

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**JANINE BARCELOS CHACON**

**DIETA HIPERCALÓRICA SUPLEMENTADA COM ESPERMIDINA: ESTUDO DOS  
EFEITOS SOBRE LESÕES INDUZIDAS NO DNA**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**JANINE BARCELOS CHACON**

**DIETA HIPERCALÓRICA SUPLEMENTADA COM ESPERMIDINA: ESTUDO DOS  
EFEITOS SOBRE LESÕES INDUZIDAS NO DNA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Alimentos e longevidade.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pollyanna Francielli de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Martins Dala Paula

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Chacon, Janine Barcelos.

Dieta Hiperclórica suplementada com espermidina : Estudo dos efeitos sobre lesões induzidas no DNA / Janine Barcelos Chacon. - Alfenas, MG, 2024.

76 f. : il. -

Orientador(a): Pollyanna Francielli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Longevidade) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Quimioprevenção. 2. Poliaminas. 3. Sacarose. 4. Longevidade. 5. Câncer. I. Oliveira, Pollyanna Francielli de, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

JANINE BARCELOS CHACON

**DIETA HIPERCALÓRICA SUPLEMENTADA COM ESPERMIDINA: ESTUDO DOS EFEITOS SOBRE LESÕES INDUZIDAS NO DNA**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Nutrição e Longevidade

Aprovada em: 29 de agosto de 2024.

Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ildercílio Mota de Souza Lima  
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2024, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1321259** e o código CRC **8D82AB8B**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar e iluminar meus caminhos e por ter me conduzido até aqui. A minha família e ao meu esposo, agradeço pelo apoio incondicional e confiança depositados em mim, vocês foram base essencial para que eu pudesse alcançar mais essa etapa. Aos amigos de longa data, por compreenderem a ausência em muitos momentos especiais, e aos novos amigos por tornarem a rotina mais leve.

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Longevidade, ao Comitê de Ética em uso animal da Universidade Federal de Alfenas (CEUA) e aos animais pelo seu papel fundamental na contribuição para o avanço científico e pelo seu sacrifício em prol do conhecimento.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pollyanna Francielli de Oliveira, por sempre ser tão presente na sua orientação e por criar possibilidades para a produção e construção de conhecimento, com certeza ser sua orientanda fez toda a diferença em minha vida e carreira acadêmica e vou levar com muito carinho todos os ensinamentos.

Ao Laboratório de Genética Humana, seus colaboradores e aos demais pesquisadores envolvidos neste trabalho, sem a cooperação e parceria de todos seria improvável a produção deste. Em especial a Giulia de Mello Franco por fazer comigo essa trajetória de dias alegres e de muito aprendizado. E aos demais pesquisadores, obrigada por também enfrentarem e acreditarem na ciência como modo de revolução, que continuemos resistentes e persistentes.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela assistência sempre concedida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01683-23).

## RESUMO

Lesões no DNA marcam o início do processo de carcinogênese que, se não controlado, pode desencadear progressão da doença. Dietas ricas em alimentos processados e ultraprocessados, com alto teor de calorias e açúcar, estão associadas ao desenvolvimento de várias condições crônicas não-transmissíveis (CCNTs), entre elas o câncer. Em contrapartida, medidas preventivas, como uma alimentação saudável, rica em compostos bioativos, são fundamentais para reduzir o risco de danos ao DNA e promover a longevidade. A espermidina (ESP) é uma poliamina bioativa indutora de autofagia, anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e com potencial de inibir a proliferação celular. O presente estudo avaliou os efeitos da suplementação com ESP em roedores alimentados com dieta hipercalórica (DH), rica em sacarose, antes e após a indução de lesões no DNA. O estudo utilizou camundongos Swiss machos, alimentados com DH [Dieta padrão (DP) + 30% de sacarose diluída em água], e/ou suplementados com 10 e 30mg/kg de peso corpóreo (pc) de ESP por 44 dias. Amostras de sangue periférico foram coletadas com 48h e 44 dias para monitoramento da mutagenicidade. No 44º dia o agente mutagênico metilmetasulfonato [MMS 40 mg/kg pc intraperitoneal (ip)] foi administrado para indução da mutagenicidade e após 24 horas foram coletadas células de medula óssea e do fígado para avaliação do efeito protetor pelos ensaios de micronúcleos e cometa, respectivamente e investigação do potencial antioxidante endógeno. Os resultados demonstraram que a DH reduziu o consumo de ração e elevou o consumo hídrico significativamente. Nenhum dos tratamentos demonstraram citotoxicidade e mutagenicidade. Os animais tratados com ESP 30 mg/kg pc combinado ao MMS em DP (ESP 30 mg/kg pc + MMS) e DH (ESP 30 mg/kg + MMS + DH) demonstraram redução na frequência dos eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) na medula óssea e danos no DNA nos hepatócitos. A suplementação com ESP 10 e 30 mg/kg pc, combinados ao MMS nos animais alimentados com DP e DH, aumentou significativamente os níveis de CAT no fígado enquanto que, para SOD esse comportamento não foi observado. Portanto, os efeitos quimiopreventivo e antioxidante do tratamento com ESP 30 mg/kg pc demonstraram ser mais promissores quando associada à DP, considerada equilibrada. Estas avaliações, em conjunto, contribuem para esclarecer parte dos efeitos quimiopreventivos da ESP e sugerem

que novos estudos devem ser realizados para investigar os mecanismos envolvidos nessa atividade.

Palavras-chave: quimioprevenção; poliaminas; sacarose; longevidade; câncer.

## ABSTRACT

DNA damage marks the onset of the carcinogenesis process, which, if uncontrolled, can lead to disease progression. Diets rich in processed and ultra-processed foods, high in calories and sugar, are associated with the development of various chronic non-communicable diseases (NCDs), including cancer. Conversely, preventive measures, such as a healthy diet rich in bioactive compounds, are crucial for reducing the risk of DNA damage and promoting longevity. Spermidine (SPD) is a bioactive polyamine that induces autophagy, has anti-inflammatory, immunomodulatory, and antioxidant properties, and has the potential to inhibit cell proliferation. The present study evaluated the effects of SPD supplementation in rodents fed a high-calorie diet (HD) rich in sucrose, before and after the induction of DNA lesions. The study used male Swiss mice, fed HD [standard diet (SD) + 30% sucrose diluted in water], and/or supplemented with 10 and 30 mg/kg body weight (bw) of SPD for 44 days. Peripheral blood samples were collected at 48 hours and 44 days for monitoring mutagenicity. On day 44, the mutagenic agent methyl methanesulfonate [MMS 40 mg/kg bw intraperitoneally (ip)] was administered to induce mutagenicity, and after 24 hours, bone marrow and liver cells were collected to evaluate the protective effect using micronucleus and comet assays, respectively, and to investigate the endogenous antioxidant potential. The results showed that HD significantly reduced feed intake and increased water consumption. None of the treatments demonstrated cytotoxicity and mutagenicity. Animals treated with SPD 30 mg/kg bw combined with MMS in SD (SPD 30 mg/kg bw + MMS) and HD (SPD 30 mg/kg + MMS + HD) showed a reduction in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in bone marrow and DNA damage in hepatocytes. Supplementation with SPD 10 and 30 mg/kg bw, combined with MMS in animals fed SD and HD, significantly increased CAT levels in the liver, whereas this behavior was not observed for SOD. Therefore, the chemopreventive and antioxidant effects of SPD 30 mg/kg bw treatment were shown to be more promising when associated with SD, considered balanced. These evaluations collectively contribute to elucidating the chemopreventive effect of SPD and suggest that further studies should be conducted to investigate the mechanism involved in this activity.

Keywords: chemoprevention; polyamines; sucrose; longevity; cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química da espermidina.....	25
Figura 2 –	Via biossintética da espermidina.....	26
Figura 3 –	Consumo médio diário de ração (A), água (B), sacarose (C) e energia (D) obtidos durante o período experimental....	42
Figura 4 –	Ganho de peso (A), PAb (B), CNA (C) e diferença entre índice de Lee inicial e final (D) dos camundongos Swiss submetidos aos diferentes grupos de tratamento.....	45
Figura 5 –	Peso relativo (%) do coração (A), pulmão (B), rins (C), baço (D), trato gastrointestinal (E) e carcaça (F) dos camundongos Swiss submetidos aos diferentes grupos de tratamento.....	47
Figura 6 –	Glicemia inicial (A), final (B) e diferença de glicemia (final – inicial) (C) em camundongos Swiss submetidos aos diferentes tratamentos.....	50
Figura 7 –	Razão EPC/EPC+ENC em 48h (A) e 44 dias (B), EPCMNs em 48h (C) e 44 dias (D) observados em células do sangue periférico de camundongos Swiss e respectivos controles..	53
Figura 8 –	Razão EPC/EPC+ENC (A) e EPCMNs (B) observados aos 45 dias de tratamento em células de medula óssea de camundongos Swiss e respectivos controles.....	54
Figura 9 –	Percentual de DNA na cauda do cometa de hepatócitos de camundongos Swiss e respectivos controles.....	56
Figura 10 –	Quantificação da CAT (A) e SOD (B) em células hepáticas de camundongos Swiss e respectivos controles.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional do açúcar refinado.....	28
Tabela 2 –	Informação nutricional da DP.....	29
Tabela 3 –	Potencial antioxidante, TFT e TPT presentes na DP, sacarose e ESP.....	40

## LISTA DE SIGLAS

4NQO	<i>4nitroquinolina 1-óxido</i>
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AdoMetDC	Adenosylmethionina decarboxylase
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumínio
APAO	<i>Acetylpolyamine oxidase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	<i>Catalase</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EP300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
EPC	Eritrócitos policromáticos
EPCMNs	Eritrócitos policromáticos micronucleados
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESP	Espermidina
G6PC1	<i>Glicose-6-Fosfatase Catalítica Subunidade 1</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPX	<i>Glutathione peroxidase</i>
GYS1	<i>Glicogênio Sintase 1</i>
H2B	<i>Histona 2B</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IARC	<i>International Agency for Research into Cancer</i>
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IMC	Índice de massa corporal

INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBZs	<i>Longevity Blue Zone</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
m3A	3-metiladenina
m6G	6-metilguanina
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
ODC	Ornithine decarboxylase
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCK1	<i>Fosfoenolpiruvato Carboxicinase 1</i>
PER3	<i>Period Circadian Regulator</i>
RARRES2	<i>Retinoic Acid Receptor Responder 2</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	<i>S-adenosylmethionine</i>
SAMDC	<i>S-adenosylmethionine decarboxylase</i>
SMO	<i>Spermine oxidase</i>
SOD	<i>Superóxido dismutase</i>
SPDS	<i>Constitutive spermidine synthase</i>
SPMS	<i>Spermidine synthase</i>
SSAT	<i>Spermine N 1-acetyltransferase</i>
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TFT	Teor de flavonóides totais
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TPT	Teor de fenólicos totais
TRX	Tioredoxina
UI	Unidade internacional
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCNT's	Condições crônicas não-transmissíveis
CN	Controle negativo
CNA	Perímetro naso-anal
CT	Colesterol total
DH	Dieta hipercalórica
DP	Dieta padrão
EC/g	Equivalentes de catequinas por grama de amostra
ESP 10	Espermidina 10 mg/kg
ESP 30	Espermidina 30 mg/kg
G	Gramas
H	Horas
Ip	Intraperitoneal
Kcal	Quilocaloria
LMP	<i>L-ow melting point</i>
mcg	Microgramas
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
µL	Microlitros
min	Minuto
OC	Orégano comum
OG	Orégano grego
PAb	Perímetro abdominal
Pc	Peso corpóreo
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
s.d.	sem data
vo	Via oral
v/v	Volume por volume
VCT	Valor calórico total

TGL

Triglicéridos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	OBJETIVOS .....	18
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	18
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
1.2	JUSTIFICATIVA .....	18
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>20</b>
2.1	PAPEL DA NUTRIÇÃO NA SAÚDE E LONGEVIDADE .....	20
2.2	DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM SACAROSE .....	21
2.3	CÂNCER E SUA RELAÇÃO COM A NUTRIÇÃO .....	23
2.4	ESPERMIDINA: VIA BIOSINTÉTICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1	PERFIL DIETÉTICO .....	28
3.2	OBTENÇÃO DA ESPERMIDINA .....	29
3.3	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> .....	30
3.3.1	<b>Obtenção de componentes antioxidantes, compostos fenólicos e flavonóides</b> .....	<b>30</b>
3.3.2	<b>Determinação do potencial antioxidante</b> .....	<b>30</b>
3.3.2.1	Método de atividade de captura do radical ABTS .....	30
3.3.2.2	Método de atividade de captura do radical DPPH .....	31
3.3.3	<b>Determinação do teor de fenólicos totais</b> .....	<b>31</b>
3.3.4	<b>Determinação do teor de flavonoides totais</b> .....	<b>32</b>
3.4	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> .....	32
3.4.1	<b>Agente indutor de lesões no DNA</b> .....	<b>32</b>
3.4.2	<b>Animais</b> .....	<b>32</b>
3.4.3	<b>Tratamentos</b> .....	<b>33</b>
3.4.4	<b>Avaliações murinométricas</b> .....	<b>34</b>
3.4.5	<b>Quantificação da glicemia</b> .....	<b>34</b>
3.4.6	<b>Teste de micronúcleo em sangue periférico e medula óssea</b> ...	<b>35</b>
3.4.7	<b>Ensaio cometa</b> .....	<b>35</b>
3.4.8	<b>Quantificação das enzimas de defesa antioxidante endógena</b>	<b>36</b>

3.4.8.1	Superóxido dismutase .....	37
3.4.8.2	Catalase .....	37
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> .....	39
4.2	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> .....	41
4.2.1	<b>Consumo alimentar, hídrico, de sacarose e energia total .....</b>	<b>41</b>
4.2.2	<b>Avaliações murinométricas .....</b>	<b>44</b>
4.2.3	<b>Avaliação da glicemia .....</b>	<b>49</b>
4.2.4	<b>Avaliação da citogenotoxicidade e do potencial antimutagênico .....</b>	<b>52</b>
4.2.5	<b>Defesa antioxidante endógena .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO I .....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO II .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos pesquisadores em todo o mundo têm reunido esforços em identificar fatores de risco modificáveis para as Condições Crônicas não Transmissíveis (CCNT's) e as medidas mais adequadas para sua prevenção, com objetivo de prolongar a vida com saúde, já que essas doenças podem gerar incapacidade na velhice ou até mesmo a morte precoce. Neste contexto, prevenir doenças associadas ao envelhecimento torna-se interessante, não só pela redução do custo que envolvem o tratamento, mas principalmente, por proporcionar saúde e melhoria da qualidade de vida (Pes *et al.*, 2021). Entre as CCNT's com maiores índices de letalidade no Brasil e no mundo está o câncer, doença causada, em sua maioria, pela exposição prolongada à mutágenos ambientais cujo as principais formas de tratamento envolvem a quimioterapia e a radioterapia, que, embora sejam efetivas, trazem uma série de efeitos colaterais sistêmicos aos pacientes devido à baixa acessibilidade aos tecidos tumorais e a natureza não seletiva dos fármacos citotóxicos (Alam *et al.*, 2021), o que pode superar seus benefícios terapêuticos. Entre os fatores ambientais que podem contribuir com o desenvolvimento e progressão do câncer, está a alimentação desequilibrada. Uma dieta insuficiente ou inadequada, baseada, principalmente no consumo de alimentos processados e ultraprocessados, ricos em açúcar e gordura, pode provocar prejuízos imunológicos e intolerância ao tratamento (Alam *et al.*, 2021). Por outro lado, de acordo com a OMS (2019), entre 30% e 50% das mortes por câncer poderiam ser prevenidas com hábitos saudáveis incluindo uma dieta saudável rica em frutas e vegetais. Nesse contexto, identificar compostos bioativos com potencial efeito protetor e estudar seus mecanismos de ação, pode contribuir para o desenvolvimento de nutracêuticos capazes de prevenir ou até mesmo auxiliar no tratamento dessa enfermidade. A espermidina (ESP), uma poliamina natural presente em diversos alimentos, tem apresentando, em estudos prévios, potencial efeito anticarcinogênico (Fan; Feng; Chen, 2020). Yue *et al.* (2017) demonstraram que camundongos suplementados com 50mg/kg peso corpóreo (pc) de ESP apresentaram menor formação de tumores. Gobert *et al.* (2022) ao suplementar camundongos com ESP em quantidade 10 vezes maior que o consumo regular (10 mg por dia), demonstraram uma redução significativa no número de tumores colorretais. O diferencial de nosso estudo é que, os dados da literatura, não consideram a alimentação inadequada como

um fator que pode reduzir ou, até mesmo, inviabilizar a ação da ESP. Nesse sentido, nossa hipótese se baseia em avaliar se, mesmo em uma dieta comum ocidental, rica em açúcar e calorias, a ESP é capaz de proteger o material genético dos efeitos deletérios dos agentes mutagênicos presentes no ambiente.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com ESP em roedores alimentados com dieta hipercalórica (DH), rica em sacarose, antes e após a indução de lesões no DNA.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar o teor de fenólicos (TPT) e flavonoides totais (TFT) na dieta antes e após suplementação com ESP;
- b) Avaliar o potencial antioxidante da dieta antes e após suplementação com ESP;
- c) Avaliar composição corporal e peso dos órgãos dos animais;
- d) Monitorar a citotoxicidade e a mutagenicidade dos tratamentos;
- e) Avaliar o efeito da suplementação com ESP em lesões quimicamente induzidas em células do sangue periférico, da medula óssea e do fígado;
- f) Quantificar enzimas de defesa antioxidante endógena nos hepatócitos;
- g) Comparar possíveis diferenças no efeito da suplementação com ESP quando os roedores estão alimentados com DH e Dieta padrão (DP).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

De modo geral, a incidência de CCNT's, entre elas o câncer, tem aumentado em todo o mundo de modo que a maioria dos casos são condicionados à fatores ambientais que envolvem o estilo de vida e em grande parte são modificáveis. A síndrome metabólica, resistência à insulina, tolerância diminuída à glicose, dislipidemia são fatores comumente associados à obesidade, e são prováveis

consequências do excesso de ingestão alimentar o que caracteriza um fator de risco o câncer. Cruz *et al.* (2020) demonstraram em longo prazo, os efeitos da ingestão de uma solução de sacarose a 40% sobre os parâmetros séricos e hepáticos em ratos. O efeito obesogênico do consumo de sacarose foi observado após 8 semanas de consumo de dissacarídeos, e os resultados são semelhantes aos causados pelo consumo de dieta rica em gordura. Além disso, eles comprovaram que, a ingestão de sacarose é capaz de reduzir a eficiência alimentar, sugerindo que o metabolismo da sacarose altera processos envolvidos na regulação do peso corporal. O efeito nocivo direto das dietas enriquecidas com açúcar são acúmulo de gordura no fígado e subsequente desenvolvimento de resistência hepática à insulina (CRUZ *et al.*, 2020). Além dos efeitos nocivos, as dietas ricas em açúcar também contribuem para afetar o processo de recuperação do paciente com câncer, que de acordo com a OMS (2020) é a principal causa de morte no Brasil e no mundo (ALAM *et al.*, 2021).

Neste sentido, a nutrição e dietética são considerados um dos fatores externos mais influentes na ocorrência de doenças. Esses se associam com a oncologia como fator de risco para seu desenvolvimento, especialmente quando a alimentação é baseada em uma dieta rica em alimentos ultraprocessados, de alta energia e baixo teor de nutrientes, afetando a atividade transcricional e a expressão de diversos genes. O perfil alimentar, dependendo de sua qualidade e quantidade também se apresenta como fator protetor, pois compostos bioativos dispõem da capacidade de direcionar, tratar e prevenir, podendo alguns perfis dietéticos contribuir como estratégias para fins medicinais e quimiopreventivos.

Diante disso, faz-se necessário avaliar a possível eficácia da ESP em uma dieta rica em sacarose e, também, esclarecer os mecanismos envolvidos. Considerando a direta relação entre a mutagênese e a carcinogênese, e o aumento no número de casos de câncer no Brasil e no mundo, estudos de novas moléculas que possam estar envolvidas na prevenção desta enfermidade são bem-vindos. Baseado nos resultados já encontrados sobre a temática ESP e câncer torna-se plausível estudar também as variantes de seu efeito protetor, visto que estudos nessa vertente são escassos na literatura. Logo, esta avaliação contribuiu para esclarecer se, em uma dieta rica em sacarose, comum dos dias atuais, a ESP protegeria o material genético de eventos danosos que levaria ao processo de transformação maligna.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 NUTRIÇÃO NA SAÚDE E NA LONGEVIDADE

A longevidade pode ser compreendida como um fenômeno biológico complexo, intimamente ligado a uma combinação de múltiplos genes e vários fatores ambientais. No entanto, os mecanismos que proporcionam e/ou favorecem essa condição ainda não estão totalmente elucidados. Na relação entre doença, saúde e longevidade é possível observar um modo específico de interação entre a variação genética na saúde humana e variação genética no risco de doença, o que, em conjunto mantêm o estado de saúde do indivíduo (Zhang *et al.*, 2020).

Muitos pesquisadores em todo o mundo têm reunido esforços orientados a identificar fatores de risco modificáveis associados com a incapacidade na velhice e as medidas mais adequadas para sua prevenção. Estudos têm sido realizados com populações de áreas geográficas, conhecidas como “*Longevity Blue Zones*” (LBZs), caracterizadas por uma proporção considerável de habitantes com vidas extraordinariamente longas e, muitas vezes, capazes de contribuir com a manutenção da capacidade funcional durante o envelhecimento. Esses estudos demonstram claramente o envolvimento de fatores epigenéticos, ambientais e de estilo de vida e suas interações mútuas (Pes *et al.*, 2021). Nesse sentido, de acordo com Wickramasinghe *et al.* (2020), o estudo do envelhecimento saudável ajuda a identificar os fatores de risco que impactam a saúde e a qualidade de vida e fornecem evidências de intervenções eficazes e aceitáveis que possam contribuir para a longevidade.

O envelhecimento pode ser retardado por meio de um estilo de vida mais saudável, sendo o hábito alimentar um dos fatores modificáveis mais relevantes. Estudos prospectivos em humanos têm sido realizados para verificar se uma determinada dieta pode influenciar o fenótipo de envelhecimento e, o que se conclui, é que componentes presentes nos alimentos podem neutralizar danos moleculares e reduzir alterações funcionais associadas à idade, características do processo de envelhecimento (Pes *et al.*, 2021). Estratégias que melhorem a capacidade de manutenção e/ou recuperação da homeostase em resposta ao estresse ou à estressores podem melhorar a forma como os indivíduos envelhecem (Wickramasinghe *et al.*, 2020), pois modulam a taxa na qual as células ou órgãos

humanos entram em senescência, retardando o aparecimento de doenças crônicas, promovendo melhora da mobilidade, da função mental e bem-estar. Logo, uma alimentação que inclui o consumo de vegetais, frutas, oleaginosas, cereais, fibras, peixes e gorduras insaturadas, contém antioxidantes, vitaminas, potássio, ômega-3 e teor reduzido de açúcares e gorduras saturadas pode ser considerada uma estratégia favorável (Leitão *et al.*, 2022).

## 2.2 DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM SACAROSE

O fato é que, no mundo ocidental, hábitos de vida moderna tem levado os indivíduos a escolhas alimentares pouco saudáveis. De acordo com Leitão *et al.* (2022) as preferências dos indivíduos por alimentos ricos em calorias e sacarose como refrigerantes e alimentos pré-preparados, processados e ultraprocessados tem contribuído para o aumento da prevalência de CCNTs, incluindo a obesidade, diabetes mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares e câncer. Efeitos deletérios foram observados tanto nos estudos com animais (Yu *et al.*, 2020) quanto em humanos (Tapanee *et al.*, 2021). Yu *et al.* (2020) concluíram que camundongos que consumiram uma dieta com 30% de energia derivada de gordura e 50% derivada de açúcar apresentaram grande quantidade de deposição lipídica, esteatose no fígado, níveis aumentados de colesterol total (CT), *low density lipoprotein* (LDL) e triglicérides (TGL), níveis mais baixos de *high density lipoprotein* (HDL), altos níveis de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. Tapanee *et al.* (2021) demonstraram que adultos jovens com excesso de gordura/obesidade consomem menos fibra alimentar e mais açúcar do que indivíduos de peso saudável, destacando a importância de não se considerar apenas a quantidade ou calorias da dieta, mas também a qualidade da ingestão alimentar.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), através da diretriz de ingestão de açúcares, recomenda que a ingestão de açúcar adicionado deve ser limitada a um máximo de 5% do valor energético total. Os açúcares livres correspondem aos monossacarídeos e os dissacarídeos adicionados aos alimentos e às bebidas pela indústria alimentícia ou pelo consumidor, além dos açúcares naturalmente presentes no mel, nos xaropes, nos sucos de frutas e nos concentrados de sucos de frutas. A alta ingestão de açúcar livre ameaça a qualidade nutricional da alimentação

contribuindo com o estoque de quantidade considerável de energia sem nutrientes específicos e necessários (Organização Mundial de Saúde, 2015).

De acordo com Braz *et al.* (2019), entre os anos de 1987 e 2009, o Brasil apresentou redução na compra de açúcar de mesa, porém com um aumento significativo na aquisição de alimentos altamente processados, densos em energia, ricos em açúcar, sódio, gorduras totais e saturadas. De 1987 a 2003, a dieta do brasileiro passou a conter mais açúcar proveniente de alimentos altamente processados, registrando um aumento de 17,4% para 35,5%, destacando-se alimentos como refrigerantes e biscoitos. Segundo Xie *et al.* (2020) os padrões alimentares não saudáveis são uma das principais razões para o aumento da obesidade em todo o mundo, sendo, o baixo consumo de frutas e vegetais, a ingestão excessiva de bebidas com alto teor de açúcar e o elevado consumo de *fast food*, os fatores que mais influenciam negativamente no índice de massa corporal (IMC), predispondo à obesidade, além de, aumentar substancialmente a resistência à insulina. Além disso, a frequência das refeições também pode afetar a microbiota intestinal o que interfere indiretamente na secreção de leptina, influenciando os ritmos circadianos, que também favorecem a obesidade. Tais dados são confirmados por Kuo *et al.* (2022), que entrevistaram pouco mais de 75 mil pessoas com idade entre 30 e 64 anos, onde a frequência de consumo de bebidas adoçadas com açúcar foi associada às taxas elevadas de perímetro abdominal, colesterol total e LDL, triglicerídeos e glicose em homens e mulheres e hipertensão em mulheres. Mesmo um ligeiro aumento na frequência de ingestão desses alimentos ricos em açúcar foi relacionado ao aumento dos riscos metabólicos que podem contribuir para o desenvolvimento de CCNTs, entre elas o câncer (Kuo *et al.*, 2022). Subsequentemente, relatórios da *International Agency for Research into Cancer (IARC) and the World Cancer Research Fund (WCRF)* demonstraram que existe uma associação entre a obesidade e diferentes tipos de câncer como adenocarcinoma endometrial, esofágico, colorretal, mama pós-menopausa, próstata e rim. Essa associação se deve à mecanismos considerados comuns entre as duas condições como alterações no fator de crescimento semelhante à insulina I, nos esteroides sexuais e nas adipocinas. Além disso, vários novos mecanismos têm sido estudados como a inflamação crônica, estresse oxidativo, *crosstalk* entre células tumorais e adipócitos circundantes, migração de células estromais adiposas, hipóxia induzida

pela obesidade, suscetibilidade genética compartilhada e derrota funcional da função imunológica (De Pergola; Silvestris, 2013).

### 2.3 CÂNCER E SUA RELAÇÃO COM A NUTRIÇÃO

O câncer é uma enfermidade de origem multifatorial que resulta de processos inflamatórios impulsionados pela rápida multiplicação celular ocasionada por mutações em genes específicos que controlam o ciclo celular. Características comumente encontradas nas células cancerosas são a capacidade em evitar apoptose, induzir angiogênese, replicar ilimitadamente, produzir sinais de crescimento autossuficientes e invadir outros tecidos (Hanahan, 2022). Esses atributos permitem que as células cancerosas tenham crescimento ilimitado e sobrevivência prolongada, portanto, para evitar o câncer, esses processos precisam ser inibidos (Subramaniam; Selvaduray; Radhakrishnan, 2019).

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte e conseqüentemente uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo (INCA, 2022). No Brasil, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) estima para o triênio de 2023 a 2025, 704 mil novos casos de câncer em homens e mulheres, sendo desses 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2022). Além de seu impacto negativo na saúde e aumento da mortalidade, o custo econômico anual do câncer também é um fator importante e que impacta as políticas públicas. As principais abordagens para o tratamento de pacientes com câncer são a quimioterapia e a radioterapia, isoladamente ou em combinação. No entanto, estas estratégias de tratamento desencadeiam efeitos colaterais que em grande parte, superaram seus benefícios terapêuticos relacionados à natureza não seletiva dos fármacos quimioterápicos e a resistência adquirida devido as doses repetidas que precisam ser administradas para reduzir efetivamente o tamanho do tumor (Alam *et al.*, 2021). Outro fator que pode afetar o processo de recuperação do paciente com câncer é o estado nutricional. Uma dieta insuficiente pode provocar prejuízos imunológicos, intolerância ao tratamento e pode interferir na eficácia da quimioterapia em destruir as células cancerosas (Alam *et al.*, 2021).

A prevenção primária dos diferentes tipos de câncer é uma área de interesse científico, econômico e político. Devido à instabilidade genômica e variação fenotípica durante a progressão do tumor, uma demanda terapêutica potencial pode ser construída através da compreensão dos mecanismos subjacentes para que intervenções combinadas possam ser conduzidas com objetivo de fornecer vantagens com efeitos pleiotrópicos intrínsecos durante o tratamento e, principalmente a prevenção (Fan; Feng; Chen, 2020).

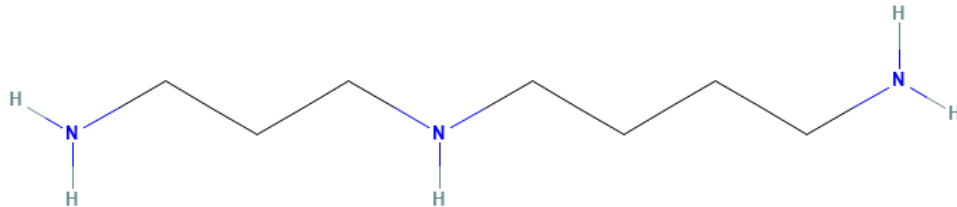
Além de uma dieta equilibrada em macro e micronutrientes, os compostos bioativos também podem representar uma estratégia importante na prevenção do câncer uma vez que, muitos destes compostos bioativos podem atuar como quimiopreventivos. Esses compostos podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto com outros agentes bioativos e/ou quimioterápicos e até mesmo como estratégias dietéticas visando interferir no processo de oncogênese. A estas substâncias têm sido atribuídas atividades antiproliferativas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antiangiogênicas, anti-invasivas, antimetastáticas, indução de apoptose, regulação do ciclo celular, supressoras de tumor e no direcionamento de células-tronco (Ganesan; Du; Chen, 2022). Entre os compostos bioativos amplamente estudados no tratamento do câncer podemos citar a delphinidina, naringenina, hesperetina, epigallocatequina, quercetina, rutina, curcumina, resveratrol, genisteína, daidzeína e ESP.

#### 2.4 ESPERMIDINA: VIA BIOSINTÉTICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A ESP, um tipo de poliamina, é um composto bioativo, catiônico trivalente encontrado em células eucarióticas, abundante em vegetais, carnes e peixes, pouco presente no leite e em alimentos ultraprocessados, mas é abundante em produtos alimentícios gerados por fermentação bacteriana ou fúngica (Figura 1). No corpo humano, sua presença se dá através da absorção de nutrientes, biossíntese intracelular e produção microbiana no intestino. Ao interagir com ácidos nucleicos, proteínas e outros poliânions por meio de ligação eletrostática, ESP se torna indispensável na divisão e proliferação celular, mantendo a homeostase genômica do DNA, regulando a transcrição e tradução gênica e modulando a autofagia, apoptose,

estresse oxidativo, angiogênese e comunicação celular (Fan; Feng; Chen, 2020; Pietrocola *et al.*, 2019).

Figura 1 – Estrutura química da espermidina



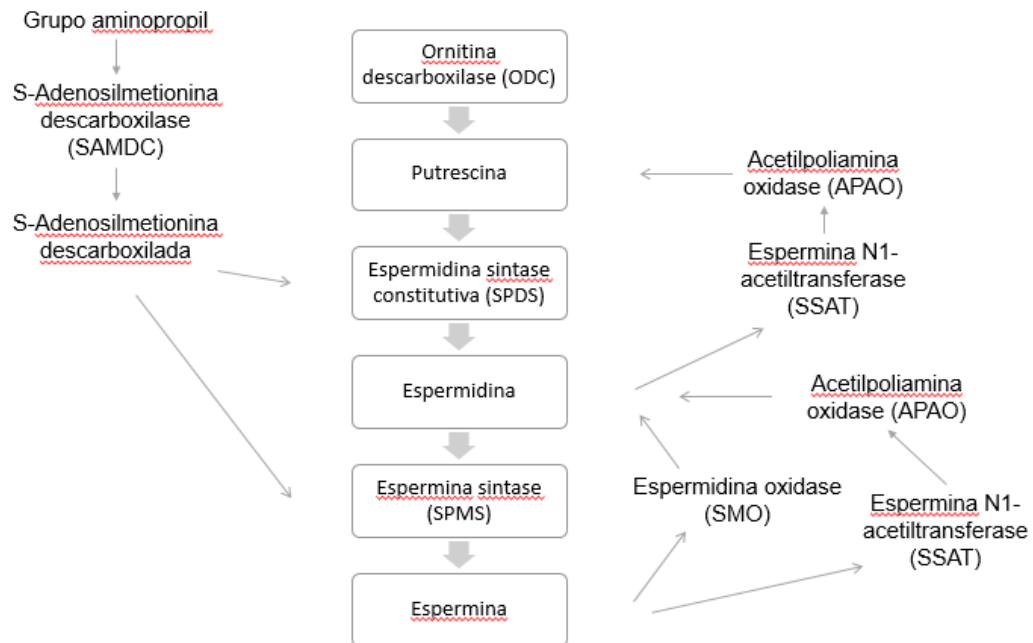
Fonte: Adaptado de CAS Common Chemistry, (s.d.).

O processo de formação da ESP, se dá através da ornitina descarboxilase (ODC) que catalisa a descarboxilação da l-ornitina para produzir putrescina. A putrescina é utilizada como substrato pela espermidina sintase constitutiva (SPDS), que transfere para a putrescina um grupo aminopropil doado pela S-adenosilmetionina descarboxilada, que é gerada por S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC). Da mesma forma, a espermina sintase (SPMS) transfere um grupo aminopropil para a ESP. A espermina oxidase (SMO) catalisa diretamente a conversão da espermina em ESP, e tanto a espermina N1-acetiltransferase (SSAT) quanto a acetilpoliamina oxidase (APAO) catalisam a conversão da espermina em ESP e ESP em putrescina (Figura 2) (Jiang *et al.*, 2021).

As poliaminas desempenham um importante papel na síntese e estabilidade de proteínas e ácidos nucleicos, proliferação celular, diferenciação, apoptose e estresse oxidativo (Jiang *et al.*, 2021). Estudos indicam que a suplementação com ESP pode ser capaz de estender a vida útil de camundongos idosos e exercer efeitos cardioprotetores, reduzindo a hipertrofia cardíaca e preservando a função diastólica (Eisenberg *et al.*, 2016; Minois, 2014). Wirth *et al.* (2021), realizaram um estudo com camundongos idosos suplementados com ESP por 6 meses na dose de 3 mM [aproximadamente 110 mg/kg peso corpóreo (pc)] e observaram que ESP exerce efeitos cardioprotetores em níveis histológicos acompanhados por uma diminuição no desgaste dos telômeros do tecido cardíaco e no surgimento de alterações necróticas no fígado em comparação com animais idosos não suplementados. Além disso, foi

observado que os animais suplementados com ESP não apresentaram aumento nas alterações neoplásicas em comparação com os animais idosos não suplementados, confirmando que a suplementação prolongada com ESP é segura em termos de indução de neoplasias.

Figura 2 – Via biossintética da espermidina



Fonte: Adaptado de Soda (2011).

Um nível adequado de ESP pode ser benéfico para a longevidade através da autofagia-dependente, pois durante o processo de envelhecimento, o teor de poliaminas no sangue total apresenta uma tendência de redução gradual conforme o aumento da idade. Estudos recentes mostraram potencial associação entre a ingestão de ESP na dieta e a sobrevivência prolongada em humanos, sugerindo que os indivíduos alimentados com dietas ricas em ESP em longo prazo podem apresentar menor mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer (Fan; Feng; Chen, 2020).

Cientistas recomendavam, antigamente, que houvesse cautela na ingestão de ESP em situações de crescimento celular descontrolado como é o caso do câncer, pois acreditava-se que essa e outras poliaminas, por desempenhar papéis fundamentais na divisão celular, proliferação e metabolismo pró-crescimento poderia favorecer a proliferação celular de células malignas (Handa; Fatima; Mattoo, 2018). No entanto, Fan, Feng e Chen (2020) reuniram dados que mostram que ESP pode

reduzir o crescimento de tumores transplantáveis, estimular a vigilância imunológica em combinação com a administração de quimioterápicos e suprimir a tumorigênese induzida por agentes químicos.

Pietrocola *et al.* (2016) mostraram que ESP atua à nível molecular provocando desacetilação proteica através da inibição de várias acetiltransferases, incluindo EP300, uma enzima que regula a expressão gênica pela acetilação da cromatina. ESP compete com acetilCoA para ligação ao sítio catalítico da EP300 o que altera a progressão e diferenciação do ciclo celular induzindo autofagia nos tumores.

Estudos realizados por Yue *et al.* (2017) demonstraram que camundongos suplementados com ESP na dose de 50mg/kg pc apresentaram menor formação de tumores de superfície após administração de ESP o que pode ser confirmado pelo estudo realizado por Gobert *et al.* (2022), onde camundongos suplementados com ESP, em uma quantidade 10 vezes maior do que a ingestão diária normal, apresentaram redução significativa no número de tumores de cólon. Al-Habsi *et al.* (2022) constataram que a suplementação com ESP contribui com a promoção da longevidade, superando a imunoterapia comprometida contra tumores em camundongos idosos, aumentando a função mitocondrial e ativando os linfócitos T CD8, capazes de induzir apoptose em infecções por mecanismos citotóxicos.

Embora a ESP apresente atividades promissoras, investigações minuciosas acerca da dose, tempo prolongado de exposição, tipo de lesão e mecanismo de ação ainda são dados insuficientes da literatura para apontar o efeito direto da administração dessa poliamina sob as lesões no DNA, sendo necessários estudos que sejam capazes de demonstrar melhor esse efeito.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PERFIL DIETÉTICO

A DH foi obtida por excesso calórico proveniente do enriquecimento da DP (Nuvilab® CR-1 irradiada) com 30% de sacarose, um carboidrato simples (Tabela 1) na forma de açúcar refinado (Fernández *et al.*, 2017). A quantidade de açúcar foi calculada com base no consumo alimentar diário médio de ração padrão (Tabela 2, Anexo I) e ofertada após ser diluída na água de beber. Considerando que os camundongos consomem em torno de 15 g de ração por 100g de peso/animal, um camundongo com peso médio de 30 g consome cerca de 4,5 g de ração padrão/dia. Com base no valor calórico de 336 kcal/100g de produto e para atingir um percentual de 30% de sacarose ofertada, cada camundongo recebeu 4,5 kcal advindas do acréscimo de sacarose, o que correspondeu a cerca de 1,2 g de açúcar a depender do peso dos animais.

Tabela 1 – Composição nutricional do açúcar refinado.

<b>Produto: Açúcar refinado*</b>	
Valor energético	387 Kcal
Umidade	0,1 %
Proteína	0,3 g
Carboidrato	99,5 g
Cálcio	4 mg
Magnésio	1 mg
Ferro	0,1 mg
Sódio	12 mg
Potássio	6 mg

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011).

Nota: Valores para 100g de produto. Kcal – quilocalorias. g – gramas. mg – miligramas, % - porcentagem.

Tabela 2 – Informação nutricional da DP

<b>Macronutrientes e micronutrientes /100g</b>	<b>Quantidade</b>	<b>VCT</b>
Energia (Kcal)	336 kcal	100%
Proteína	22 g	26,19%
Gordura	4 g	10,71%
Carboidratos	53 g	63,09%
Fibra Bruta	7 g	..
Cálcio	1 – 1,4 g	..
Fósforo	600 mg	..
Vitamina A	1300 mg	..
Vitamina D3	200 mg	..
Vitamina E	3,4 UI	..
Vitamina K3	0,3 mg	..
Vitamina B1	0,5 mg	..
Vitamina B2	0,6 mg	..
Vitamina B6	0,7 mg	..
Vitamina B12	2,2 mcg	..
Niacina	6 mg	..
Biotina	0,005 mg	..
Ácido pantotênico	2,1 mg	..
Colina	190 mg	..
Sódio	270 mg	..
Ferro	5 mg	..
Manganês	6 mg	..
Zinco	6 mg	..
Cobre	1 mg	..
Iodo	0,2 mg	..
Selênio	0,005 mg	..
Cobalto	0,15 mg	..
Fluor	6 mg	..
Lisina	1,2 g	..
Metionina	400 mg	..

Fonte: Nuvilab®

Nota: DP - Dieta padrão (Nuvilab CR-1 irradiada), VCT- valor calórico total, Kcal – quilocaloria, g – gramas, mg – miligramas, UI – unidade internacional, mcg – microgramas.

### 3.2 OBTENÇÃO DA ESPERMIDINA

ESP foi adquirida da Sigma-Aldrich® (CAS:124-20-9) e diluída em água destilada imediatamente antes da administração aos animais. As doses de 10 e 30 mg/kg pc foram administradas via oral (vo) e escolhidas com base em dados da literatura onde doses aproximadas de 20 e 25 mg/kg pc foram efetivas modular respostas inflamatórias, melhorar a morfologia intestinal, regular a microbiota, bem

como reduzir a adiposidade (Filfan *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2023b; Ma *et al.*, 2021; Pankoke *et al.*, 2022).

### 3.3 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

#### 3.3.1 Obtenção de componentes antioxidantes, compostos fenólicos e flavonóides

A uma alíquota de 1 g de ração padrão (Nuvilab® irradiada), 1ml de espermidina e 1g de açúcar refinado foi adicionada separadamente 9 ml de solução de álcool etílico 70% (v/v), sendo em seguida, as três amostras homogeneizadas em equipamento de vórtex de bancada durante 1 minuto. As misturas foram mantidas em banho de ultrassom a 40 °C por 60 min (Pinheiro *et al.*, 2021) e filtradas em papel de filtro qualitativo, sendo o volume ajustado para 10 ml com solução de álcool etílico 70% (v/v). Os extratos filtrados foram armazenados congelados a -18 °C até o momento das análises de potencial antioxidante.

#### 3.3.2 Determinação do potencial antioxidante

##### 3.3.2.1 Método de atividade de captura do radical ABTS

O potencial antioxidante foi determinado a partir do método espectrofotométrico de descoloração do radical catiônico ABTS, obtido a partir de sua neutralização com compostos antioxidantes presentes nas amostras, conforme metodologia descrita por Wang *et al.* (2021). As soluções de ABTS foram preparadas misturando 7 mM de solução aquosa de ABTS com 2,45 mM de solução de persulfato de potássio e incubado no escuro em temperatura ambiente, por 12h. As soluções resultantes foram diluídas até obtenção de absorvância igual a  $0,7 \pm 0,2$ , determinada em espectrofotômetro Bel Photonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel), ajustado em comprimento de onda de 734 nm. Consideramos a diferença de cor entre as leituras da solução completamente colorida, considerada a solução de 100% de radicais livres ABTS (750 µL de ABTS + 250 µL de solução de álcool etílico a 70% v/v) e da leitura da solução de radicais ABTS contendo a amostra (750 µL de ABTS + 250 µL de

amostra). Soluções branco foram preparadas em triplicata para cada uma das três amostras, substituindo a alíquota de amostra por água destilada e mantendo a solução de ABTS. Os valores de absorbância encontrados nas leituras de cada amostra foram descontados das soluções branco. Na sequência, o potencial antioxidante foi calculado por meio da equação da reta obtida em curva padrão de Trolox, construída a partir de faixa de sete pontos entre as concentrações de 0 a 7 nmol (Margraf; Granato, 2016; Re *et al.*, 1999).

### 3.3.2.2 Método da atividade de captura do radical DPPH

A atividade de captura do radical DPPH foi quantificada conforme metodologia descrita por (Wang *et al.*, 2021), com modificações, utilizando Trolox como padrão. Uma alíquota de 500 µL do extrato de ração padrão, assim como de açúcar refinado e espermidina, após diluição adequada foram misturadas separadamente com 500 µL de 0,15 nM de solução de DPPH, sendo manualmente homogeneizados e mantidos no escuro, em temperatura ambiente, por 30 min. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro ajustado a 517 nm 9Bel Photonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel) e calculadas a partir da equação da reta obtida por meio de uma curva de quantificação de sete pontos, considerando diferentes concentrações do padrão de Trolox (20-100 µg/ml) e a taxa de eliminação do radical DPPH. A solução de etanol (70% v/v) foi utilizada como controle negativo.

### 3.3.3 Determinação do teor de fenólicos totais

Para determinar o TPT foi utilizada a metodologia descrita por Wang *et al.* (2020) com modificações. Uma alíquota de 160 µL do extrato de ração e de açúcar refinado adequadamente diluídos foram adicionadas em tubos de ensaio, contendo 80 µL de Folin-Ciocalteu. As misturas foram manualmente homogeneizadas por 10 s (ou em vórtex de bancada por 5 s) e incubadas a 25 °C por 5 min. Um volume de 640 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5% p/v) foi adicionado a cada uma e incubado, ao abrigo da luz a 25 °C, por 30 min. As absorbâncias foram mensuradas a 756 nm no espectrofotômetro Bel Photonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel) e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico (mg/g).

### 3.3.4 Determinação do teor de flavonoides totais

O TFT das amostras foram determinados conforme o método descrito por Wang; Calvisi; Chen, (2021) com modificações. Foram colocados 125 µL do extrato de ração e de açúcar refinado adequadamente diluídos em tubos de ensaio, 37,5 µL de nitrato de sódio a 5% (p/v) e 500 µL de água ultrapura. As misturas foram agitadas por 5 segundos em vórtex de bancada e incubadas à temperatura de 25 °C por 5 min. Após o período de incubação foram adicionados 37,5 µL de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 10% (p/v) a cada mistura, e elas foram manualmente agitadas por 10 s (ou em vórtex de bancada por 5 s), sendo os tubos incubados a 25 °C por 5 min. Na sequência, foram adicionados 250 µL de hidróxido de sódio 1 M e 350 µL de água ultrapura, sendo os tubos novamente agitados e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro Bel Photonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel) em comprimento de onda de 510 nm. Uma curva padrão de catequina foi construída e utilizada para a quantificação, expressos em mg equivalentes de catequinas/g de amostra (mg EC/g).

## 3.4 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

### 3.4.1 Agente indutor de danos no DNA

Para indução dos danos no DNA foi utilizado o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS - Sigma-Aldrich® CAS: 66-27-3) na dose de 40 mg/kg (pc) diluído em água destilada e administrado via intraperitoneal (ip) (Damasceno *et al.*, 2016).

### 3.4.2 Animais

O experimento foi realizado utilizando camundongos machos, da espécie *Mus Musculus*, linhagem Swiss, com peso médio de 33 g provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura (23 ±

2°C), umidade ( $50 \pm 10\%$ ), 12h de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* à alimentação e água potável. O protocolo experimental desenvolvido foi submetido e aprovado (0040/2022 – Anexo II) pela CEUA-UNIFAL-MG.

### 3.4.3 Tratamentos

O período experimental, teve, ao todo, duração de 52 dias. Após retirada do biotério central, os animais permaneceram por 1 semana em aclimatação, período em que foram treinados para ingestão das doses de ESP vo, utilizando uma mistura de água potável com açúcar. Após treinamento, no 8º dia, os grupos de tratamento abaixo descritos foram iniciados e mantidos por 45 dias:

- 1) CN [Controle negativo - DP (Nuvilab® irradiada)];
- 2) DH (DP acrescida de 30% de açúcar refinado diluído na água de beber (ofertada na mamadeira));
- 3) ESP 10 (DP e ESP 10 mg/kg pc vo);
- 4) ESP 30 (DP e ESP 30 mg/kg pc vo);
- 5) DH + ESP 10 [DP acrescida de 30% de açúcar refinado diluído na água de beber (ofertada na mamadeira) e ESP 10 mg/kg pc vo];
- 6) DH + ESP 30 [DP acrescida de 30% de açúcar refinado diluído na água de beber (ofertada na mamadeira) e EP 30 mg/kg pc vo];
- 7) MMS [Controle positivo (CP) - DP].

Com 48h e 44 dias de tratamento, foram realizadas coletas de sangue periférico através de um pequeno corte na ponta da cauda do animal (previamente anestesiada com lidocaína 50mg/g, 30 min. antes do corte) para avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade dos tratamentos. No 44º dia, após a coleta de sangue, todos animais (exceto o grupo controle negativo) receberam o agente indutor de danos no DNA (MMS 40 mg/kg ip) para a indução da mutagenicidade.

No 45º dia, os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg pc) e Xilazina (10 mg/kg pc) ip para a coleta de sangue periférico por punção cardíaca que foi armazenado para futuros experimentos. Na sequência, foi realizada a laparotomia para excisão do fígado que foi utilizado nos ensaios cometa e de capacidade antioxidante endógena. Órgãos como coração, pulmão, rins, baço e trato gastrointestinal e carcaça foram coletados e armazenados em freezer -80°C para

futura avaliação da composição corporal e quantificação da gordura, respectivamente. Por fim, o conteúdo da medula óssea proveniente dos dois fêmures foi retirado para a avaliação do potencial quimiopreventivo dos tratamentos.

Os níveis de glicose sanguínea também foram quantificados nos tempos 0h (anterior ao início do protocolo experimental) e no 44<sup>o</sup> dia a fim de permitir entender o funcionamento do organismo mediante consumo de DH e ESP. Durante todo o período experimental, o peso, o consumo alimentar e hídrico foram monitorados diariamente a fim de detectar possíveis alterações relacionadas à sinais iniciais de toxicidade dos tratamentos.

#### **3.4.4 Avaliações murinométricas**

Para avaliações corporais murinométricas foram aferidos o peso em balança (Marte BL3200H 3200g) o comprimento naso-anal (CNA) e o perímetro abdominal (PAb) mensurados com auxílio de fita métrica. O índice de massa gorda foi determinado pelo Índice de Lee através da seguinte fórmula: [ $\sqrt[3]{}$  peso corporal (g) / distância naso-anal (cm)].

O índice de Lee e a massa gorda têm correlação, podendo ser usados como forma acurada e rápida para determinar o acúmulo de gordura corporal de modo que abaixo de 0,300 os índices são considerados adequados.

A avaliação do peso dos diferentes órgãos dos animais (coração, pulmão, rins, baço, trato gastrointestinal), assim como da carcaça, foi realizada no momento da eutanásia com auxílio de balança (Marte BL3200H), e os resultados foram expressos em peso relativo ([peso do órgão/peso do animal] \*100).

#### **3.4.5 Quantificação da glicemia**

Os níveis de glicose foram avaliados nos tempos 0h e 44 dias de tratamento, através de um pequeno corte na ponta da cauda do animal (lancetamento) e as medições foram realizadas utilizando o sistema de monitoramento de glicose no sangue (Freestyle Optium Neo, Abbott) e tiras de testes compatíveis para glicemia (Tiras Abbott Teste para glicose no Sangue Freestyle Optium).

### 3.4.6 Teste de micronúcleo em sangue periférico e medula óssea

Para avaliação da mutagenicidade, o sangue periférico de camundongos Swiss foi obtido através de um pequeno corte realizado na ponta cauda do animal e uma gota de sangue foi gotejada diretamente sobre a lâmina seca. Com uma lamínula foi realizado o esfregaço e, em seguida, o material foi seco a temperatura ambiente e fixado em metanol por 5 min. No dia seguinte, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:10 v/v) por 20 min. (Damasceno *et al.*, 2016; Macgregor; Wehr; Gould, 1980).

As células da medula óssea foram obtidas para avaliação do potencial quimiopreventivo dos tratamentos onde, após a eutanásia dos animais, os dois fêmures traseiros foram retirados, limpos em gaze e tiveram suas epífises cortadas. A medula óssea foi extraída com auxílio de uma seringa a partir de movimentos de aspiração e expiração, repetido até a retirada completa do conteúdo medular em soro bovino fetal (2 mL). Em seguida, o material foi centrifugado a 800 rpm (rotações por minuto) por 5 min., o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi homogeneizado e gotejado diretamente sobre uma lâmina limpa e seca e, com o auxílio de outra lâmina (extensora) foi realizado o esfregaço. Após secas, as lâminas foram fixadas em metanol por 5 min coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:30 por 5 min (Furtado *et al.*, 2018, Schmid, 1975).

Tanto para sangue periférico quando para medula óssea, as análises foram realizadas em microscópio comum, em aumento total de 1000X. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) foi determinada a partir da contagem de 4.000 EPCs (eritrócitos policromáticos) por animal. A citotoxicidade também foi avaliada, utilizando-se as mesmas lâminas preparadas para o teste do micronúcleo (MNs), a partir da contagem de 2.000 eritrócitos totais por animal, quantificando os que se apresentavam como normocromáticos (ENC) e policromáticos (EPC) para posterior obtenção da razão EPCs/PCEs+ENCs (OECD, 2016).

### 3.4.7 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado nos hepatócitos também para avaliação potencial quimiopreventivo. Foram coletos 0,4 g de fígado ressuspendido em 2 mL de uma

solução contendo *phosphate saline buffer* (PBS 1,8 mL) + Dimetilsulfóxido (DMSO 0,2 ml) e fragmentado mecânicamente. Em seguida, 10 µl da suspensão de células hepáticas foram homogeneizadas com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (Low melting point - *LMP*). As lâminas previamente revestidas com agarose normal (1,5%) receberam uma alíquota de 35 µl deste homogenato, foram cobertas com uma lamínula e mantidas em freezer por 5 minutos. Na sequência, as lâminulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução lise [2,5 M de cloreto de sódio (NaCl), 100 mmol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10M de Tris, 10% de DMSO, 1% de Triton X-100, Ph=10) overnight. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e mantidas no tampão alcalino de eletrotransferase [hidróxido de sódio (NaOH 300 mmol/L), EDTA 1 Mm, pH > 13) a 4°C durante 20 minutos. Após este processo, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica (25 volts, 300 miliampere e 7 watts), em banho de gelo, por 20 minutos. Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas com o tampão de neutralização (solução Tris a 0,4 M) por 5 minutos. Após secas, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos (Hartmann, 2003; Tice *et al.*, 2000). No momento da análise, as lâminas foram coradas com 35 µl de GelRed (1:2000) e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan) com aumento total de 40 X e filtro TRITC. As imagens foram capturadas utilizando software (GenAsis) e analisadas pelo software (ImageJ plugin OpenComet v1.3.1). Os danos no DNA foram mensurados utilizando a porcentagem de DNA na cauda do cometa.

#### **3.4.8 Quantificação das enzimas de defesa antioxidante endógena**

A atividade das enzimas endógenas de defesa antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram mensuradas no tecido hepático. Após a eutanásia, os fígados foram retirados e imediatamente transferidos para o ultrafreezer a - 80°C até a realização dos ensaios.

Os homogenatos foram preparados com 500 mg de tecido picotado em um tubo falcon com 5,0 mL de tampão Fosfato de potássio 50mM (pH 7,0). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por dez minutos a 4°C (Centrífuga eppendorf 5415R) e o sobrenadante foi recolhido e estocado no gelo para posterior quantificação.

#### 3.4.8.1 Superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD foi realizada pelo método descrito por Marklund e Marklund (1974), com modificações descritas a seguir. As reações foram conduzidas em tubos eppendorff de 2 mL, onde os reagentes piragalol -15mM (100  $\mu$ L) e MTT-1.25mM (40  $\mu$ L) e tampão Fosfato de potássio (pH 7,0) (660  $\mu$ L) foram acondicionados juntamente com 200 $\mu$ L de homogenato e incubados por 5 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 1000  $\mu$ L de DMSO e a leitura foi realizada a 570 nm em cubeta no espectrofotômetro (BePhotronics Ultraviolet/Visible-M51, Monza, Milan, Italy). Uma unidade (U) de SOD corresponde a oxidação de 50% do pirogalol. O branco das amostras foi subtraído e em seguida dividido pelo padrão. O resultado foi expresso em U/mg de proteínas, dividindo U pela quantidade de proteína total (mg).

#### 3.4.8.2 Catalase

A atividade CAT foi determinada por meio da medida da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em comprimento de onda de 240 nm (pico de absorção sem a presença de interferentes), de acordo com o protocolo proposto por Aebi (1984) com modificações descritas a seguir. O meio reacional contendo 980  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (10mM) foi previamente acondicionado em tubo eppendorff e encubado por dois minutos a 25°C. Em seguida 20  $\mu$ L de homogenato e tecido hepático previamente diluído (5x) em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) foram adicionados e encubados por um minuto. As absorbâncias foram lidas entre 1 e 3 min observando-se os melhores tempos onde o decaimento da absorbância era linear em espectrofotômetro (BePhotronics Ultraviolet/Visible- M51, Monza, Milan, Italy) a 240 nm em cubeta de quartzo. A atividade foi calculada com base no valor do coeficiente de absorvidade molar do  $H_2O_2$  em 240 nm = 39,4 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o cálculo da concentração de  $H_2O_2$ . Os resultados foram expressos em U/mg de proteínas, dividindo U pela quantidade de proteína total (mg).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em todos os ensaios foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*p-value*”. Nos casos em que  $p < 0,05$ , as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey utilizando o programa Graph Pad Prism (Versão 8.4.3).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

Aproximadamente  $2 \times 10^4$  eventos nocivos ao DNA ocorrem diariamente em todas as células do corpo humano. Uma parte significativa desses danos é causada por espécies reativas de oxigênio (EROs). O efeito da produção excessiva de EROs e/ou do desajuste dos sistemas de defesa celulares antioxidantes é conhecido como estresse oxidativo e pode desencadear vários tipos de danos ao DNA, incluindo purinas e pirimidinas oxidadas, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e sítios abásicos. A detecção dos danos e seus alvos biológicos é essencial para elucidar seus mecanismos de atividade e possibilitar o desenvolvimento de estratégias de intervenção antioxidante para combater as doenças associadas ao estresse oxidativo (Barzilai; Yamamoto, 2004; Stefanou *et al.*, 2022). Para minimizar o impacto de um desequilíbrio entre EROs e antioxidantes, as investigações de substâncias com potencial antioxidante são fundamentais (Santi-Rampazzo *et al.*, 2015).

Tendo em vista que os tipos de radicais livres e a forma como os mesmos atuam no organismo são diferentes, não há um método simples e universal capaz de determinar com exatidão o potencial antioxidante (Martemucci *et al.*, 2022). Com a finalidade de direcionar posteriores análises moleculares que investiguem o mecanismo de ação, foram realizadas a avaliação do potencial antioxidante da DP, DH e da ESP pelos métodos de atividade de captura do radical ABTS e DPPH, os quais são capazes de detectar atividade antioxidante em baixas concentrações e que normalmente estão diretamente relacionados ao teor de flavonoides e compostos fenólicos presentes na amostra (Barbosa *et al.*, 2023) e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Demonstramos que a ração padrão utilizada na DP possui  $1,54 \pm 0,03$  equivalente em ácido gálico (mg/g) de fenólicos e  $0,60 \pm 0,03$  equivalentes de catequinas (mg/g) de flavonoides totais. Quando calculada a capacidade inibitória, a redução dos radicais ABTS foi de  $6830 \pm 200$  equivalentes em trolox (nmol/g), maior do que o resultado para DPPH que foi de  $3240 \pm 90$  equivalentes em trolox (nmol/g). A capacidade da sacarose em reduzir os radicais DPPH foi de  $103,64 \pm 10,33$  equivalentes em trolox (nmol/g), enquanto da ESP foi de  $15,22 \pm 0,57$  equivalentes em trolox (nmol/g).

Tabela 3 – Potencial antioxidante, TFT e TPT presentes na DP, sacarose e ESP.

Amostra	Fenólicos totais*	Flavonoides totais**	Potencial antioxidante	
			ABTS***	DPPH***
DP <sup>a</sup>	1,54 ± 0,03	0,60 ± 0,03	6830 ± 200	3240 ± 90
Sacarose	...	...	...	103,64 ± 10,33
ESP	-	-	...	15,22 ± 0,57

Fonte: Do autor (2024).

Nota: Resultados expressos em média ± desvio padrão. <sup>a</sup>Nuvilab® irradiada \*Equivalente em ácido gálico (mg/g), \*\*Equivalente em catequina (mg/g), \*\*\*Equivalentes em trolox (nmol/g). TFT – teor de flavonoides totais, TPT – teor de fenólicos totais, ESP – espermidina, ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácidosulfônico), DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

De acordo com Kosakowska *et al.* (2021) o orégano pode ser considerado uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Esses autores avaliaram, por meio do ensaio de captura do radical ABTS, a atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato de orégano grego (OG) e do orégano comum (OC). O estudo revelou potencial antioxidante (nmol Trolox/g) nas diferentes amostras, sendo o óleo essencial de OG um equivalente de  $3,40 \times 10^5 \pm 3,10 \times 10^3$ , o óleo essencial de OC  $3,42 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^3$ , o extrato de OG  $3,81 \times 10^5 \pm 2,40 \times 10^3$  e extrato de OC  $3,97 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^3$ . Segundo Nowak *et al.* (2023), o Camu-camu (*Myrciaria dúbia*), uma fruta tropical exótica originária da floresta amazônica é considerada uma das fontes naturais mais ricas em vitamina C do mundo, onde o teor dessa vitamina chega a 1150 mg/100g. Os autores avaliaram o potencial antioxidante dessa fruta exótica tendo encontrado para DPPH  $5763 \times 10^{-6} \pm 247 \times 10^{-6}$  (equivalentes de Trolox nmol/g) e ABTS  $6981 \times 10^{-6} \pm 349 \times 10^{-6}$  (equivalentes de Trolox nmol/g). Os resultados desses estudos demonstram uma atividade antioxidante significativamente superior à encontrada para a DP, sacarose e, principalmente ESP em nosso estudo.

Xie *et al.* (2023) analisaram mudas de cevada germinadas com diferentes compostos capazes de produzir maior produto de degradação da ESP e, constataram que, a muda com maior teor dessa poliamina, tratada com cloridrato de aminoguanidina 2,5 mM, apresentou para DPPH  $14.520 \pm 540$  (nmol TE/g DW). Isso evidencia que, apesar de ESP apresentar algum nível de atividade antioxidante, esta é relativamente baixa quando comparada a outros compostos antioxidantes, como por exemplo a quercetina que possui uma estrutura química que facilita a doação de átomos de hidrogênio e a estabilização dos radicais livres formados (Heim;

Tagliaferro; Bobilya, 2002), e que de acordo com Chittasupho *et al.* (2021) apresentou para DPPH (IC<sub>50</sub>) 26,94 equivalentes em trolox (nmol/g).

## 4.2 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

### 4.2.1 Consumo alimentar, hídrico, de sacarose e energia total

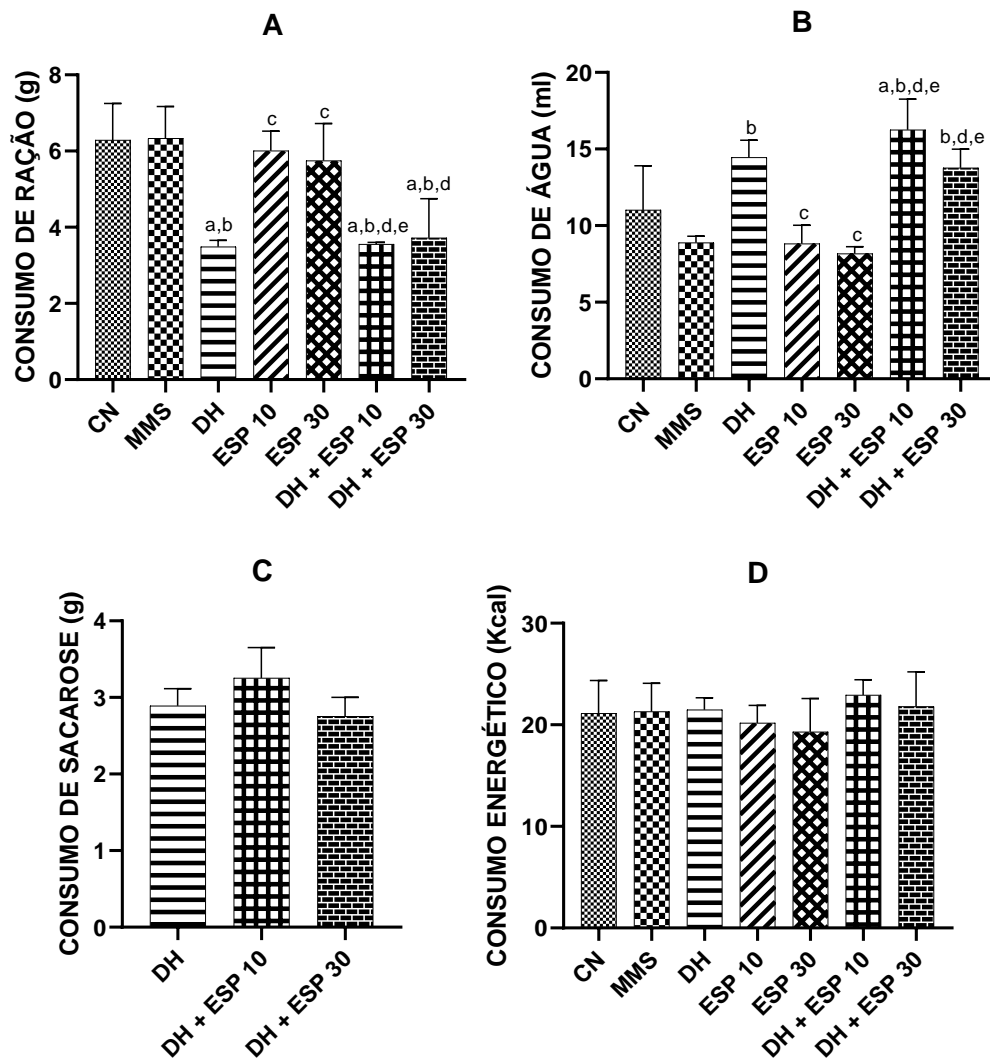
Com a finalidade não só de avaliar os efeitos da suplementação com ESP em roedores alimentados com DH, rica em sacarose, antes e após indução de mutagenicidade, mas também de avaliar se a sacarose poderia influenciar nos efeitos da ESP, os grupos experimentais foram suplementados com ESP nas doses de 10 e 30 mg/kg pc associadas ao consumo de sacarose.

Os resultados de consumo de ração padrão, água e sacarose bem como do consumo energético total de todo o período experimental dos diferentes grupos de tratamento foram monitorados e os dados estão apresentados na Figura 3 (A-D). Os grupos DH, DH + ESP 10 e DH + ESP 30, apresentaram um consumo de ração significativamente menor quando comparados ao grupo CN. Os grupos DH, DH + ESP 10 e DH + ESP 30 apresentaram um consumo de ração significativamente menor quando comparados ao grupo MMS. Os grupos ESP 10 e ESP 30 apresentaram um consumo de ração significativamente maior quando comparados ao grupo DH. Os grupos DH + ESP 10 e DH + ESP 30, apresentaram um consumo de ração significativamente menor quando comparados ao grupo ESP 10. O grupo DH + ESP 10 apresentou um consumo de ração significativamente menor quando comparado ao grupo ESP 30 (Figura 3 A).

No consumo hídrico, os resultados obtidos evidenciam que o grupo DH + ESP 10 apresentou um consumo hídrico significativamente maior quando comparado ao grupo CN. Os grupos DH, DH + ESP 10 e DH + ESP 30 apresentaram um consumo hídrico significativamente maior quando comparados ao grupo MMS. Os grupos ESP 10 e ESP 30 apresentaram um consumo hídrico significativamente menor quando comparados ao grupo DH. Os grupos DH + ESP 10 e DH + ESP 30, apresentaram um consumo hídrico significativamente maior quando comparado ao grupo ESP 10. Os grupos DH + ESP 10 e DH + ESP 30, apresentaram um consumo hídrico significativamente maior quando comparado ao grupo ESP 30 (Figura 3 B).

Dados acerca do consumo de sacarose demonstraram que não houveram diferenças significativas entre os grupos que receberam sacarose, mesmo quando a suplementação com ESP adicionada. No entanto, embora não tenha sido significativo, foi possível constatar um consumo ligeiramente maior de sacarose no grupo DH + ESP 10 quando comparado aos grupos DH e DH + ESP 30 (Figura 3 C).

Figura 3 – Consumo médio diário de ração (A), água (B), sacarose (C) e energia total (D) durante o período experimental.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CN – controle negativo, MMS – metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n$  médio = 9 animais por grupo). <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo CN, <sup>b</sup>Significativamente diferente do grupo MMS, <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo DH, <sup>d</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 10, <sup>e</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 30.

Os resultados de consumo energético total demonstraram ausência de diferenças significativas entre os grupos, evidenciando um consumo energético total semelhante entre os grupos independentemente do tratamento.

A redução do consumo de ração padrão apresentado pelos grupos que receberam DH pode ser justificada pelo complexo processo de regulação da homeostase energética resultante da interação de hormônios e neuromoduladores no hipotálamo do sistema nervoso central. Uma das adipocinas envolvidas no metabolismo energético, a quemerina codificada pelo gene *RARRES2* (*Retinoic Acid Receptor Responder 2*) é um importante mediador sanguíneo que, entre outras funções, controla o apetite e o peso corporal. Essa adipocina atua no momento em que as necessidades energéticas são alcançadas, portanto quando os animais consomem a sacarose, que é uma fonte energética, essa adipocina atua reduzindo o consumo de ração para equilibrar o consumo energético (Yun *et al.*, 2022).

A redução na ingestão de alimentos em dieta rica em sacarose, assim como a utilizada no presente estudo também foi demonstrada por Hayward *et al.* (2006), em um teste com camundongos geneticamente modificados observaram que todos os genótipos em estudo, tendo livre oferta de diferentes concentrações de sacarose, diminuíram a ingestão de alimentos. Korgan *et al.* (2023) confirmam esses achados através de um estudo realizado com camundongos tratados com água a 10% de sacarose, onde a ingestão da ração foi menor nos grupos em que os camundongos consumiram sacarose em comparação com os grupos de camundongos alimentados somente com ração padrão e água.

O alto consumo de água adoçada pode ser explicado pela própria presença da sacarose na água, que além de ser uma mistura palatável, também recruta maior ingesta hídrica (Garcia *et al.*, 2021). Wu *et al.* (2023) observaram resultados semelhantes em relação ao alto consumo hídrico em DH, ao tratar camundongos com 60 mg/ml de sacarose na água, onde os grupos que receberam sacarose consumiram mais água quando comparados ao grupo controle. Já em relação à não influência da ESP no consumo hídrico, Wirth *et al.* (2021), que suplementaram camundongos idosos com água potável com adição de ESP na concentração de 3 mM [correspondente a aproximadamente 110 mg/kg pc], também não notaram diferenças na ingesta hídrica desses animais, o que sugere que não existem efeitos adversos aparentes da administração de ESP que requerem aumento do consumo hídrico. De

maneira geral, é possível observar que a suplementação com ESP não apresentou efeitos tóxicos iniciais, pois além de não provocar mudanças no consumo hídrico, também não alterou o consumo energético médio diário.

#### 4.2.2 Avaliações murinométricas

Entre os fatores de risco associados à carcinogênese existem aqueles que não são modificáveis, como por exemplo, idade e sexo, e os modificáveis por meio de alterações no estilo de vida como redução do consumo de álcool, prática de exercícios físicos e melhora dos padrões alimentares. Dentre os fatores de risco modificáveis, a alimentação desequilibrada e o excesso de peso podem contribuir com cerca de 13 tipos diferentes de câncer e a inflamação crônica elevada pode aumentar ainda mais esse risco (Bevel *et al.*, 2023). Tendo em vista a importância da alimentação e da composição corporal na saúde e prevenção do desenvolvimento de alguns tipos de câncer, com o objetivo de avaliar os dados murinométricos, semanalmente, durante todo o período experimental foram quantificados o peso, a PAb, o CNA e o índice de Lee foi calculado. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

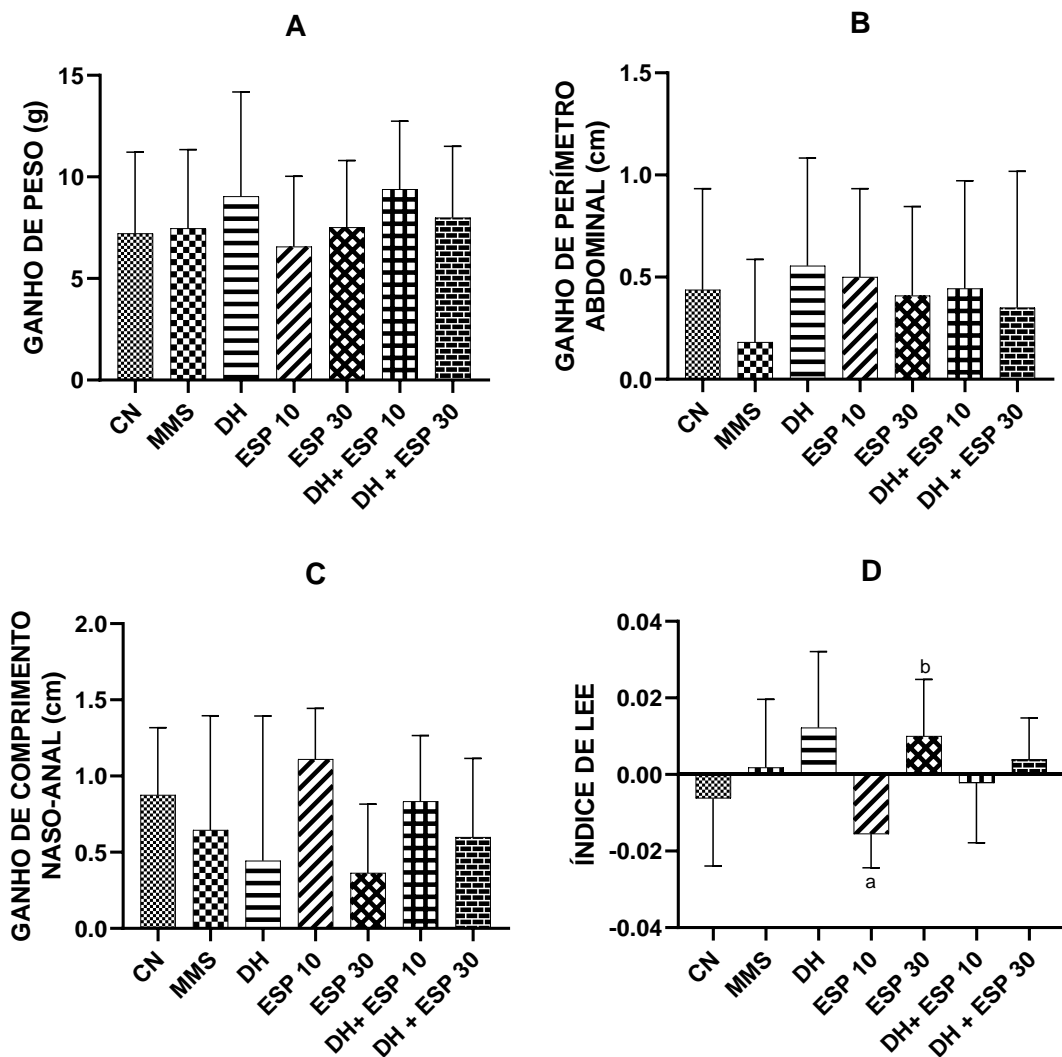
De modo geral, os animais ganharam em média 7,9 g durante o todo o período experimental. Não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos quando comparado ao CN, ou seja, a administração de sacarose não foi capaz de aumentar significativamente o peso, embora, possa ser observado que dois dos três grupos tratados com a DH (DH, DH + ESP 10) apresentaram um ganho de peso um pouco mais elevado ( $9,0 \pm 5,1$  e  $9,4 \pm 3,3$  respectivamente). O grupo DH + ESP 30 apresentou um ganho de  $8,0 \pm 3,5$ , enquanto os grupos CN, MMS, ESP 10 e ESP 30 apresentaram ganho de  $7,2 \pm 4,0$ ;  $7,5 \pm 3,9$ ;  $6,6 \pm 3,5$  e  $7,5 \pm 3,3$  g respectivamente (Figura 4 A).

Ausência de diferenças significativas também foi encontrada para o ganho de PAb em todos os grupos estudados quando comparados ao CN. O PAb inicial apresentou uma média de  $8,0 \pm 0,5$  cm enquanto o PAb final foi de  $8,4 \pm 0,5$  cm, portanto, um ganho médio de  $0,4 \pm 0,5$  cm (Figura 3 B). Para o CNA, os resultados demonstram que não houveram diferenças significativas entre os grupos (Figura 4 C).

O Índice de Lee, juntamente com informações de peso, PAb e CNA, é uma variável importante para avaliação da composição corporal, sendo considerado um método rápido e acurado de investigar obesidade em roedores submetidos a uma

alimentação hipercalórica. Em nossos resultados, o índice de Lee inicial foi exatamente o mesmo do final ( $0,33 \pm 0,01 \text{ cm/g}^2$ ), estando este no limite inferior do excesso de gordura corporal ( $< 0,30$ ). Os resultados da diferença entre o índice de Lee inicial e final mostram que o grupo ESP 10 apresentou um resultado significativamente menor do que o grupo DH enquanto o grupo ESP 30 apresentou um resultado significativamente maior que do grupo ESP 10 (Figura 4 D).

Figura 4 – Ganho de peso corporal (A), PAb (B), CNA (C) e diferença entre índice de Lee inicial e final (D) dos camundongos Swiss submetidos aos diferentes tratamentos.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CN – controle negativo, MMS – metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n$  médio = 9 animais por grupo). <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo DH, <sup>b</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 10. D – Corresponde à diferença entre o índice de Lee inicial e final.

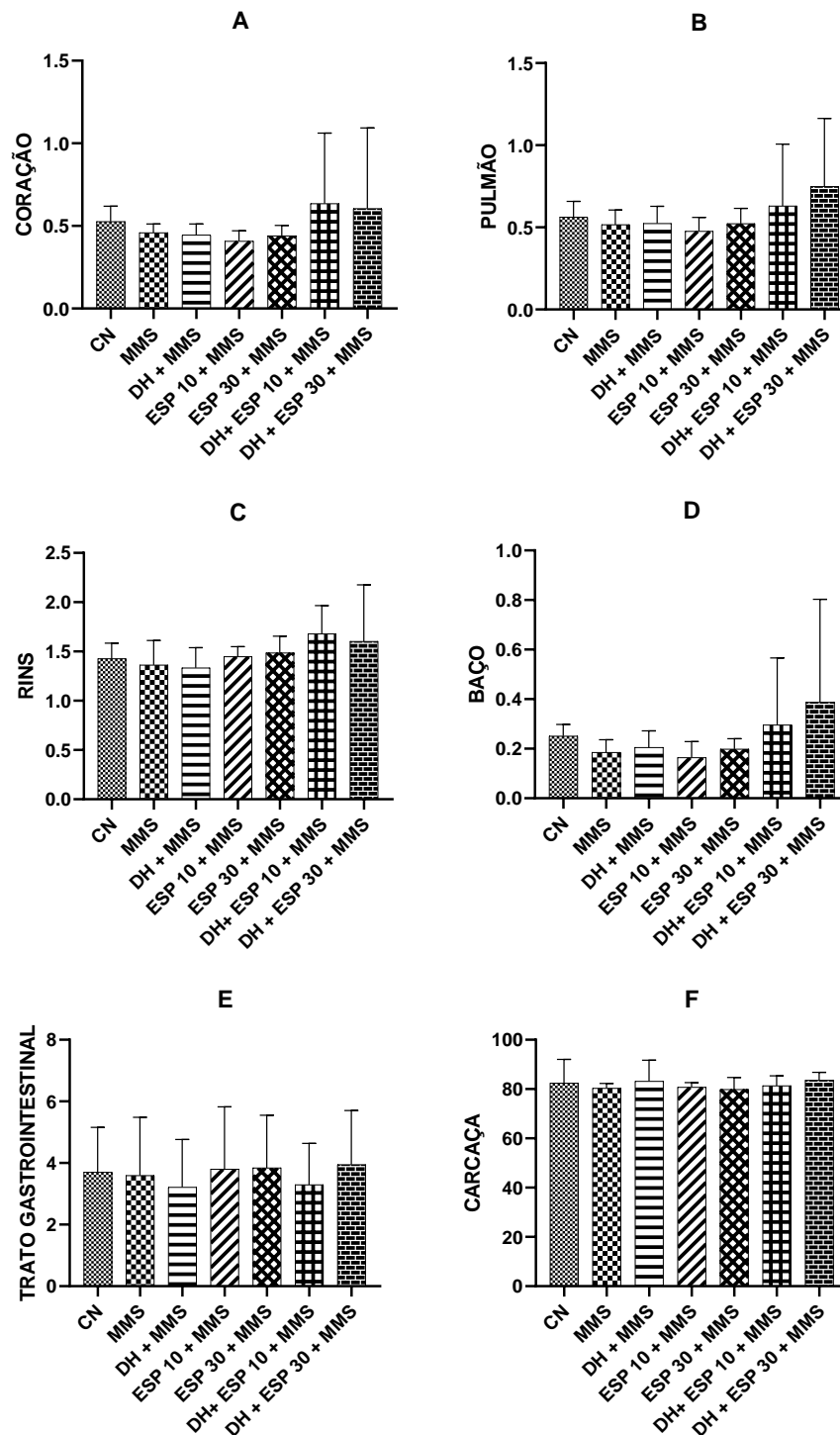
Realizamos a avaliação do peso dos órgãos como coração, pulmão, rins, baço, trato gastrointestinal, bem como da carcaça a fim de correlacionar possíveis alterações com o peso corporal e os resultados demonstram que não houve diferença significativa no peso de nenhum dos órgãos entre os grupos (Figura 5 A-F).

Dubljević *et al.* (2022), ao avaliarem o comportamento de camundongos alimentados com diferentes concentrações de sacarose observaram que o consumo de açúcar não afetou o peso corporal dos animais, ou seja, não induziu sobrepeso, assim como Korgan *et al.* (2023) que também não constataram diferenças no ganho de peso corporal entre camundongos tratados com 10% de sacarose na água, corroborando com os achados desse estudo.

Wirth *et al.* (2021) avaliaram o impacto potencialmente benéfico do tratamento de camundongos idosos alimentados com dieta padrão e suplementados com ESP na concentração de 3mM [aproximadamente 110 mg/kg pc] diluída em água potável por 24 semanas em órgãos comumente afetados pela idade e verificaram que o tratamento com essa poliamina não resultou em diferenças significativas no ganho de peso corporal dos animais. Schipke *et al.* (2019) também constataram que a suplementação com ESP na concentração de 3 mM [aproximadamente 110 mg/kg pc] na água de beber dos camundongos não exerceu um efeito significativo no peso corporal final, após suplementarem os animais por 20 semanas e avaliarem se as mudanças dietéticas induzidas por sacarose e gordura impactavam no peso corporal, ingestão de calorias, concentrações de lipídios circulantes, tolerância à glicose e composição da microbiota intestinal e se poderiam ser aliviadas ou evitadas pela suplementação com ESP.

Por outro lado, Pankoke *et al.* (2022) verificaram que uma suplementação de ESP na concentração de 3mM [aproximadamente 110 mg/kg pc] diluída na água de beber de camundongos alimentados com PD e uma dieta com alto teor de sacarose por 30 semanas resultou em pesos corporais diminuídos no final da duração experimental. A diferença entre os resultados obtidos nesses estudos pode ser explicada pela diferença entre os protocolos de dieta, pois o estudo realizado por Schipke *et al.* (2019) utilizou ração com alto teor de gordura e sacarose e o estudo realizado por Pankoke *et al.* (2022) utilizou somente ração padrão com alto teor de sacarose.

Figura 5 – Peso relativo (%) do coração (A), pulmão (B), rins (C), baço (D), trato gastrointestinal (E) e carcaça (F) dos camundongos Swiss submetidos aos diferentes grupos de tratamento.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CN – controle negativo, MMS – metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Os valores foram calculados em peso relativo (peso do órgão em relação ao peso do animal) e expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os animais receberam os diferentes tratamentos por 45 dias e no 44º dia o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS 40 mg/kg pc) foi administrado. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n$  médio = 9 animais por grupo).

Além disso, os tempos de tratamentos dos estudos aqui referidos foram diferentes, o que também pode ser uma variável a influenciar os resultados de peso dos animais.

Ao estratificar o risco à saúde e à tendência a desenvolver obesidade, a PAb deve ser um parâmetro avaliado, pois é um método simples que avalia adiposidade abdominal e permite um refinamento adicional ao IMC que, isoladamente, é um índice inespecífico de presença de tecido adiposo nessa região (Ross *et al.*, 2020). Diferente do ocorrido nesse estudo onde não houveram diferenças significativas entre o ganho de PAb de todos os grupos tratados em relação ao grupo CN, Oliva *et al.* (2021), encontraram uma diferença significativa no PAb de ratos Wistar alimentados cronicamente com uma dieta rica em sacarose durante 6 meses. Angélico *et al.* (2012) também não encontraram diferenças significativas entre ratos Wistar alimentados com dieta rica em sacarose por 4 semanas, podendo indicar que o modelo experimental, bem como o tempo aumentado de exposição dos animais à sacarose pode contribuir para o ganho de PAb.

Em humanos, o crescimento estatural depende da interação de múltiplas variantes genéticas e do ambiente. Entre os fatores ambientais conhecidos por regular o crescimento, a nutrição tem um papel significativo (Wu; Zhang; De Luca, 2019). Diferentemente dos nossos resultados onde não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos, Alves *et al.* (2017), em um estudo com ratos Wistar obesos tratados com dieta hiperlipídica e sacarose em água por 7 semanas observaram, durante o tratamento, um ganho em CNA maior no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Wu, Zhang e De Luca (2019) em um estudo realizado com camundongos geneticamente modificados, observaram que, o aumento do CNA após 4 semanas de DH (rica em gordura) foi significativamente maior do que nos animais alimentados com uma DP.

A razão pela qual nossos achados se diferenciam desses estudos pode ser explicada pelo tipo de dieta e modelo experimental, pois os dois estudos mencionados acima utilizaram lipídios e nosso estudo ofereceu um carboidrato, no caso a sacarose, como forma de atingir o consumo energético excessivo.

Em relação ao índice de Lee, diferentemente dos achados nesse estudo, Malafaia *et al.* (2013) estudando ratos Wistar suplementados com sacarose na água, determinaram o índice de Lee aos 91 dias e os resultados não apresentaram diferença

significativa em relação ao grupo controle. Porém, Alves *et al.* (2017) em um estudo com ratos Wistar tratados com dieta hiperlipídica e sacarose em água, observaram que o índice de Lee foi maior em animais com dieta hiperlipídica e sacarose do que no respectivo controle tratado com DP, permanecendo maior entre 17-20 semanas de idade.

Em relação ao efeito da ESP no índice de Lee dos animais, não foram encontrados na literatura trabalhos que comprovassem algum tipo de efeito na redução ou aumento desse índice, e apesar de no nosso estudo, o tratamento com ESP 10 ter apresentado uma pequena redução quando comparado ao grupo que recebeu sacarose (DH), não há, até o momento, como afirmar que a ESP exerça um efeito na redução desse índice. Porém, quando avaliamos o peso corporal, que é um dos parâmetros que compõe esse índice, estudos como o realizado por Pankoke *et al.* (2022) demonstram que a suplementação de ESP na concentração de 3mM [aproximadamente 110 mg/kg pc] diluída em água de beber resultam em pesos corporais diminuídos, mesmo nos grupos tratados com sacarose, o que pode indicar que diferentes concentrações de ESP podem alterar esse índice.

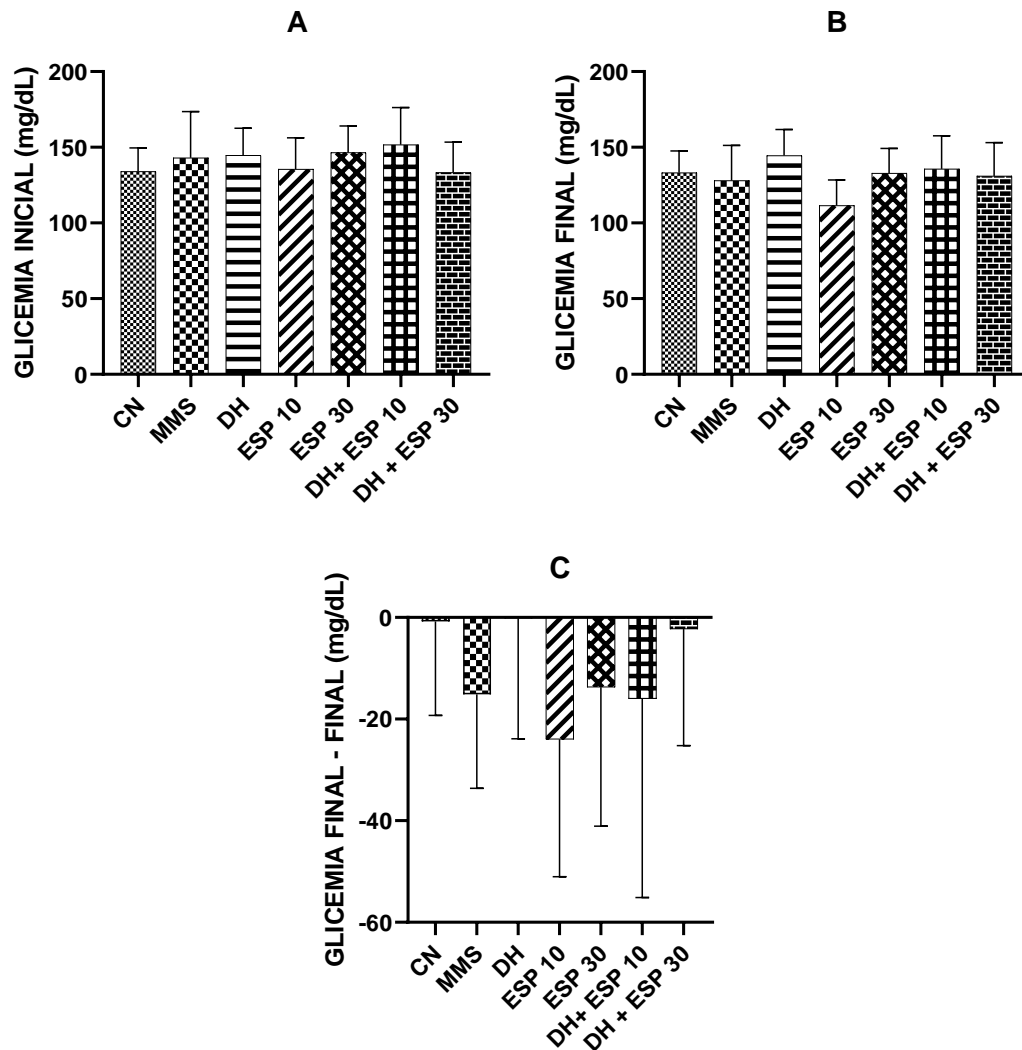
Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o peso dos órgãos de animais tratados com sacarose e ESP concomitantemente, porém, em relação à composição corporal dos animais, Szydłowska *et al.* (2023), em um estudo com camundongos portadores de esteatohepatite não alcoólica alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com ESP (3 mM) por 12 semanas, avaliaram massa magra, massa gorda e fluidos corporais dos animais e concluíram que a composição corporal não foi afetada pela suplementação, corroborando com nossos achados. Já em relação à influência da sacarose na composição corporal dos animais, Yan *et al.* (2022), em um estudo que avaliou se o consumo crônico de uma dieta rica em sacarose é capaz de induzir obesidade, observaram que a porcentagem de gordura corporal e massa magra entre camundongos tratados com 10 e 25% de sacarose não apresentou diferenças estatísticas significativas, e portanto, não afetou a composição corporal, assim como no nosso estudo.

#### **4.2.3 Avaliação da glicemia**

Para avaliar se o consumo de sacarose e/ou de ESP seriam capazes de influenciar o nível glicêmico dos animais, esse parâmetro foi avaliado nos tempos 0h

e 44 dias e os resultados obtidos são apresentados na Figura 6. Na avaliação inicial, tempo 0h, todos os animais ainda estavam sendo alimentados com DP, logo nenhum dos grupos apresentaram diferença significativa (Figura 6A).

Figura 6 – Glicemia inicial (A), final (B) e diferença de glicemia (final – inicial) (C) em camundongos Swiss submetidos aos diferentes tratamentos.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CN – controle negativo, MMS – metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n = 6$  animais por grupo).

No 44<sup>o</sup> dia de tratamento, a glicemia não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, porém é possível observar que o grupo DH foi o que apresentou maiores níveis glicêmicos (Figura 6B). Em relação a diferença de glicemia (final menos a inicial), os resultados também não demonstraram diferenças

significativas, no entanto, é possível observar que todos os grupos de tratamento apresentaram alguma redução nesse parâmetro quando comparado com o grupo tratado com DH (Figura 6C).

Em humanos, uma dieta rica em açúcar, independentemente das taxas de obesidade ou da quantidade de outros tipos de alimentos consumidos, pode estar atrelada ao desenvolvimento de diabetes (Morais *et al.*, 2021) e portando, o monitoramento glicêmico pode contribuir para o diagnóstico dessa condição crônica, mas além disso, pode auxiliar no estabelecimento de intervenções que retardem o descontrole glicêmico e consequente progressão de complicações microvasculares derivadas de altas taxas de glicemia no sangue (Ling *et al.*, 2022). Ainda nesse sentido, níveis glicêmicos elevados geram EROs como resultado da auto-oxidação da glicose, metabolismo e formação de produtos finais de glicosilação avançada (Ha; Lee, 2000) o que por sua vez causa estresse oxidativo que pode danificar o DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para o processo de carcinogênese em geral (Reuter *et al.*, 2010).

Diferente dos nossos achados, Wu *et al.* (2023), ao alimentarem camundongos com sacarose ofertada em água observaram que esse consumo, em comparação com os grupos que receberam água pura, resultou em um aumento significativo do nível de glicose no sangue mesmo quando os animais estavam em jejum, o que pode ser explicado por uma possível resistência à insulina desenvolvida por esses animais, onde a constante elevação das taxas glicêmicas pode desencadear um aumento na secreção pancreática de insulina desencadeando um estado hiperinsulinêmico seguido de uma temporária tolerância à glicose (Ginsberg, 2000).

Em concordância com nossos resultados, Yan *et al.* (2022) em um estudo de consumo crônico de uma dieta rica em açúcar realizado com camundongos C57BL/6N tratados com 25 ou 10% de sacarose, constataram que não houveram diferenças estatísticas significativas nos níveis de glicose no sangue em jejum entre os grupos em diferentes fases da vida. Além disso não houve diferenças significativas na expressão gênica para glicose 6-fosfatase (*G6PC*), glicogênio sintase (*GYS1*) e fosfoenolpiruvato carboxicinase (*PCK1*) entre os grupos, o que pode mostrar que os efeitos potenciais do consumo de sacarose sob a glicemia podem ser atenuados pela própria absorção de glicose mediada pela insulina.

#### 4.2.4 Avaliação da citogenotoxicidade e do potencial antimutagênico

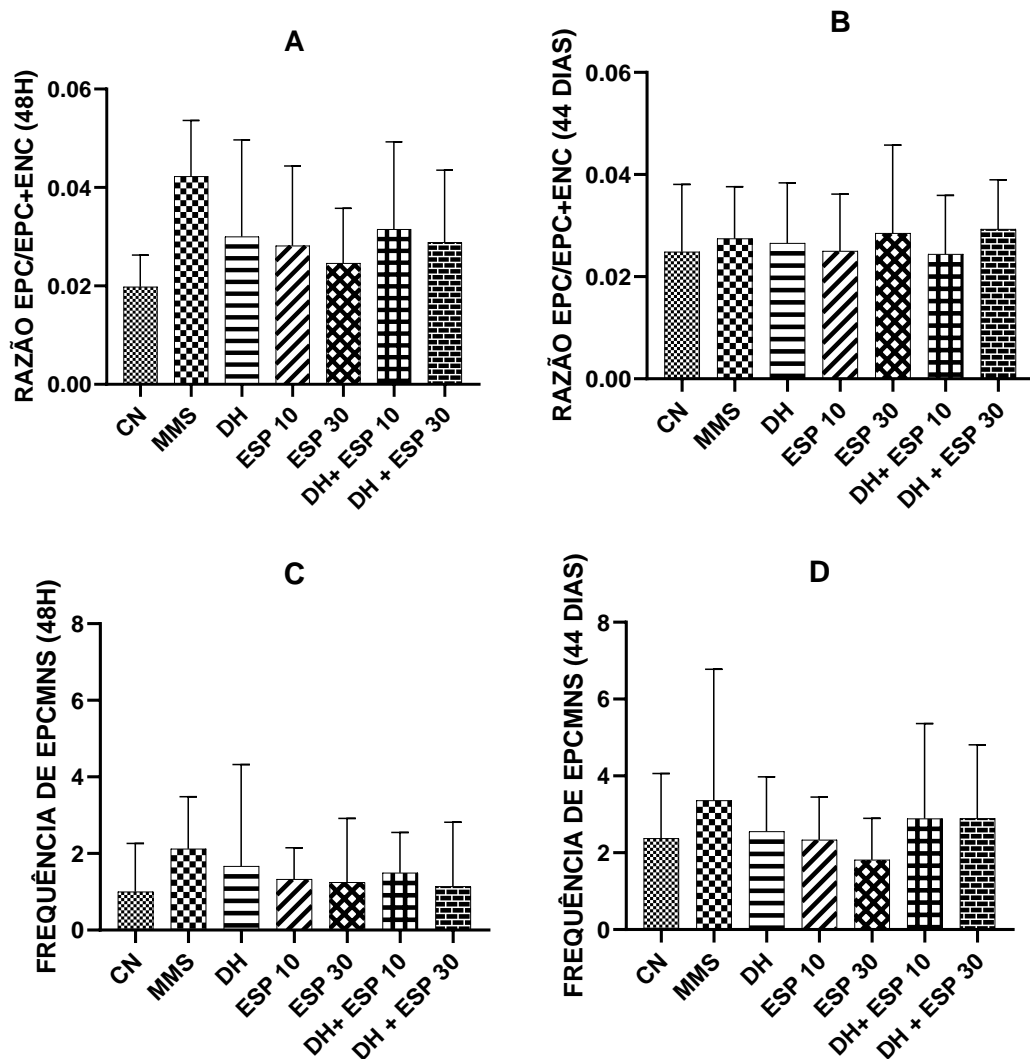
O ensaio de MNs, baseado na análise da frequência média de EPCMNs, foi realizado em células de sangue periférico de camundongos Swiss alimentados com DH e/ou suplementados com diferentes doses de ESP nos tempos 48h e 44 dias de tratamento para monitorar a mutagenicidade. A razão de EPC/EPC+ENC foi avaliada nos mesmos tempos com o intuito de monitorar a citotoxicidade proveniente dos tratamentos. Os resultados dessas avaliações estão representados na Figura 7.

Tanto no tempo de 48h, quanto no tempo de 44 dias, não foram observadas diferenças significativas em relação a razão EPC/EPC+ENC em nenhum dos grupos experimentais quando comparados ao grupo CN, indicando ausência de citotoxicidade dos tratamentos (Figuras 7 A-B). A frequência de EPCMNs, também não demonstrou diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais quando comparados ao grupo CN, indicando ausência de mutagenicidade dos tratamentos (Figuras 7 C-D).

Para avaliar o potencial antimutagênico, o ensaio de MNs também foi realizado, mas agora em células de medula óssea após 45 dias de tratamento dos camundongos Swiss alimentados com DH e/ou suplementados com diferentes concentrações de ESP. A razão EPC/EPC+ENC também foi avaliada a fim de monitorar a citotoxicidade dos tratamentos e os resultados estão expressos na Figura 8. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos quanto a razão EPC/EPC+ENC, o que indica ausência de citotoxicidade (Figura 8A). A frequência de EPCMNs na medula óssea revelou-se significativamente maior em todos os grupos de tratamento quando comparados ao CN, como esperado após a indução de danos com MMS. O grupo ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS demonstraram uma redução significativa na frequência de EPCMNs quando comparados ao grupo MMS. O grupo ESP 30 + MMS também apresentou uma redução na frequência de EPCMNs quando comparado ao grupo DH + MMS. O grupo ESP 30 + MMS apresentou uma diferença estatística significativa (menor) na frequência de EPCMNs quando comparado ao grupo ESP 10 + MMS. O grupo DH + ESP 10 + MMS apresentou uma diferença estatística significativa (maior) na frequência de EPCMNs quando comparado ao grupo ESP 30 + MMS. Já o grupo DH + ESP 30 + MMS apresentou uma menor frequência de EPCMNs quando comparado ao grupo DH + ESP 10 + MMS

(Figura 8B). Portanto os tratamentos ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS apresentaram potencial efeito genoprotetor e apesar de não apresentarem diferença estatística significativa entre eles, é possível observar que o grupo com maior potencial parece ser o tratamento com ESP 30 sem a associação com a DH.

Figura 7 – Razão EPC/EPC+ENC em 48h (A) e 44 dias (B), EPCMNs em 48h (C) e 44 dias (D) observados em células do sangue periférico de camundongos Swiss e respectivos controles.



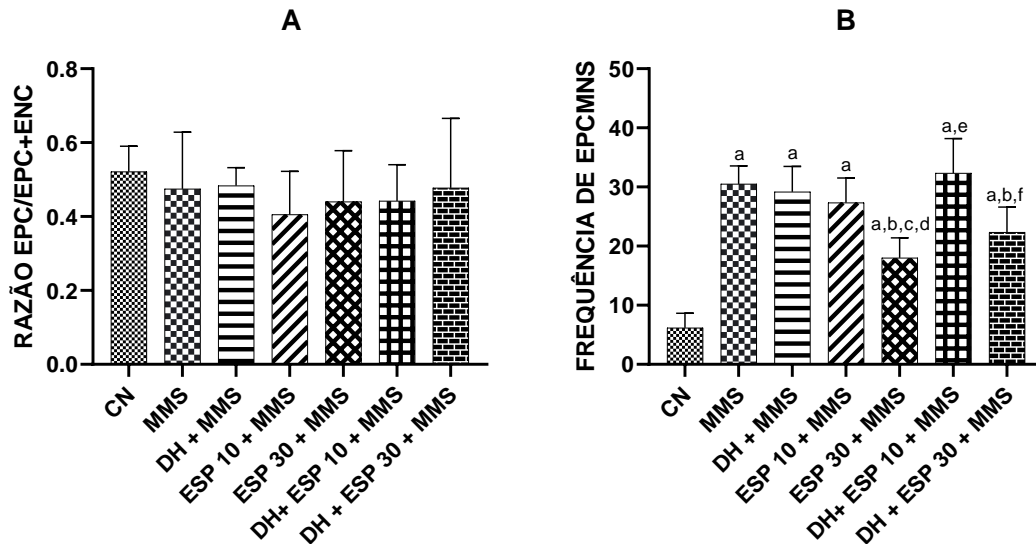
Fonte: Do autor (2024).

Nota: ENC – eritrócitos normocromáticos, EPC – eritrócitos policromáticos, EPCMNs – eritrócitos policromáticos micronucleados, CN – controle negativo, MMS – metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey, n médio = 6 animais por grupo).

O ensaio cometa, baseado na análise dos danos no DNA em células individuais foi realizado em hepatócitos a fim de confirmar o efeito protetor dos tratamentos. Os

resultados foram expressos em porcentagem de DNA na causa do cometa e estão apresentados na Figura 9.

Figura 8 – Razão EPC/EPC+ENC (A) e EPCMNs (B) observados aos 45 dias de tratamento em células de medula óssea de camundongos Swiss e respectivos controles.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: ENC – eritrócitos normocromáticos, EPC – eritrócitos policromáticos, EPCMNs – eritrócitos policromáticos micronucleados, CN – controle negativo, DH – dieta hipercalórica, MMS – Metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), ESP 10 - espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 - espermidina 30 mg/kg pc. Os valores são média ± desvio padrão. Os animais receberam os diferentes tratamentos por 45 dias e no 44º dia o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS 40 mg/kg pc) foi administrado. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey, n médio = 6 animais por grupo). <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo CN; <sup>b</sup>Significativamente diferente do grupo MMS, <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo DH + MMS; <sup>d</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 10 + MMS; <sup>e</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 30 + MMS; <sup>f</sup>Significativamente diferente do grupo DH + ESP 10 + MMS.

Todos os grupos tratados demonstraram um aumento significativo de danos no DNA quando comparados ao CN, como esperado. Os grupos DH + MMS, ESP 10 + MMS, ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS demonstraram uma redução significativa no percentual de danos quando comparado ao grupo MMS. Quando comparados ao grupo DH + MMS, os grupos ESP 10 + MMS e DH + ESP 10 + MMS apresentaram um aumento significativo no percentual de danos no DNA enquanto o grupo ESP 30 + MMS apresentou uma redução significativa. O grupo ESP 30 + MMS apresentou uma diferença estatística significativamente menor nos danos quando comparado ao grupo ESP 10 + MMS, já o grupo DH + ESP 10 + MMS apresentou danos significativamente maiores quando comparado ao mesmo grupo. Os grupos DH + ESP

10 + MMS e DH + ESP 30 + MMS apresentaram danos significativamente maiores quando comparados ao grupo ESP 30 + MMS. Por fim, o grupo DH + ESP 30 + MMS apresentou menores danos quando comparado ao grupo DH + ESP 10 + MMS.

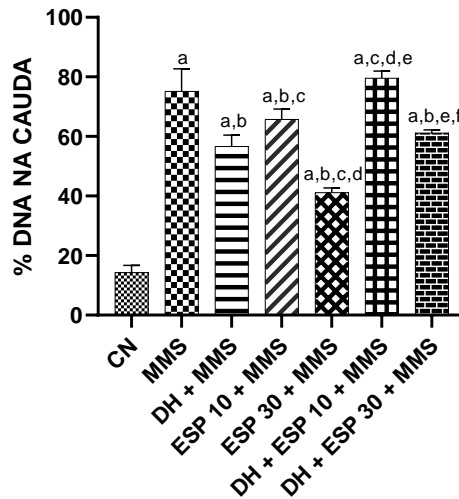
Em suma, os tratamentos utilizando espermidina na dose de 10 e 30 mg/kg pc apresentaram potencial efeito antígenotóxico sendo o tratamento com ESP na dose de 30 mg/kg pc mais efetivo. No entanto, quando associadas a DH, o efeito é totalmente perdido (DH + ESP 10 + MMS) ou parcialmente reduzido (DH + ESP 30 + MMS) (Figura 9).

A principal função da medula óssea é produzir eritrócitos, plaquetas e leucócitos, porém a taxa de produção dessas células pode variar de acordo com as necessidades do corpo. A contagem EPCs, que são eritrócitos imaturos, é utilizada para acompanhar o processo de eritropoiese através do monitoramento da resposta da medula óssea a estímulos internos ou externos e sua frequência reflete a atividade da medula. Os EPCs se desenvolvem e amadurecem na medula óssea e então circulam por cerca de 24 h na corrente sanguínea antes de se desenvolverem em eritrócitos maduros ou ENC. O processo de maturação inclui a perda do material nuclear residual e a concentração de hemoglobina dentro da célula. Os EPCs contêm RNA e podem ser diferenciados dos ENCs com técnicas de coloração (Franco-Ramos *et al.*, 2020).

A formação de EPCMN ocorre quando o núcleo é empurrado para fora, mas o material cromossômico permanece no citoplasma, indicando dano celular agudo (Franco-Ramos *et al.*, 2020). Logo, o MN é um marcador sensível de danos no DNA utilizado para pesquisas de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos de células. Os MNs, também conhecidos como corpos de Howell-Jolly, são formados durante a transição metáfase-anáfase da mitose devido à quebra cromossômica ou malformação do fuso mitótico, que é causada por mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos (Franco-Ramos *et al.*, 2020). Esses eventos ocorrem pela produção de radicais livres durante um processo de estresse oxidativo que pode acontecer em doenças crônicas como no caso do câncer. Ainda, de acordo com Franco-Ramos *et al.* (2020), o aumento na frequência de MNs é um sinal que estão ocorrendo eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica que podem ser causados por fatores endógenos ou exógenos. Dessa forma, os EPCMNs podem ser usados para rastrear danos e deduzir a influência mutagênica de um determinado agente sob o organismo.

Além disso, eles também podem ser usados para avaliar os efeitos antimutagênicos de diversos compostos bioativos que podem ser aplicados no tratamento de doenças crônicas (Franco-Ramos *et al.*, 2020), como foi o caso do presente estudo.

Figura 9 – Percentual de DNA na cauda do cometa de hepatócitos de camundongos Swiss e respectivos controles.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CN – controle negativo, MMS – Metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), DH – dieta hipercalórica, ESP 10 – espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 – espermidina 30 mg/kg pc. Os valores se referem ao percentual de danos na cauda e foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os animais receberam os diferentes tratamentos por 45 dias e no 44º dia o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS 40 mg/kg pc) foi administrado. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n$  médio = 6 animais por grupo). <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo CN; <sup>b</sup>Significativamente diferente do grupo MMS; <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo DH; <sup>d</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 10 + MMS; <sup>e</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 30 + MMS; <sup>f</sup>Significativamente diferente do grupo DH + ESP 10 + MMS.

O ensaio cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica rápida e quantitativa utilizada para medir danos no DNA em células eucarióticas individuais. Este método baseia-se na quantificação de fragmentos de DNA desnaturados que migram para fora do núcleo celular durante a eletroforese. A quantidade de DNA que se desloca da cabeça do cometa durante a eletroforese é proporcional ao nível de dano causado pelo agente mutagênico em avaliação. Esse ensaio apresenta várias vantagens em relação a outros testes de genotoxicidade, entre eles a capacidade de identificar danos no DNA ao nível de uma

única célula, a alta sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA e a necessidade de uma quantidade mínima de células por amostra. Além disso, ele é extremamente versátil, pois permite a avaliação de diversos tipos de danos no DNA e pode ser facilmente modificado para atender a diferentes requisitos experimentais (Liao; Mcnutt, Zhu, 2009).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o potencial citotóxico, mutagênico e antimutagênico *in vivo* da ESP através da razão EPC/EPC+ENC, da contagem de EPCMNs e de danos no DNA dos hepatócitos, sendo esses achados considerados inéditos. Apenas Schwarz *et al.* (2018) avaliaram a segurança e tolerabilidade da suplementação da ração com extrato rico em ESP (1,2 mg/g de extrato), em camundongos por 4 semanas correspondente à ingestão diária de 0,5, 5 ou 50 g/kg pc. No ensaio de toxicidade oral de dose repetida foi constatado que, além de ausência de perda animal, e de anormalidades visíveis *post-mortem*, também houve a ausência de degeneração, dano tecidual ou carga neoplásica significativa.

Nossos resultados nos testes de MNs e ensaio cometa demonstram efeito genoprotetor dessa poliamina na dose de 30 mg/kg pc com ou sem a utilização de DH, porém, na presença de sacarose, esse efeito parece ser ligeiramente reduzido, indicando que o equilíbrio entre os nutrientes presentes na dieta é o melhor caminho para se obter melhores resultados quimiopreventivos da ESP frente à indução de danos no DNA. Parte da perda de efeito da ESP na presença de sacarose pode ser explicada pela própria metabolização da glicose que pode gerar EROs. Durante o metabolismo da glicose nas mitocôndrias, a geração de adenosina trifosfato (ATP) é acompanhada pela produção de EROs, principalmente o ânion superóxido, que é convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação de SOD. Embora o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha funções importantes na sinalização celular, níveis elevados e sustentados de EROs podem levar ao estresse oxidativo, causando danos a proteínas, lipídios e DNA (Mukai; Fujimoto; Inagaki, 2022).

A ESP mostrou efeitos protetores em outras vertentes, como por exemplo, no estudo realizado por Wirth *et al.* (2021) onde os autores suplementaram camundongos jovens e idosos com ESP por 6 meses na dose de 3mM (110 mg/kg pc.) disponibilizada na água de beber e observaram o tecido cardíaco por análise histológica. A presença de alterações neoplásicas foi pontuada utilizando três

parâmetros para alterações das válvulas cardíacas e da aorta sendo 1 para as alterações com um leve infiltrado inflamatório, 2 para infiltrações inflamatórias medianas e 3 para infiltrações inflamatórias graves incluindo a formação de trombo. Eles constataram que a ESP não provocou lesões como calcificação ou Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e nenhum animal tratado com ESP apresentou alterações neoplásicas, enquanto 44% dos animais não suplementados desenvolveram alterações neoplásicas, mostrando o efeito protetor dessa poliamina. Jeong *et al.* (2018) comprovaram o potencial da ESP em reduzir os efeitos pró-inflamatórios e oxidativos em macrófagos e peixes-zebra estimulados por lipopolissacarídeos através da redução da produção de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico e prostaglandina E-2 e citocinas como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) em macrófagos RAW 264.7.

O acúmulo gradual de lesões no DNA pode desencadear a ativação de respostas inflamatórias que por sua vez podem ser causas de degeneração relacionada ao envelhecimento, anormalidades metabólicas e câncer, porém, a manutenção da integridade genômica e imunovigilância são processos biológicos altamente consistentes e fortemente ligados, o que não quer dizer que não possa ocorrer falhas nesses sistemas (Arvanitaki; Stratigi; Garinis, 2022). A explicação desses mecanismos, juntamente com os achados de Jeong *et al.* (2018), podem elucidar o efeito da ESP em reduzir o número de EPCMNs, pois se as lesões no DNA podem ocorrer mediadas por processos inflamatórios e o tratamento com essa poliamina atuar reduzindo esses processos, logo a redução de danos promovida pelos tratamentos utilizando ESP na dose de 30 mg/kg pc pode explicar a redução de danos desenvolvidos nesses modelos experimentais.

Corroborando com nossos achados, Gobert *et al.* (2022) ao suplementarem camundongos com ESP, concluíram que ESP pode representar uma terapia alternativa racional e rentável para colite e quimiopreventiva para carcinoma associado à colite, e potencialmente linhagens celulares de câncer colorretal em geral. Campreciós *et al.* (2021) avaliaram o possível uso de SPD como agente quimioprotetor *in vivo* para lesão hepática com níveis variados de dano endotelial. Os animais foram suplementados com ESP adicionado à água de beber a uma concentração final de 3 mM e os resultados sugerem que a suplementação de ESP protege contra lesão endotelial hepática. Coeli-Lacchini *et al.* (2023) investigaram o

papel da autofagia na carcinogênese oral utilizando o modelo de carcinoma espinocelular oral induzido pelo carcinógeno 4nitroquinolina 1-óxido (4NQO), onde o ensaio cometa indicou que a espermidina foi capaz de reduzir os danos ao DNA induzidos pelo carcinógeno, provavelmente relacionados à ativação do reparo do DNA e à diminuição de EROs.

Estudos recentes demonstram que existe uma estreita relação entre o metabolismo da poliamina e a metilação do DNA. Alterações no metabolismo da poliamina afetam as concentrações e a atividade das enzimas envolvidas na metilação do DNA (Duranton *et al.*, 1998; Fukui *et al.*, 2019; Heby; Persson; Smith, 1988; Soda, 2020; Soda, 2022; Soda *et al.*, 2013). A metilação do DNA é um dos mecanismos de regulação da expressão gênica em regiões genômicas distais ou proximais ao local de início da transcrição de um gene (Soda, 2022). Alterações globais no estado de metilação do DNA podem ser consideradas uma das principais causas de desenvolvimento neoplásico e doenças crônicas associadas à idade (Soda *et al.*, 2013). Agentes alquilantes como o agente metilante MMS podem introduzir grupos metil nos átomos de nitrogênio e oxigênio disponíveis nas bases de DNA. O dano consequente dessa alquilação inclui lesões de 3-metiladenina (m3A) e 06-metilguanina (m6G), que são, independente da sua extensão, responsáveis pelos efeitos biológicos desse agente que podem incluir quebras no DNA, formação de pontes e/ou perda cromossômica. Esses danos causados pelo MMS são processados principalmente por meio de reparo de incompatibilidade e recombinação homóloga e porém, quando não reparados, podem se expressar na forma de MNs, fazendo com que o MMS possa ser usado para induzir danos no DNA (Klungland *et al.*, 1992; Shirai *et al.*, 2013; Vale Junior *et al.*, 2022). Por outro lado, o aumento da ingestão de poliaminas, entre elas a ESP, eleva os níveis de espermina no sangue, que se liga à membrana celular, proteínas e genes por carga elétrica. Essas poliaminas (espermina e ESP) protegem as células e os genes dos estímulos prejudiciais causados por radicais livres, raios ultravioletas, radiação e agentes carcinogênicos. A ESP inibe a metilação do DNA e regula este estado, contribuindo assim com a longevidade (Soda, 2022).

Logo, o efeito quimiopreventivo demonstrado pela ESP (30 mg/kg pc) neste estudo nos permite associá-lo com a influência desta poliamina na metilação do DNA,

ou seja, a ESP pode estar protegendo o material genético dos danos subsequentes provenientes da metilação em resíduos específicos, causados pelo MMS.

Fukui *et al.* (2019) ao tratarem células Jurkat e células epiteliais mamárias humanas com espermina na concentração de 500  $\mu$ M para investigar os efeitos da diminuição da síntese de poliaminas, concluíram que a suplementação com espermina inibiu a atividade enzimática da SAMDC em ambas as células. Em células com atividade ODC diminuída, a razão SAMDC/SAM (S-adenosil-L-metionina) aumentou significativamente, por outro lado, quando a ODC está suprimida, a inibição da atividade de adenosilmethionina decarboxilase (AdoMetDC) pela suplementação de espermina diminui a razão SAMDC/SAM. A diminuição na razão SAMDC/SAM está associada a uma ativação das DNA metiltransferases (DNMT) 3a e 3b, que junto com a DNMT1 regulam a metilação do DNA na presença de SAM, que serve como um doador do grupo metil (SODA, 2018). De acordo com Soda (2020) estudos recentes mostraram que a metilação aberrante do DNA associada ao envelhecimento está intimamente relacionada à ocorrência de câncer e portanto, sua inibição ajuda a manter a atividade das DNMTs, o que pode ser possível à partir da ingestão a longo prazo de poliaminas que resultem em níveis elevados de espermina, elevando assim suas atividades biológicas.

Imre *et al.*, (2022) realizaram um estudo com células HeLa que expressam H2B-GFP, que é uma fusão entre a proteína H2B (histona 2B) e o GFP (Green Fluorescent Protein) formando uma proteína híbrida que contém o GFP ligado à histona H2B, para analisar o efeito das poliaminas em processos celulares e genéticos como a organização dos cromossomos, replicação do DNA e segregação dos cromossomos durante a divisão celular. Eles concluíram que a compactação da cromatina ocorre em concentrações específicas de poliaminas (0,2 e 0,5 mM), mas não muda acima de certas concentrações (0,8 e 1,5 mM). Em concentrações  $\geq$  5 mM, as poliaminas têm um efeito desestabilizador no nucleossomo, que é a unidade básica da cromatina. Esse efeito pode estar envolvido na regulação circadiana de processos transcricionais, incluindo a metilação do gene *PER3* (*Period Circadian Regulator*), que é dependente da enzima ODC. A alta expressão de ODC pode facilitar a remodelação da cromatina, permitindo o acesso de enzimas metilantes ao DNA em locais associados a alguns processos fisiológicos (Imre *et al.*, 2022).

#### 4.2.5 Defesa antioxidante endógena

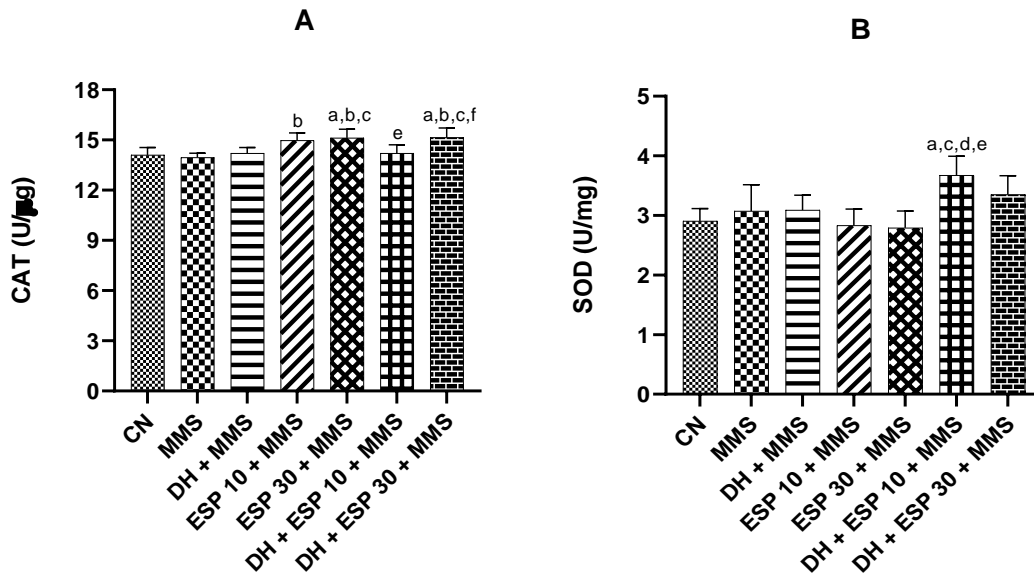
As enzimas CAT e SOD foram quantificadas em células hepáticas de camundongos Swiss alimentados com DH e/ou suplementados com ESP com a finalidade de investigar se os tratamentos possuem capacidade de modular o sistema de defesa antioxidante endógeno e os resultados estão representados na Figura 10.

A CAT revelou estar significativamente aumentada nos grupos ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS quando comparados ao CN. Nos grupos ESP 10 + MMS, ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS a quantidade de CAT presente também foi significativamente maior quando comparados ao grupo MMS. Os grupos ESP 30 + MMS e DH + ESP 30 + MMS apresentaram um aumento na quantidade de CAT quando comparado ao grupo DH + MMS. O grupo DH + ESP 10 + MMS apresentou uma redução significativa de CAT quando comparado ao grupo ESP 30 + MMS e o grupo DH + ESP 30 + MMS apresentou uma menor quantidade da enzima CAT quando comparado ao grupo DH + ESP 10 + MMS (Figura 10A). Portanto, os tratamentos utilizando espermidina na dose de 10 e 30 mg/kg pc apresentaram potencial efeito antioxidante, porém, somente a dose de 30 mg/kg pc, apresentou esse mesmo efeito quando associada à DH.

Em relação à SOD demonstramos que apenas o grupo DH + ESP 10 + MMS foi significativamente diferente dos demais grupos revelando um aumento significativo na quantidade da enzima (Figura 10B). Esses resultados demonstram que os tratamentos utilizando espermidina nas doses de 10 e 30 mg/kg pc combinadas ao MMS e 30 mg/kg pc combinada à DH + MMS não modularam a expressão da SOD como ocorreu para CAT.

Os radicais livres e moléculas reativas que ocorrem com mais frequência em sistemas biológicos são derivados de oxigênio (EROs) e nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio - ERNs) e são formados durante reações de transferência de elétrons, pela perda ou aceitação de elétrons. A formação excessiva de EROs é responsável pela interrupção da homeostase redox que, por sua vez, leva ao estresse oxidativo e danos celulares em várias biomoléculas importantes, incluindo DNA, proteínas e membranas. O estresse oxidativo, caracterizado por uma mudança de equilíbrio entre a formação e eliminação de radicais livres, é um denominador comum da patogênese das doenças crônicas e do envelhecimento (Jiang *et al.*, 2023; Jomova *et al.*, 2023).

Figura 10 – Quantificação da CAT (A) e SOD (B) em células hepáticas de camundongos Swiss e respectivos controles



Fonte: Do autor (2024).

Nota: CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, CN – controle negativo, DH – dieta hipercalórica, MMS – Metilmetanosulfonato 40 mg/kg peso corpóreo (pc), ESP 10 - espermidina 10 mg/kg pc, ESP 30 - espermidina 30 mg/kg pc. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão. Os animais receberam os diferentes tratamentos por 45 dias e no 44º dia o agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS 40 mg/kg pc) foi administrado. Referência para  $p < 0,05$  (ANOVA one-way e teste de Tukey,  $n = 6$  animais por grupo). <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo CN; <sup>b</sup>Significativamente diferente do grupo MMS, <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo DH; <sup>d</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 10 + MMS; <sup>e</sup>Significativamente diferente do grupo ESP 30 + MMS; <sup>f</sup>Significativamente diferente do grupo DH + ESP 10 + MMS.

As células possuem um sistema antioxidante complexo, formado por antioxidantes enzimáticos, como as SODs, catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPXs), tioredoxina (Trx), bem como antioxidantes de baixo peso molecular, cuja função é equilibrar o nível de estresse oxidativo. Esse complexo sistema de defesa antioxidante protege as células da toxicidade induzida por EROs (Jomova *et al.*, 2023). Dentre as enzimas endógenas, SOD e CAT estão envolvidos na regulação da função antioxidante do corpo, importantes para a eliminação de  $H_2O_2$  e inibição indireta da peroxidação lipídica e danos à membrana. A atividade dessas enzimas reflete indiretamente a capacidade antioxidante (Jiang *et al.*, 2023). Alguns compostos bioativos como a ESP, podem atuar como antioxidantes exógenos, participando de atividades de eliminação de radicais livres, reduzindo o dano oxidativo às proteínas relacionado à idade e a superprodução de EROs (Jiang *et al.*, 2023).

Nossos resultados demonstraram que os tratamentos utilizando ESP (10 e 30 mg/kg pc) aumentaram a CAT e, portanto, efeito antioxidante biológico de ESP. Quanto à SOD, ESP não foi capaz de modular a expressão dessa enzima quando comparado com MMS, porém é possível observar um efeito biológico no aumento da expressão de SOD do grupo DH + ESP 10 + MMS mesmo sem diferença estatística significativa. Jiang *et al.* (2023) investigaram o efeito antioxidante da espermidina no tecido ovariano através da expressão de enzimas como SOD e CAT. Os resultados mostraram que a espermidina aumentou significativamente as atividades das enzimas SOD e CAT (1,62 vezes maior quando comparado ao controle) do tecido ovariano dos animais.

Campreciós *et al.* (2021) ao suplementar camundongos com ESP (3 mM) constataram que o aumento da autofagia e a subsequente redução das ERO's nos hepatócitos são o principal mecanismo pelo qual ESP protege as mitocôndrias, que permanecem mais funcionais, reduzindo a produção e acumulação de ERO's, reduzindo então o estresse oxidativo no endotélio hepático.

Yan *et al.* (2019) testaram a capacidade da espermidina em aumentar o fluxo autofágico e reduzir a produção de ERO's. Os animais receberam 5 mM de ESP na água de beber durante 4 semanas e a quantificação da SOD foi realizada no tecido cardíaco e ERO's quantificados em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos. Os resultados indicaram que ESP foi capaz de elevar o conteúdo de SOD, em comparação com os níveis no grupo controle, revelando que a espermidina atenuou o estresse oxidativo miocárdico induzido. Portanto, similares a estes achados, nossos dados demonstram que ESP participa da redução do dano oxidativo através da modulação de enzimas de defesa antioxidante endógena (CAT e SOD), mas que não possui atividade direta na eliminação de radicais livres, uma vez que nos ensaios de ABTS e DPPH os resultados não podem ser considerados satisfatórios. Além disso, o efeito sob a modulação do sistema de defesa antioxidante endógeno por parte da ESP pode explicar parte dos mecanismos quimiopreventivos apresentados pelos tratamentos que em sua grande maioria, são reduzidos em dieta hipercalórica.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos achados deste estudo, concluímos que, os tratamentos com espermidina na dose 30 mg/kg pc mostraram efeito antígenotóxico significativo, embora a combinação com DH diminuísse esse efeito tendo em vista que a própria metabolização da glicose é capaz de gerar EROs, explicando, portanto, a redução da ação da ESP. Isso sugere que a espermidina possui um potencial promissor na proteção contra danos genotóxicos, com possível aplicabilidade preventiva, sendo mais efetiva quando associada à uma dieta equilibrada.

Além disso, a espermidina pode estar atuando de maneira indireta na eliminação de radicais livres e da redução do dano oxidativo e da superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da modulação da expressão de CAT. Esses mecanismos podem explicar parte do efeito quimiopreventivo da espermidina em lesões induzidas no DNA, destacando seu potencial como agente protetor contra danos oxidativos e genotóxicos.

Os tratamentos utilizando a dose de 10 mg/kg pc não foram capazes de reduzir a frequência de EPCMNs na medula óssea indicando ausência de efeito antígenotóxico, porém, ao analisarmos células hepáticas individualizadas no ensaio de cometa, essa dose, sem a presença de DH, foi suficiente para reduzir lesões no DNA. Apesar das duas técnicas serem utilizadas para avaliar genotoxicidade/antigenotoxicidade, a análise de micronúcleo detecta danos cromossômicos ou problemas na divisão celular, enquanto o ensaio cometa detecta quebras no DNA e a capacidade de reparo dessas quebras, fornecendo informações mais detalhadas sobre a extensão e o tipo de dano no DNA.

Nenhum dos tratamentos testados mostrou citotoxicidade, indicando a segurança nas doses administradas, sem alterações na eritropoiese e embora a ração padrão, a sacarose e a espermidina apresentem algum nível de atividade antioxidante *in vitro*, essa atividade é relativamente baixa quando comparada a outros compostos com efeito antioxidante.

A administração de DH resultou em redução do consumo de ração e aumento do consumo hídrico, enquanto a espermidina (ESP) não influenciou significativamente esses parâmetros. Além disso, nem DH nem ESP impactaram o consumo energético total, o peso dos animais, o peso dos órgãos, os índices glicêmicos, o PAb, o CNA e,

consequentemente, o índice de Lee, sugerindo que esses compostos não afetam significativamente esses indicadores metabólicos.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. Em: **Methods in Enzymology**. [S.l.] Elsevier, 1984. v. 105p. 121–126.
- ALAM, W. et al. Micronutrient Food Supplements in Patients with Gastro-Intestinal and Hepatic Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 22, n. 15, p. 8014, jul. 2021.
- AL-HABSI, M. et al. Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice. **Science**, [Japão], v. 378, n. 6618, p. eabj3510, 28 out. 2022.
- ALVES, P. L. et al. Anti-obesogenic and hypolipidemic effects of a glucagon-like peptide-1 receptor agonist derived from the saliva of the Gila monster. **Toxicon**, [Brasil], v. 135, p. 1–11, set. 2017.
- ANGÉLOCO, L. R. N. et al. Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets. **Revista de Nutrição**, [Brasil], v. 25, n. 3, p. 331–339, jun. 2012.
- ARVANITAKI, E. S.; STRATIGI, K.; GARINIS, G. A. DNA damage, inflammation and aging: Insights from mice. **Frontiers in Aging**, [Heraklion], v. 3, p. 973781, 7 set. 2022.
- BARBOSA, V. et al. Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds, Total Flavonoids and Hispidulin in *Baccharis erioclada* DC. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [Curitiba/PR], v. 66, p. e23220459, 2023.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, [S.l.], v. 3, n. 8–9, p. 1109–1115, ago. 2004.
- BEVEL, M. S. et al. Association of Food Deserts and Food Swamps With Obesity-Related Cancer Mortality in the US. [Augusta], **JAMA Oncology**, 4 maio 2023.
- BRAZ, M. et al. Added sugar intake by adolescents: A population-based study. **Ciência & Saúde Coletiva**, [Campinas/SP], v. 24, n. 9, p. 3237–3246, set. 2019.
- CAMPRECIÓS, G. et al. Spermidine Supplementation Protects the Liver Endothelium from Liver Damage in Mice. **Nutrients**, [Spain], v. 13, n. 11, p. 3700, 21 out. 2021.
- CAS COMMON CHEMISTRY. **Spermidine**. American Chemical Society, [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <[https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=124-20-9](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=124-20-9)>. Acesso em: 17 jul. 2024
- CHITTASUPHO, C. et al. Effects of Quercetin and Curcumin Combination on Antibacterial, Antioxidant, In Vitro Wound Healing and Migration of Human Dermal Fibroblast Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [Thailand], v. 23, n. 1, p. 142, 23 dez. 2021.

COELI-LACCHINI, F. B. et al. Spermidine Suppresses Oral Carcinogenesis through Autophagy Induction, DNA Damage Repair, and Oxidative Stress Reduction. **The American Journal of Pathology**, [Brasil], v. 193, n. 12, p. 2172–2181, dez. 2023.

CRUZ, E. M. S. et al. Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in wistar rats. **Biology Open**, [Brasil], v. 9, n. 3, jan. 2020.

DAMASCENO, J. L. et al. Protective effects of Solanum cernuum extract against chromosomal and genomic damage induced by methyl methanesulfonate in Swiss mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [Brasil], v. 83, p. 1111–1115, out. 2016.

DE PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. **Journal of Obesity**, [Bari], v. 2013, p. 1–11, 2013.

DUBLJEVIĆ, O. et al. The Influence of Unlimited Sucrose Intake on Body Weight and Behavior—Findings from a Mouse Model. **Brain Sciences**, [Belgrado], v. 12, n. 10, p. 1332, 30 set. 2022.

DURANTON, B. et al. Concomitant Changes in Polyamine Pools and DNA Methylation during Growth Inhibition of Human Colonic Cancer Cells. **Experimental Cell Research**, [Estrasburgo], v. 243, n. 2, p. 319–325, set. 1998.

EISENBERG, T. et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. **Nature Medicine**, [S.I.], v. 22, n. 12, p. 1428–1438, dez. 2016.

FAN, J.; FENG, Z.; CHEN, N. Spermidine as a target for cancer therapy. **Pharmacological Research**, [Wuhan], v. 159, p. 104943, set. 2020.

FERNÁNDEZ, Á. F. et al. Autophagy counteracts weight gain, lipotoxicity and pancreatic  $\beta$ -cell death upon hypercaloric pro-diabetic regimens. **Cell Death & Disease**, [S.I.], v. 8, n. 8, p. e2970, ago. 2017.

FILFAN, M. et al. Long-term treatment with spermidine increases health span of middle-aged Sprague-Dawley male rats. **GeroScience**, [S.I.], v. 42, n. 3, p. 937–949, jun. 2020.

FRANCO-RAMOS, R. S. et al. Evaluation of Anti-Cytotoxic and Anti-Genotoxic Effects of Nigella sativa through a Micronucleus Test in BALB/c Mice. **Nutrients**, [México], v. 12, n. 5, p. 1317, 6 maio 2020.

FUKUI, T. et al. Extracellular Spermine Activates DNA Methyltransferase 3A and 3B. **International Journal of Molecular Sciences**, [Saitama], v. 20, n. 5, p. 1254, 12 mar. 2019.

FURTADO, R. A. et al. Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six Copaifera species for prediction of potential human risks. **Journal of Ethnopharmacology**, [Brasil], v. 221, p. 119–125, jul. 2018.

- GANESAN, K.; DU, B.; CHEN, J. Effects and mechanisms of dietary bioactive compounds on breast cancer prevention. **Pharmacological Research**, [China], v. 178, p. 105974, abr. 2022.
- GARCIA, A. et al. Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode and Potentiate Sucrose's Palatability. **Frontiers in Neuroscience**, [Cidade do México], v. 14, p. 608047, 21 jan. 2021.
- GINSBURG, H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease. **Journal of Clinical Investigation**, [Nova York], v. 106, n. 4, p. 453–458, 15 ago. 2000.
- GOBERT, A. P. et al. Protective Role of Spermidine in Colitis and Colon Carcinogenesis. **Gastroenterology**, [Nashville/Tennessee] v. 162, n. 3, p. 813–827, mar. 2022.
- HA, H.; LEE, H. B. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. **Kidney International**, [Seul], v. 58, p. S19–S25, set. 2000.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [Lausanne], v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.
- HANDA, A. K.; FATIMA, T.; MATTOO, A. K. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. **Frontiers in Chemistry**, [United States], v. 6, fev. 2018.
- HARTMANN, A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, [Basel], v. 18, n. 1, p. 45–51, jan. 2003.
- HAYWARD, M. et al. Differential involvement of endogenous opioids in sucrose consumption and food reinforcement. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [USA], v. 85, n. 3, p. 601–611, nov. 2006.
- HEBY, O.; PERSSON, L.; SMITH, S. S. Polyamines, DNA Methylation and Cell Differentiation. Em: ZAPPIA, V.; PEGG, A. E. (Eds.). **Progress in Polyamine Research**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US, 1988. v. 250p. 291–299.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [Durham], v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.
- IMRE, L. et al. Nucleosome destabilization by polyamines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 722, p. 109184, jun. 2022.
- INCA. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2022.

JEONG, J.-W. et al. Spermidine Protects against Oxidative Stress in Inflammation Models Using Macrophages and Zebrafish. **Biomolecules & Therapeutics**, [Republic of Korea], v. 26, n. 2, p. 146–156, 1 mar. 2018.

JIANG, D. et al. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in the mouse hypothalamus. **Open Life Sciences**, [China], v. 16, n. 1, p. 39–45, jan. 2021.

JIANG, D. et al. Exploration of the Antioxidant Effect of Spermidine on the Ovary and Screening and Identification of Differentially Expressed Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, [China], v. 24, n. 6, p. 5793, 17 mar. 2023.

JIANG, D.-M. et al. Effects of Spermidine on Mouse Gut Morphology, Metabolites, and Microbial Diversity. **Nutrients**, [China], v. 15, n. 3, p. 744, 1 fev. 2023.

JOMOVA, K. et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, [S.I.], v. 97, n. 10, p. 2499–2574, out. 2023.

KLUNGLAND, A. et al. Expression of the E.coli 3-methyladenine DNA glycosylase I gene in mammalian cells reduces the toxic and mutagenic effects of methylating agents. **The EMBO Journal**, [Blindern], v. 11, n. 12, p. 4439–4444, dez. 1992.

KORGAN, A. C. et al. High sucrose consumption decouples intrinsic and synaptic excitability of AgRP neurons without altering body weight. **International Journal of Obesity**, [S.I.], 1 fev. 2023.

KOSAKOWSKA, O. et al. Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). **Molecules**, [Warsaw], v. 26, n. 4, p. 988, 13 fev. 2021.

KUO, C.-T. et al. Sex differences in the association between sugar-sweetened beverages consumption and metabolic risks among the working-age population in Taiwan. **Public Health Nutrition**, [Taiwan], v. 26, n. 3, p. 1–19, jul. 2022.

LEITÃO, C. et al. The Effect of Nutrition on Aging—A Systematic Review Focusing on Aging-Related Biomarkers. **Nutrients**, [S.I.], v. 14, n. 3, p. 554, jan. 2022.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, [Pequim], v. 48, n. 1, p. 46–53, maio 2009.

LING, J. et al. Continuous Glucose Monitoring Metrics in the Assessment of Glycemia in Moderate-to-Advanced CKD in Diabetes. **Kidney International Reports**, [Hong Kong], v. 7, n. 6, p. 1354–1363, jun. 2022.

MA, L. et al. Spermidine ameliorates high-fat diet-induced hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in preexisting obese mice. **Life Sciences**, [Hangzhou], v. 265, p. 118739, jan. 2021.

MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, [S./], v. 2, n. 4, p. 509–514, 1980.

MALAFAIA, A. B. et al. Indução de obesidade com sacarose em ratos. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 26, n. suppl 1, p. 17–21, 2013.

MARGRAF, T.; GRANATO, DANIEL. Padronização das metodologias ABTS, DPPH, e FRAP para determinação da capacidade antioxidante in vitro utilizando microvolumes. Em: **Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas – Uma abordagem teórico-prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 538.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, [Umeå], v. 47, n. 3, p. 469–474, set. 1974.

MARTEMUCCI, G. et al. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. **Oxygen**, [Itália], v. 2, n. 2, p. 48–78, 12 abr. 2022.

MINOIS, N. Molecular Basis of the ‘Anti-Aging’ Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines - A Mini-Review. **Gerontology**, [St. Andrews], v. 60, n. 4, p. 319–326, 2014.

MORAIS, J. M. B. DE et al. Pterostilbene influences glycemia and lipidemia and enhances antioxidant status in the liver of rats that consumed sucrose solution. **Life Sciences**, [S./], v. 269, p. 119048, mar. 2021.

MUKAI, E.; FUJIMOTO, S.; INAGAKI, N. Role of Reactive Oxygen Species in Glucose Metabolism Disorder in Diabetic Pancreatic  $\beta$ -Cells. **Biomolecules**, [Japão], v. 12, n. 9, p. 1228, 2 set. 2022.

NOWAK, D. et al. Averrhoa carambola L., Cyphomandra betacea, Myrciaria dubia as a Source of Bioactive Compounds of Antioxidant Properties. **Foods**, [Polônia], v. 12, n. 4, p. 753, 9 fev. 2023.

OECD. **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. [S./] OECD, 2016.

OLIVA, M. E. et al. Salvia hispanica L. (chia) seed promotes body fat depletion and modulates adipocyte lipid handling in sucrose-rich diet-fed rats. **Food Research International**, [Argentina], v. 139, p. 109842, jan. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Ingestão de açúcares para adultos e crianças**. Genebra, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Prevenção do câncer**. [S./], 24 maio 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_2)>. Acesso em: 16 jul. 2024

- PANKOKE, S. et al. Oral Supplementation with the Polyamine Spermidine Affects Hepatic but Not Pulmonary Lipid Metabolism in Lean but Not Obese Mice. **Nutrients**, [Hannover], v. 14, n. 20, p. 4318, 15 out. 2022.
- PES, G. M. et al. Evolution of the Dietary Patterns across Nutrition Transition in the Sardinian Longevity Blue Zone and Association with Health Indicators in the Oldest Old. **Nutrients**, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 1495, 28 abr. 2021.
- PIETROCOLA, F. et al. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. **Cancer Cell**, [S.I.], v. 30, n. 1, p. 147–160, jul. 2016.
- PIETROCOLA, F. et al. Spermidine reduces cancer-related mortality in humans. **Autophagy**, [S.I.], v. 15, n. 2, p. 362–365, 1 fev. 2019.
- PINHEIRO, F. DE A. et al. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. **Food Chemistry**, [Brasil], v. 336, p. 127701, jan. 2021.
- PROUST, MARCEL. **À la recherche du temps perdu**. Paris: Gallimard: [s.n.].
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, [Londres], v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, [Houston], v. 49, n. 11, p. 1603–1616, dez. 2010.
- ROSS, R. et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.I.], v. 16, n. 3, p. 177–189, mar. 2020.
- SANTI-RAMPAZZO, A. P. D. et al. Aqueous Extract of *Agaricus blazei* Murrill Prevents Age-Related Changes in the Myenteric Plexus of the Jejunum in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [Paraná], v. 2015, p. 1–13, 2015.
- SCHIPKE, J. et al. Spermidine and Voluntary Activity Exert Differential Effects on Sucrose- Compared with Fat-Induced Systemic Changes in Male Mice. **The Journal of Nutrition**, [Alemanha], v. 149, n. 3, p. 451–462, mar. 2019.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, [S.I.], v. 31, n. 1, p. 9–15, fev. 1975.
- SCHWARZ, C. et al. Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. **Ageing**, [S.I.], v. 10, n. 1, p. 19–33, 8 jan. 2018.

SHIRAI, H. et al. PARG dysfunction enhances DNA double strand break formation in S-phase after alkylation DNA damage and augments different cell death pathways. **Cell Death & Disease**, [Tóquio], v. 4, n. 6, p. e656–e656, 6 jun. 2013.

SODA, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [Saitama], v. 30, n. 1, p. 95, dez. 2011.

SODA, K. et al. Increased Polyamine Intake Inhibits Age-Associated Alteration in Global DNA Methylation and 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Tumorigenesis. **PLoS ONE**, [Saitama], v. 8, n. 5, p. e64357, 16 maio 2013.

SODA, K. Polyamine Metabolism and Gene Methylation in Conjunction with One-Carbon Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, [Saitama], v. 19, n. 10, p. 3106, 10 out. 2018.

SODA, K. Spermine and gene methylation: a mechanism of lifespan extension induced by polyamine-rich diet. **Amino Acids**, [Saitama], v. 52, n. 2, p. 213–224, fev. 2020.

SODA, K. Overview of Polyamines as Nutrients for Human Healthy Long Life and Effect of Increased Polyamine Intake on DNA Methylation. **Cells**, [Saitama], v. 11, n. 1, p. 164, 4 jan. 2022.

STEFANO, D. T. et al. Oxidative Stress and Deregulated DNA Damage Response Network in Lung Cancer Patients. **Biomedicines**, [Atenas], v. 10, n. 6, p. 1248, 26 maio 2022.

SUBRAMANIAM, S.; SELVADURAY, K. R.; RADHAKRISHNAN, A. K. Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer? **Biomolecules**, [Malásia], v. 9, n. 12, p. 758, 21 nov. 2019.

SZYDLOWSKA, M. et al. Restoring polyamine levels by supplementation of spermidine modulates hepatic immune landscape in murine model of NASH. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [Gaithersburg], v. 1869, n. 6, p. 166697, ago. 2023.

TAPANEE, P. et al. Sugar, non-nutritive sweetener intake and obesity risk in college students. **Journal of American College Health**, [S.I.], p. 1–6, 1 set. 2021.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [Carolina do Norte], v. 35, n. 3, p. 206–221, 6 jun. 2000.

VALE JUNIOR, E. P. D. et al. Protective effect of kavain in meristematic cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [Teresina], v. 94, n. 2, p. e20200520, 2022.

WANG, H.; CALVISI, D. F.; CHEN, X. Organoids for the Study of Liver Cancer. **Seminars in Liver Disease**, [S.I.], v. 41, n. 01, p. 19–27, jan. 2021.

- WANG, Z. et al. The influence of in vitro gastrointestinal digestion on the *Perilla frutescens* leaf extract: Changes in the active compounds and bioactivities. **Journal of Food Biochemistry**, [China], v. 44, n. 12, dez. 2020.
- WANG, Z. et al. Perilla frutescens Leaf Extract and Fractions: Polyphenol Composition, Antioxidant, Enzymes ( $\alpha$ -Glucosidase, Acetylcholinesterase, and Tyrosinase) Inhibitory, Anticancer, and Antidiabetic Activities. **Foods**, [S.I.], v. 10, n. 2, p. 315, 3 fev. 2021.
- WICKRAMASINGHE, K. et al. From lifespan to healthspan: the role of nutrition in healthy ageing. **Journal of Nutritional Science**, [S.I.], v. 9, p. e33, 2020.
- WIRTH, A. et al. Novel aspects of age-protection by spermidine supplementation are associated with preserved telomere length. **GeroScience**, [S.I.], v. 43, n. 2, p. 673–690, abr. 2021.
- WU, S.; ZHANG, Y.; DE LUCA, F. The effect of a high-calorie diet on bone growth is mediated by the insulin receptor. **Bone**, [S.I.], v. 122, p. 166–175, maio 2019.
- WU, X. et al. Impact of dietary sucralose and sucrose-sweetened water intake on lipid and glucose metabolism in male mice. **European Journal of Nutrition**, [Jiangsu], v. 62, n. 1, p. 199–211, fev. 2023.
- XIE, C. et al. Investigation into the Relationship between Spermidine Degradation and Phenolic Compounds Biosynthesis in Barley Seedlings under Ultraviolet B Stress. **Plants**, [China], v. 12, n. 20, p. 3533, 11 out. 2023.
- XIE, Q. et al. Effect of eating habits on obesity in adolescents: a study among Chinese college students. **Journal of International Medical Research**, [China], v. 48, n. 3, p. 030006051988973, mar. 2020.
- YAN, J. et al. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway. **British Journal of Pharmacology**, [China], v. 176, n. 17, p. 3126–3142, set. 2019.
- YAN, R. et al. Effect of lifelong sucrose consumption at human-relevant levels on food intake and body composition of C57BL/6N mice. **Frontiers in Nutrition**, [Hong Kong], v. 9, p. 1076073, 15 dez. 2022.
- YU, R. et al. Fructo-oligosaccharides lower serum lipid levels and suppress high-fat/high-sugar diet-induced inflammation by elevating serum and gut levels of short-chain fatty acids. **Journal of International Medical Research**, [Nanquim], v. 48, n. 4, p. 030006051989671, abr. 2020.
- YUE, F. et al. Spermidine Prolongs Lifespan and Prevents Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma by Activating MAP1S-Mediated Autophagy. **Cancer Research**, [S.I.], v. 77, n. 11, p. 2938–2951, 1 jun. 2017.

YUN, H. et al. The Chemerin-CMKLR1 Axis is Functionally important for Central Regulation of Energy Homeostasis. **Frontiers in Physiology**, [S.I.], v. 13, p. 897105, 30 maio 2022.

ZHANG, L. et al. Identification of cardiovascular health gene variants related to longevity in a Chinese population. **Aging**, [P.R. China], v. 12, n. 17, p. 16775–16802, 7 set. 2020.

## ANEXO I

### Anexo I. Composição nutricional da ração comercial Nuvilab®

NOME COMERCIAL:	Nuvilab CR1- Irradiada
EMPRESA:	Quimtia S.A

COMPOSIÇÃO: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

VALOR ENERGÉTICO:	336 kcal/100g de produto
PROTEÍNA BRUTA (MÍN):	22 g/100g de produto
LIPÍDEOS (MÍN):	4 g/100g de produto
FIBRA BRUTA (MÁX):	7 g/100g de produto
CÁLCIO (MÍN-MÁX):	1-1,4 g/100g de produto
FÓSFORO (MÍN):	600 mg/100g de produto

Fonte: Adaptado de Quimtia S.A.

## ANEXO II

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **DIETA HIPERCALÓRICA SUPLEMENTADA COM ESPERMIDINA: ESTUDO DOS EFEITOS SOBRE LESÕES INDUZIDAS NO DNA**, registrada com o nº **0040/2022**, sob a responsabilidade de **Pollyanna Francieli de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **05/12/2022 a 20/12/2025**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / Swiss	80	80	0	Centro de bioterismo - biotério central

Alfenas, 05 de julho de 2023

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**  
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://biotemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidade/certificados/> e digite a chave: 5c4013211f0efb080e0c4a360f37