, B., Schmidt, W.E., 1993. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7 - 36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European journal of biochemistry / FEBS* 214, 829-835.

Miao, X.Y., Gu, Z.Y., Liu, P., Hu, Y., Li, L., Gong, Y.P., Shu, H., Liu, Y., Li, C.L., 2013. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Peptides* 39, 71-79.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 3448-3459.

Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., Yahalom, J., 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer research* 61, 439-444.

Parker, J.A., McCullough, K.A., Field, B.C., Minnion, J.S., Martin, N.M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2013. Glucagon and GLP-1 inhibit food intake and increase c-fos expression in similar appetite regulating centres in the brainstem and amygdala. *International journal of obesity* 37, 1391-1398.

Parks, M., Rosebraugh, C., 2010. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. *The New England journal of medicine* 362, 774-777.

Raouf, A., Seth, A., 2000. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene* 19, 6455-6463.

Shiraki, A., Oyama, J., Komoda, H., Asaka, M., Komatsu, A., Sakuma, M., Kodama, K., Sakamoto, Y., Kotooka, N., Hirase, T., Node, K., 2012. The

glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* 221, 375-382.

Son, M.J., Lee, S.B., Byun, Y.J., Lee, H.O., Kim, H.S., Kwon, O.J., Jeong, S.W., 2010. Sodium nitroprusside induces autophagic cell death in glutathione-depleted osteoblasts. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 24, 313-322.

Su, B., Sheng, H., Zhang, M., Bu, L., Yang, P., Li, L., Li, F., Sheng, C., Han, Y., Qu, S., Wang, J., 2014. Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*.

Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S., 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology* 96, 191-198.

Suzuki, K., Matsubara, H., 2011. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 978312.

Vella, A., Shah, P., Reed, A.S., Adkins, A.S., Basu, R., Rizza, R.A., 2002. Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7,36) -amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia* 45, 1410-1415.

Wang, J., Wu, J., Wu, H., Liu, X., Chen, Y., Wu, J., Hu, C., Zou, D., 2015. Liraglutide protects pancreatic beta-cells against free fatty acids in vitro and affects glucolipid metabolism in apolipoprotein E-/- mice by activating autophagy. *Molecular medicine reports* 12, 4210-4218.

Wang, Y.G., Yang, T.L., 2015. Liraglutide reduces oxidized LDL-induced oxidative stress and fatty degeneration in Raw 264.7 cells involving the AMPK/SREBP1 pathway. *Journal of geriatric cardiology : JGC* 12, 410-416.

Yang, J.Y., Park, M.Y., Park, S.Y., Yoo, H.I., Kim, M.S., Kim, J.H., Kim, W.J., Jung, J.Y., 2015. Nitric Oxide-Induced Autophagy in MC3T3-E1 Cells is Associated with Cytoprotection via AMPK Activation. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19, 507-514.

Yang, Y.H., Chen, K., Li, B., Chen, J.W., Zheng, X.F., Wang, Y.R., Jiang, S.D., Jiang, L.S., 2013. Estradiol inhibits osteoblast apoptosis via promotion of

autophagy through the ER-ERK-mTOR pathway. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 18, 1363-1375.

Yang, Y.H., Li, B., Zheng, X.F., Chen, J.W., Chen, K., Jiang, S.D., Jiang, L.S., 2014. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway--implications for the treatment of osteoporosis. *Free radical biology & medicine* 77, 10-20.

Younce, C.W., Kolattukudy, P.E., 2010. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *The Biochemical journal* 426, 43-53.

Zhao, L., Guo, H., Chen, H., Petersen, R.B., Zheng, L., Peng, A., Huang, K., 2013. Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Biochemical and biophysical research communications* 441, 133-138.

Zhao, X., Liu, G., Shen, H., Gao, B., Li, X., Fu, J., Zhou, J., Ji, Q., 2015. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. *International journal of molecular medicine* 35, 684-692.

Zhou, S.W., Zhang, M., Zhu, M., 2014. Liraglutide reduces lipid accumulation in steatotic L02 cells by enhancing autophagy. *Molecular medicine reports* 10, 2351-2357.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Effect of different concentrations of liraglutide on cell viability. MC3T3-E1 cells were exposed to liraglutide (6, 12 and 24 $\mu$ M) for 96 hours and cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay. Results were expressed as cell number of viable cells. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). \*\*\*  $P < 0.001$  and \*  $P < 0.05$  compared with control group.

Figure 2 - Effect of different concentrations of liraglutide on lactate dehydrogenase (LDH) release. MC3T3-E1 cells were exposed to liraglutide (12 and 24 $\mu$ M) for 96 hours and cell toxicity was assessed by LDH assay. Results were expressed as LDH release (%). Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). \*  $P < 0.05$  compared with control group.

Figure 3 - Effect of liraglutide (L) on BAX, BCL-2 and p53 mRNA expression. (A) MC3T3-E1 cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide for 96 hours and BAX mRNA expression was evaluated. (B) MC3T3-E1 cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide for 96 hours and BCL-2 mRNA expression was evaluated. (C) MC3T3-E1 cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide for 96 hours and p53 mRNA expression was evaluated.  $\beta$ -actin was an internal control for equal loading. Results were expressed as optical density. All data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3).

Figure 4 - Nuclear morphology of MC3T3-E1 cells stained with DAPI. Cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide for 96 hours. DAPI staining didn't shows chromatin condensation or/and apoptotic bodies. Images are representative of four independent experiments. Images were taken in a (Olympus IX71) microscope. 400x magnification.

Figure 5 - Effects of liraglutide and rapamycin on autophagy induction in MC3T3-E1 cells. (A) Cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide and 10nM rapamycin for 96 hours. Results were expressed as percentage of AVO's. All data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). \*\*\*  $P < 0.001$  and \*  $P < 0.05$  compared with control group. (B) Representative flow cytometric scatter plots of PERCP-CY5.5 (x axis)/ FITC (y axis) stained control, liraglutide and rapamycin for 96 hours.

Figure 6 - Liraglutide and rapamycin induce autophagy in MC3T3-E1 cells. Cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide and 10nM rapamycin for 96 hours. Arrows show AVOs that are represented in orange color indicating the autophagic cell. (A) Control group (untreated cells) shows percentage of basal autophagy cells. (B) Liraglutide group also demonstrated an increase in autophagy compared with control group. (C) Rapamycin group (positive control) shows a significant increase in autophagy compared with control group. Images are representative of four independents experiments. 400x magnification.

Figure 7 - Effect of liraglutide on LC3 A/B. MC3T3-E1 cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide (L) and 10nM rapamycin (R) for 96 hours. (A) Results were expressed as relative expression intensity of protein LC3 A/B/ GAPDH. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*  $P < 0.05$  compared with control group. (B) Western blot analysis of extracts of MC3T3-E1 cultured for LC3 A/B and GAPDH proteins. Images are representative of three independent experiments.

Figure 8 - Effect of liraglutide on MC3T3-E1 ROS release. Cells were exposed to 12 $\mu$ M liraglutide for 96 hours. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). Results were expressed as DCF fluorescence/1 x 10<sup>3</sup>cells. \* *P* < 0.05 compared with control group.



## FIGURES

Figure 1

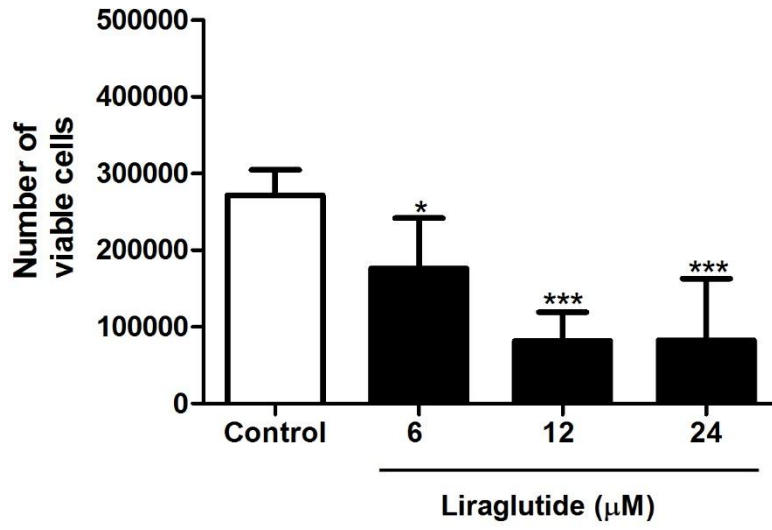


Figure 2

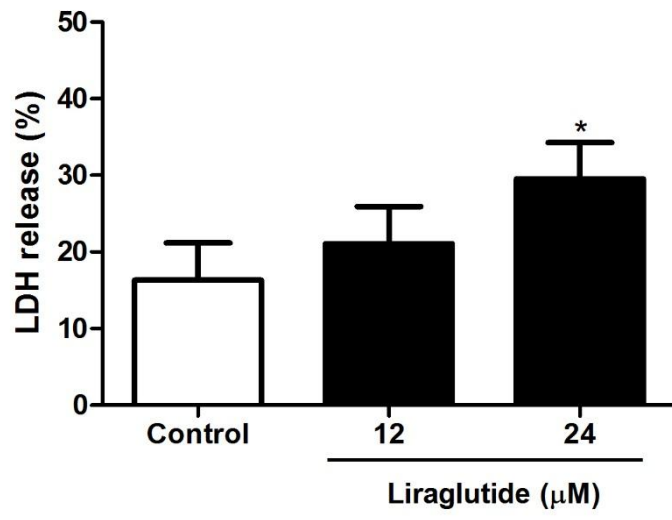


Figure 3

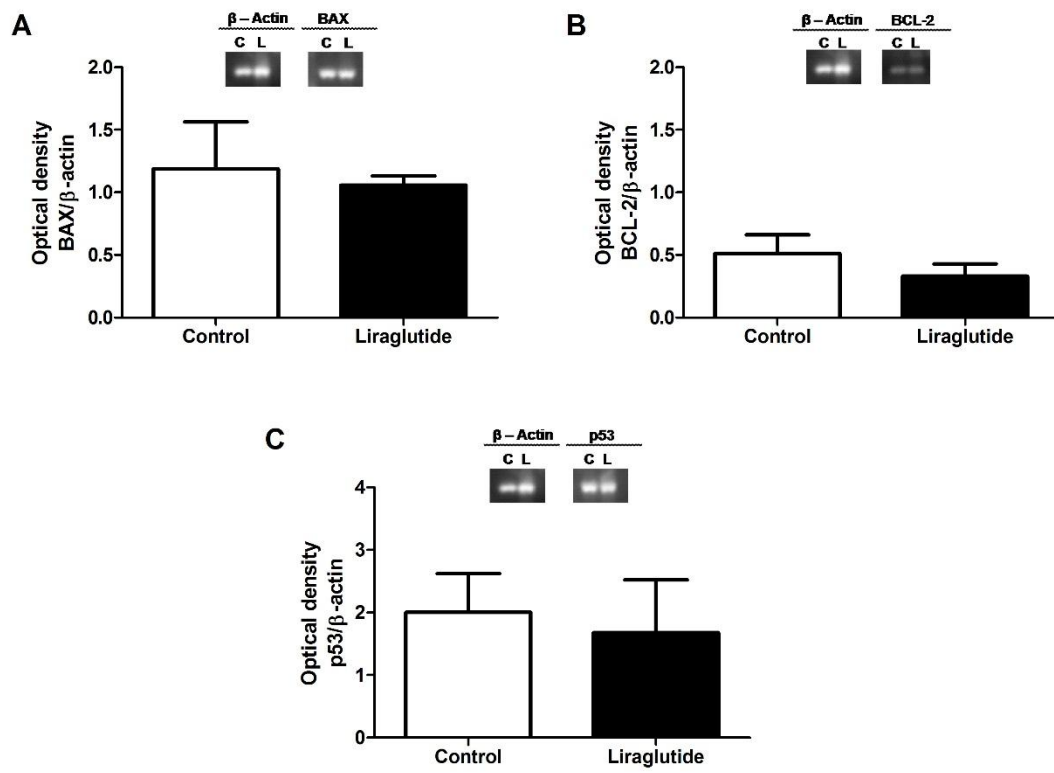


Figure 4

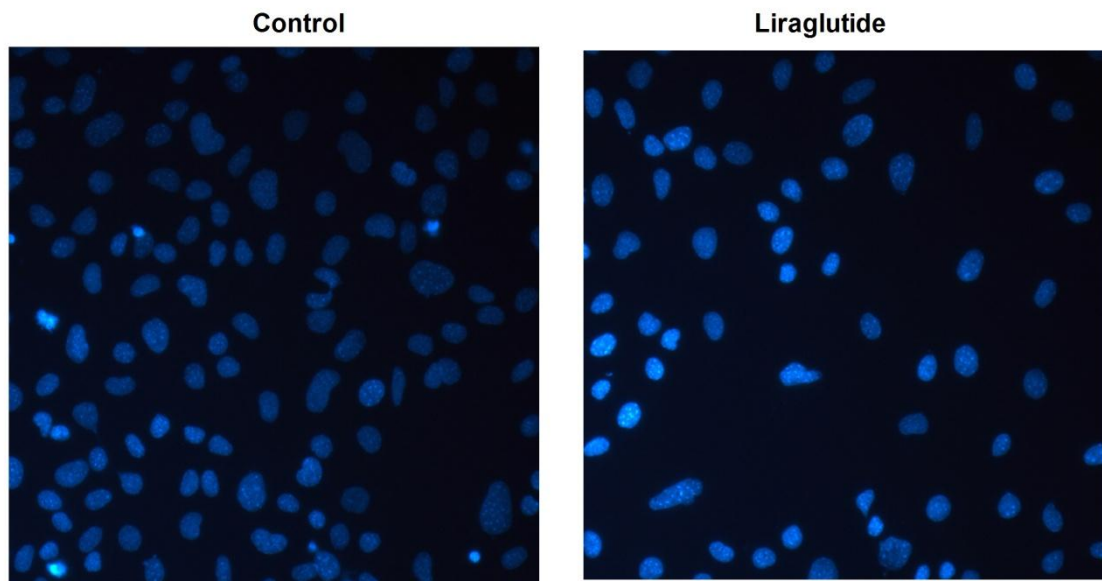


Figure 5

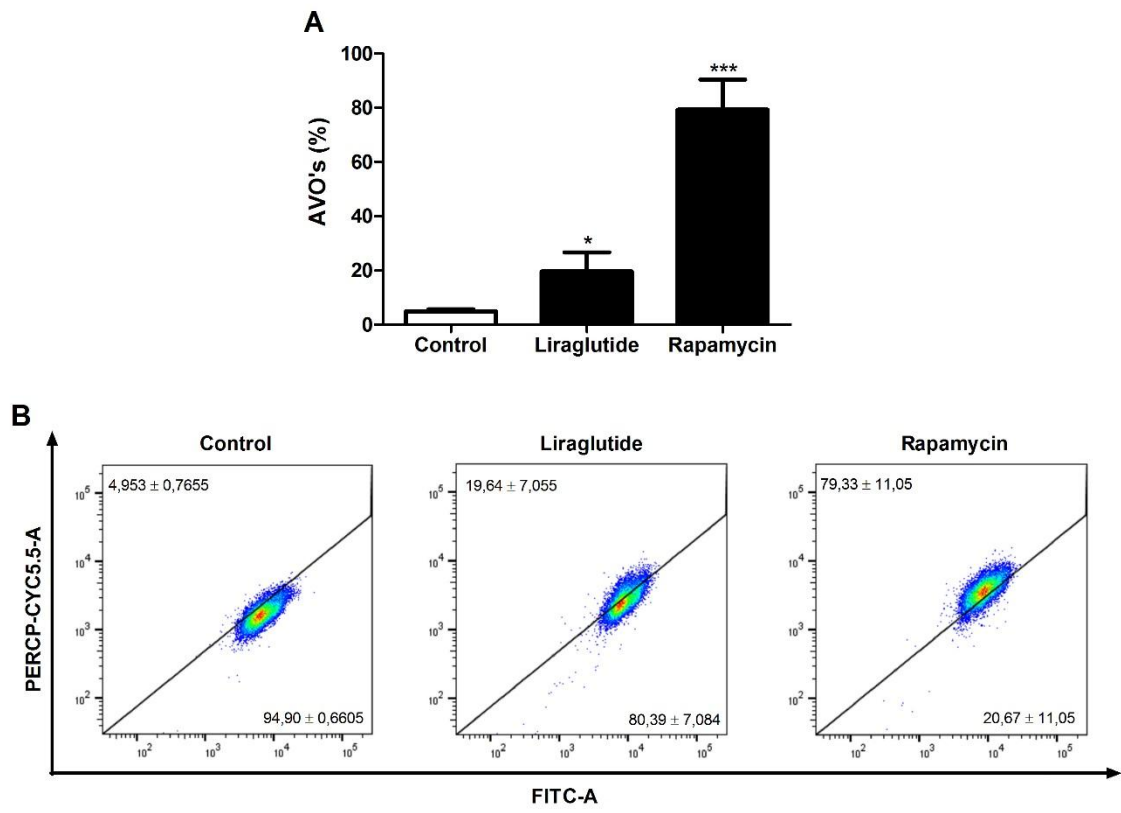


Figure 6

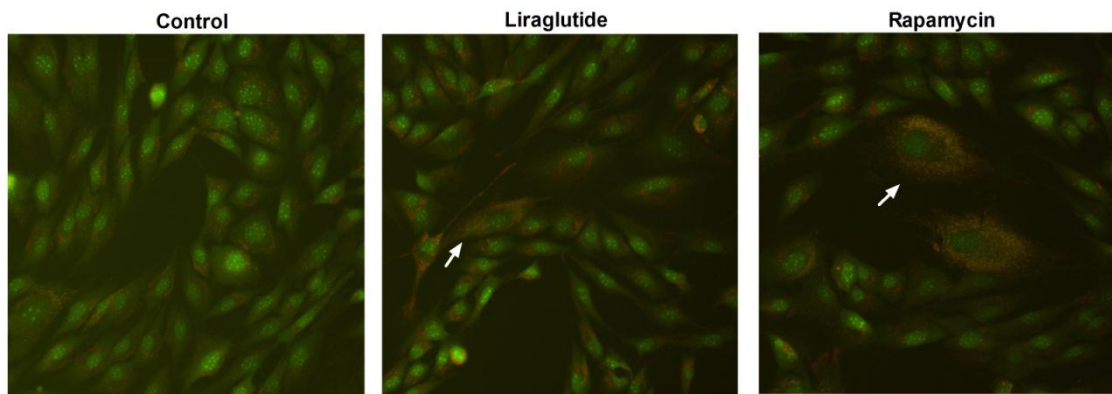


Figure 7

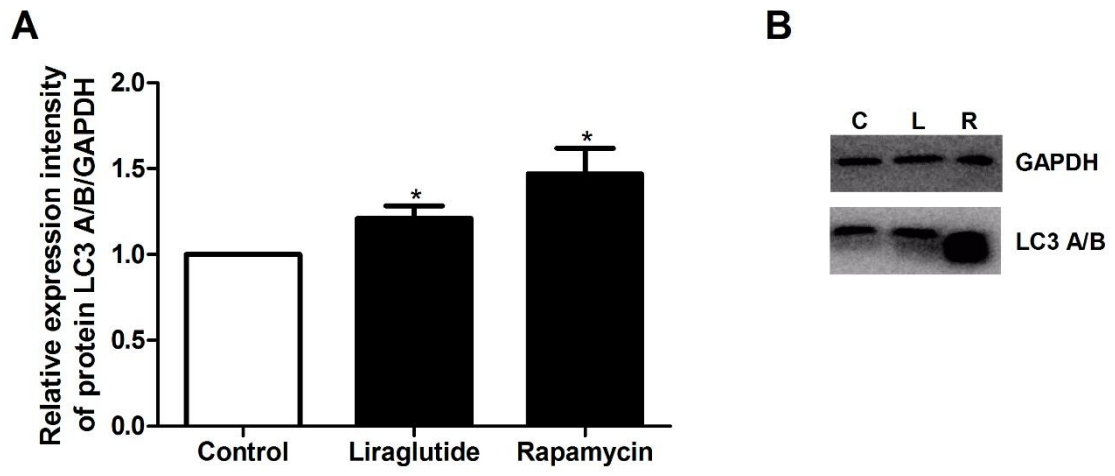
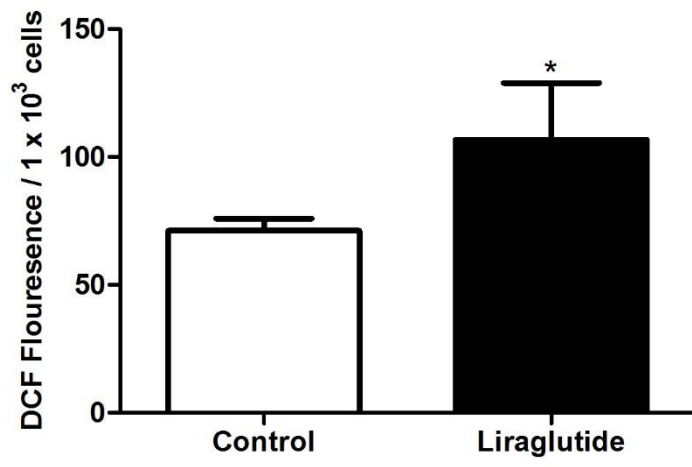


Figure 8





## TABLE

Table 1- Sequence of primers used for RT-PCR

Primers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
BAX	GTTTCATCCAGGATCGAGCAG	CATCTTCTTCCAGATGGTGA
BCL-2	CCTGTGGATGACTGAGTACC	GAGACAGCCAGGAGAAATCA
p53	GATGACTGCCATGGAGGAGT	CTCGGGTGGCTCATAAGGTA
$\beta$ -actin	TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG	TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser eficaz no controle da glicemia sem provocar hipoglicemia, a liraglutida é utilizada por pacientes com DM2. Ela também demonstrou ter um efeito na perda de peso e, por isso, começou a ser utilizada por pessoas não diabéticas que queriam emagrecer. Como seu uso indiscriminado pode ter efeitos colaterais nocivos, é importante investigar seus efeitos em diferentes tecidos e células. Diversos estudos realizados têm demonstrado outras ações desse medicamento, tais como: ação anti-inflamatória, efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares e efeitos de neuroproteção, como o aumento da neurogênese e memória. Contudo, pesquisadores também têm observado que o medicamento pode apresentar um efeito adverso na tireoide, aumentando a incidência da formação de tumores das células C e hiperplasia. É essencial, portanto, continuarmos investigando sua ação nos mais diversos sistemas, com o intuito de possibilitar uma avaliação mais precisa dos riscos e benefícios do uso do medicamento.

É importante conhecer o efeito ósseo da liraglutida não só em pacientes com DM2, que possuem um risco elevado de fraturas ósseas, como também em pessoas com osteopenia e osteoporose, porque desta forma poderíamos prever as consequências do uso indiscriminado do medicamento em pessoas com alterações no metabolismo ósseo. Por isso, o estudo teve como objetivo avaliar o efeito da liraglutida sobre o crescimento de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1). Além disso, o estudo também se propôs a ver o efeito da liraglutida sobre a apoptose, autofagia e estresse oxidativo das células. Conforme os resultados encontrados, a liraglutida demonstrou diminuir o crescimento celular sem influenciar na apoptose. Além disso, a liraglutida induziu a autofagia e provocou um aumento no estresse oxidativo das células MC3T3-E1.

Conclui-se que a liraglutida parece induzir o estresse oxidativo das células levando a um aumento da autofagia e, conseqüentemente, diminuindo seu crescimento. Nossos resultados sugerem que a liraglutida pode afetar a formação óssea por diminuir o crescimento dos osteoblastos, causando um desequilíbrio no remodelamento ósseo. São necessários mais estudos para confirmar esses resultados, avaliando, por exemplo, também a diferenciação e

mineralização das células ósseas. Além disso, seria interessante avaliar esse efeito em outras linhagens ósseas, em roedores e em estudos clínicos. Desta forma, poderíamos compreender melhor o efeito da liraglutida no metabolismo ósseo como um todo e não somente na proliferação.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Parker JA, McCullough KA, Field BC, Minnion JS, Martin NM, Ghatei MA, et al. Glucagon and GLP-1 inhibit food intake and increase c-fos expression in similar appetite regulating centres in the brainstem and amygdala. *International journal of obesity*. 2013;37(10):1391 -8.
2. Meloni AR, DeYoung MB, Lowe C, Parkes DG. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15(1):15 -27.
3. Holst JJ. Glucagon-like Peptide 1 (GLP -1): An Intestinal Hormone, Signalling Nutritional Abundance, with an Unusual Therapeutic Potential. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10(6):229 -35.
4. Mostafa AM, Hamdy NM, El-Mesallamy HO, Abdel-Rahman SZ. Glucagon-like peptide 1 (GLP -1) -based therapy upregulates LXR-ABCA1/ABCG1 cascade in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;468(4):900 -5.
5. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7 -36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1993;214(3):829 -35.
6. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(12):728 -42.
7. Parthasarathy V, Hölscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 2013;700(1 -3):42 -50.
8. Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1 $\beta$  production in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*. 2006;55(4):352 -60.
9. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):375 -82.
10. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiyama T, et al. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of

atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*. 2010;59(4):1030 -7.

11. Dozier KC, Cureton EL, Kwan RO, Curran B, Sadjadi J, Victorino GP. Glucagon-like peptide-1 protects mesenteric endothelium from injury during inflammation. *Peptides*. 2009;30(9):1735 -41.

12. Tharakan G, Tan T, Bloom S. Emerging therapies in the treatment of 'diabesity': beyond GLP-1. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(1):8 -15.

13. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131 -57.

14. MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AM, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S434-42.

15. Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, Gunn I, et al. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7 -36) amide or exendin -(9 -39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*. 1999;140(1):244 -50.

16. Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *The American journal of physiology*. 1999;276(5 Pt 2):R1 541-4.

17. Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1999;22(7):1137 -43.

18. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology*. 2008;149(2):574 -9.

19. Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2474 -6.

20. Mabileau G, Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, Chappard D. Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *J Endocrinol*. 2013;219(1):59 -68.

21. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696 -705.
22. Madsen K, Knudsen LB, Agersoe H, Nielsen PF, Thøgersen H, Wilken M, et al. Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness. *J Med Chem*. 2007;50(24):6126 -32.
23. Knudsen LB. Liraglutide: the therapeutic promise from animal models. *Int J Clin Pract Suppl*. 2010(167):4 -11.
24. Vella A, Shah P, Reed AS, Adkins AS, Basu R, Rizza RA. Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7,36) -amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia*. 2002;45(10):1410 -5.
25. Agersø H, Vicini P. Pharmacodynamics of NN2211, a novel long acting GLP-1 derivative. *Eur J Pharm Sci*. 2003;19(2 -3):141 -50.
26. Sivertsen J, Rosenmeier J, Holst JJ, Vilsbøll T. The effect of glucagon-like peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(4):209 -22.
27. Bjerre Knudsen L, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. *Endocrinology*. 2010;151(4):1473 -86.
28. Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(1):1 21-31.
29. Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. *The New England journal of medicine*. 2010;362(9):774 -7.
30. Davies MJ, Bergenstal R, Bode B, Kushner RF, Lewin A, Skjoth TV, et al. Efficacy of Liraglutide for Weight Loss Among Patients With Type 2 Diabetes: The SCALE Diabetes Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2015;314(7):687 -99.
31. Zhao H, Wei R, Wang L, Tian Q, Tao M, Ke J, et al. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits growth and promotes apoptosis of human pancreatic cancer cells in a cAMP-dependent manner. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(12):E1431 -41.

32. Zhou SW, Zhang M, Zhu M. Liraglutide reduces lipid accumulation in steatotic L02 cells by enhancing autophagy. *Molecular medicine reports*. 2014;10(5):2351 -7.
33. Zhao X, Liu G, Shen H, Gao B, Li X, Fu J, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(3):684 -92.
34. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American journal of epidemiology*. 2007;166(5):495 -505.
35. Su B, Sheng H, Zhang M, Bu L, Yang P, Li L, et al. Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*. 2014.
36. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*. 2007;87(1):99 -163.
37. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;959:93-107.
38. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology*. 2008;54(2):92 -9.
39. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*. 2007;14(7):1237 -43.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239 -57.
41. Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunology and cell biology*. 2015;93(1):35 -42.
42. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305(5684):626 -9.
43. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:978312.

44. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(12):3448 -59.
45. Yang YH, Li B, Zheng XF, Chen JW, Chen K, Jiang SD, et al. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway--implications for the treatment of osteoporosis. *Free radical biology & medicine*. 2014;77:10-20.
46. Liu SY, Chen CL, Yang TT, Huang WC, Hsieh CY, Shen WJ, et al. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2012;17(11):1156 -69.
47. Younce CW, Kolattukudy PE. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *The Biochemical journal*. 2010;426(1):43 -53.
48. Lv XH, Zhao DH, Cai SZ, Luo SY, You T, Xu BL, et al. Autophagy plays a protective role in cell death of osteoblasts exposure to lead chloride. *Toxicology letters*. 2015;239(2):131 -40.
49. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432(7020):1032 -6.
50. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*. 2010;12(9):814 -22.
51. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(1):66 -85.
52. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*. 2013;15(7):713 -20.
53. Yang JY, Park MY, Park SY, Yoo HI, Kim MS, Kim JH, et al. Nitric Oxide-Induced Autophagy in MC3T3-E1 Cells is Associated with Cytoprotection via AMPK Activation. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2015;19(6):507 -14.



54. Yang YH, Chen K, Li B, Chen JW, Zheng XF, Wang YR, et al. Estradiol inhibits osteoblast apoptosis via promotion of autophagy through the ER-ERK-mTOR pathway. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2013;18(11):1363 -75.
55. Saitou T, Imamura T. Quantitative imaging with Fucci and mathematics to uncover temporal dynamics of cell cycle progression. *Development, growth & differentiation*. 2015.
56. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(3):1 53-66.
57. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(5):359 -70.
58. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*. 2015;24(4):325 -40.
59. de Andrade KQ, Moura FA, Dos Santos JM, de Araujo OR, de Farias Santos JC, Goulart MO. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):30269 -308.
60. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*. 2011;194(1):7 -15.
61. Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell death and differentiation*. 2009;16(10):1303 -14.
62. Kodama H-a, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol*1981. p. 899-901.
63. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology*. 1983;96(1):191 -8.
64. Raouf A, Seth A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene*. 2000;19(55):6455 -63.
65. Vary CP, Li V, Raouf A, Kitching R, Kola I, Franceschi C, et al. Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Exp Cell Res*. 2000;257(1):213 -22.

## 7 ANEXO

### Carta de Submissão *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.

25/01/2016

Submission Confirmation

Responder a todos | Excluir Lixo eletrônico | ...



## Submission Confirmation

ees.ejps.0.36deab.52a059a8@eesmail.elsevier.com em nome de



Responder a todos |

Para: Jarbas Rodrigues de Oliveira;

seg 25/01/2016 16:12

Caixa de entrada

Re: Liraglutide induces autophagy in MC3T3-E1 by the increase of ROS production  
Research Paper

By Juliana R Marques; Gabriela V Haute; Gabriele C Krause; Bruno Basso; Bianca Martha; João da Silva;  
Paula Caruso; Denizar de Melo; Betânia de Freitas; Leonardo Pedrazza; Jarbas Oliveira, PhD

Dear Oliveira, Jarbas,

Your submission entitled "Liraglutide induces autophagy in MC3T3-E1 by the increase of ROS production"  
has been received by journal European Journal of Pharmaceutical Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an  
author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejps/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmaceutical Sciences