



KAMILA LAUANY LUCAS LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE 2 PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO
DO DM2 E AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO
MODERADO SOBRE A LIPOTOXICIDADE E OS
EICOSANÓIDES**

JATAÍ – GO

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES
ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA
UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

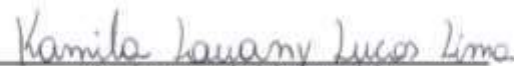
Nome completo do autor: Kamila Lauany Lucas Lima

Título do trabalho: COMPARAÇÃO ENTRE 2 PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DO DM2 E AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE A LIPOTOXICIDADE E OS EICOSANÓIDES

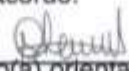
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 14 / 11 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

KAMILA LAUANY LUCAS LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE 2 PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DO DM2 E
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE A
LIPOTOXICIDADE E OS EICOSANÓIDES**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida Benite Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Silva de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Biociência
Animal.

JATAÍ – GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lucas Lima, Kamila Lauany

Comparação entre 2 protocolos para indução do DM2 e avaliação do efeito do exercício físico moderado sobre a lipotoxicidade e os eicosanóides [manuscrito] / Kamila Lauany Lucas Lima. - 2018. LXXII, 72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sandra Aparecida Benite Ribeiro; co orientador Dr. Denise Silva de Oliveira .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Dislipidemia. 3. 14,15 EET/DHET. 4. 20 HETE. 5. Modelo experimental animal. I. Benite Ribeiro, Sandra Aparecida, orient. II. Título.

CDU 612



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Ao vinte e seis dias do mês de outubro de 2018, às 10:00 horas, no prédio da Pós-graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da candidata **KAMILA LAUANY LUCAS LIMA** com o trabalho intitulado **"COMPARAÇÃO ENTRE 2 PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DO DM2 E AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE A LIPOTOXICIDADE E OS EICOSANÓIDES"**. A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Prof.^a Dr.^a Sandra Aparecida Benite Ribeiro (Orientadora), Prof.^a Dr.^a Patrícia Leão da Silva Agostinho (Membro Externo), Prof. Dr. Daniel Bartoli de Sousa (Membro Externo), considerou a candidata Kamila Lauany Lucas Lima: **APROVADA (X) REPROVADA ()**. Foi concedido um prazo de 30 dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.

Prof.^a Dr.^a Sandra Aparecida Benite Ribeiro
Orientador/Presidente

Prof.^a Dr.^a Patrícia Leão da Silva Agostinho
Membro Externo

Prof. Dr. Daniel Bartoli de Sousa
Membro Externo

Prof. Dr.^a Denise Silva de Oliveira
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por me guiar e proteger em todos os momentos.

A meus pais, irmãos e familiares que sempre me apoiaram e serviram de base nessa caminhada.

A minha orientadora Dra. Sandra Aparecida Benite, por acreditar em mim, pela dedicação, ensinamentos, amizade e orientação. Estendo minha gratidão a minha co-orientadora Dra. Denise Silva de Oliveira e pesquisadora Dra. Júlia Matzenbacher dos Santos, pelo apoio, ensinamentos e contribuições para esta pesquisa.

À toda equipe do Laboratório de Morfosiologia, a técnica Ms. Lília Cristina de Souza Barbosa, aos professores Dr. Didier Quevedo Cagnini, Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita e Dr. Daniel Bartoli de Sousa que se dispuseram em me ajudar na preparação e análise histológica.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pelo carinho e pelas palavras de apoio e incentivo nessa caminhada.

A Universidade Federal de Jataí e aos animais que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Em resumo, gratidão a todos os envolvidos e que de alguma forma colaboraram na condução desse projeto.

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram investigar as seguintes hipóteses: 1) a dieta hiperlipídica pode induzir o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) sem a administração de streptozotocina (STZ); a ingestão de dieta hiperlipídica e hipercalórica causam alterações metabólicas, comportamentais e morfológicas, similares ao DM2 e; 3) a prática de exercício físico moderado tem potencial sobre as alterações metabólicas causadas pelo DM2 e pela dieta hiperlipídica. Para testarmos essas hipóteses foram utilizados 57 ratos Wistar com 8 semanas de idade, distribuídos nos seguintes grupos experimentais: grupo D (N=25) que receberam uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ diluído em tampão de citrato, pH 4,5 - 25mg/kg de peso corporal do animal) e foram alimentados com dieta hiperlipídica. Para testar o efeito somente da dieta hiperlipídica, o grupo HL (N=8), recebeu uma dieta hiperlipídica, mas não recebeu a injeção de STZ. Animais com idades similares foram utilizados como controle (CO, N=24) e alimentados com dieta balanceada. No final da terceira semana, animais dos grupos CO e D e HL foram subdivididos em dois grupos: sedentário (SE) e exercitado (EF). Os grupos EF foram submetidos a um protocolo de natação durante 6 semanas. Após o protocolo experimental, os grupos D-SE, D-EF e HL-SE apresentaram alterações significativas no ganho de massa, gordura abdominal, ingestão calórica, eficiência alimentar, perfil lipídico e glicemia em jejum e capilar quando comparados aos animais controles. Não houve diferença significativa nas concentrações dos produtos do ácido araquidônico e o tecido renal não apresentou alterações morfológicas. O exercício físico aumentou as lipoproteínas de alta densidade (HDL), mas não alterou os demais parâmetros avaliados. Concluímos que o consumo da dieta hiperlipídica quando associada ao comportamento sedentário pode causar alterações metabólicas similares ao DM2 e que o exercício físico foi eficiente para melhorar o perfil lipídico.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, 14,15 EET/DHET, 20 HETE, modelo experimental animal.

ABSTRACT

The present study aimed to test whether: 1) the high fat diet can induce T2D without the administration of streptozotocin (STZ); 2) the high fat caloric intake causes metabolic, behavioral and morphological changes, similar to t2D and; 3) the practice of moderate physical exercise is effective to reverse the metabolic changes caused by T2D and of the high fat diet. To test these hypotheses, we used 57 Wistar 8 week old rats. They were split into the five experimental groups: group D (N = 25) who received a single intraperitoneal dose of streptozotocin (STZ diluted in citrate buffer, pH 4.5-25mg / kg body weight of the animal) and were fed with high fat diet. To test the effect only of the high fat diet, the HL group (N = 8) was fed with high fat diet but did not receive the STZ injection. Animals with similar ages were used as control (CO, N = 24) and fed with a balanced diet. At the end of the third week, animals of CO and D and HL groups were subdivided into two other groups: sedentary (SE) and exercised (EF). EF groups were submitted to swimming for 6 weeks. The D-SE, D-EF and HL-SE groups presented significant changes in body weight gain, abdominal fat gain, caloric intake, food efficiency, lipid profile and fasting and capillary glucose levels, when compared to control groups. There was no significant difference in the concentrations of arachidonic acid products and the renal tissue did not present morphological alterations. Physical exercise increased high density lipoproteins (HDL), but did not change others evaluated parameters. We conclude that consumption of the high fat diet when associated with sedentary behavior may cause metabolic alterations similar to T2D and that physical exercise was efficient to improve the lipid profile.

Keywords: Type 2 Diabetes mellitus, dyslipidemia, 14,15 EET/DHET, 20 HETE, experimental animal model.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO	12
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Protocolos Experimentais – Indução ao DM2.....	20
4.3. Ganho de massa corporal, ingestão calórica e a eficiência alimentar	25
4.4. Coleta de sangue e de tecidos	25
4.5. Análises bioquímicas.....	25
4.5.1. Glicose e perfil lipídico.....	25
4.5.2. Níveis plasmáticos de 20-HETE.....	26
4.5.3. Níveis plasmáticos de 14,15 DHET	27
4.5.4. Níveis plasmáticos de 14,15 EET.....	28
4.6. Preparação do tecido renal para análise histológica	28
4.7. Análise Estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.2. Ganho de Massa Corporal e de Gordura Abdominal	31
5.3. Perfil lipídico e Glicemia	35
5.4. Ingestão Calórica e Eficiência Alimentar	40
5.5. Níveis Plasmáticos de 20-HETE e 14,15 EET/DHET	44
5.6. O Efeito do protocolo de indução ao DM2 sobre o tecido renal	46
5.7. Correlações	47
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinalização da insulina.....	15
Figura 2 – Acúmulo de lipídeos ectópicos - lipotoxicidade	16
Figura 3 – Via metabólica do ácido araquidônico e seus derivados.....	17
Figura 4 – Desenho experimental da divisão dos animais nos grupos	22
Figura 5 – Desenho experimental	24
Figura 6 – Massa corporal durante o experimento	30
Figura 7 – Efeito do protocolo experimental no ganho de massa corporal.....	32
Figura 8 – Efeito do protocolo experimento na gordura abdominal	34
Figura 9 – Perfil lipídico dos grupos	36
Figura 10 – Glicemia em Jejum.....	37
Figura 11 – Glicemia capilar mensurada antes e após a administração de estreptozotocina (STZ) e no início do exercício físico.....	39
Figura 12 – Níveis plasmáticos dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico.....	45
Figura 13 – Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos.	46
Figura 14 – Resistência à insulina - lipotoxicidade	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) da ingestão calórica de ratos Wistar divididos nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica-sedentário..... 41

Tabela 2 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) da eficiência alimentar de ratos Wistar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário..... 43

Tabela 3 – Associações entre as variáveis investigadas. Gordura abdominal (GA), glicemia em jejum, níveis plasmáticos de triglicérides livres (TGL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL), ingestão calórica total (ICT), ganho de massa corporal (GM), eficiência alimentar total (EAT) e glicemia capilar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário..... 48

Tabela 4 – Associações entre as variáveis investigadas. Triglicérides livres (TGL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL, glicemia em jejum e glicemia capilar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica-sedentário..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Célsius
g	Gramas
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
ng	Nanograma
rpm	Rotações por minuto
µL	Microlitro
14,15 DHET	Ácido 14,15-dihidroxeicosatrienóicos
14,15 EET	Ácidos 14,15-epoxieicosatrienóicos
20-HETE	Ácido 20-hidroxeicosatetraenóicos
AA	Ácidos araquidônico
AMPK	Proteína- cinase ativada por adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AGL	Ácidos graxos
CaMK	Calmodulina-cinase dependente de cálcio
CO	Grupo controle
CO-EF	Grupo controle - exercício físico
CO-SE	Grupo controle - sedentário
cPLA ₂	Enzima fosfolipase A ₂ citosólica
CYP	Via Citocromo P450
CYP- epoxigenase	Enzima citocromo P450 epoxigenase
CYP- hidroxilase	Enzima citocromo P450 hidroxilase
DAG	Diacilglicerol
DAGT	Enzima diacilglicerol aciltransferase
D- EF	Grupo dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico
DHET	Ácidos dihidroxeicosatrienóicos
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
D- SE	Grupo dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário
EAT	Eficiência Alimentar Total

EF	Exercício Físico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EET	Ácidos epoxieicosatrienóicos
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FOXO1	Proteína forkhead box O1
GA	Gordura abdominal
GLUT4	Transportador de glicose isoforma 4
GM	Ganho de massa corporal
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HL-SE	Grupo dieta hiperlipídica – sedentário
ICT	Ingestão Calórica Total
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
PDK	Enzima Fosfoinositídeos
PEPCK	Enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase
PI3-K	Enzima fosfatidil-inositol- 3-cinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol- 4,5-bisfosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB ou Akt	Enzima Proteína-cinase B
sEH	Enzima Epóxido hidrolase solúvel
SE	Sedentário
STZ	Estreptozotocina
TGL	Triacilglicerol
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, no ano de 2017 cerca de 425 milhões de adultos no mundo eram portadores de diabetes mellitus (DM), sendo que a estimativa é de crescimento para 692 milhões de pessoas com a doença em 2045. No Brasil estima-se que 23,3 milhões de pessoas apresentem esta patologia crônica até o ano de 2040 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença caracterizada pela ineficácia na ação da insulina nos tecidos alvos ou na incapacidade das células beta pancreáticas em secretar esse hormônio, causando hiperglicemia crônica de jejum, com valor glicêmico maior ou igual a 126 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). O DM pode ser classificado conforme sua etiologia e dividido em três grandes classes clínicas: DM gestacional, DM tipo 1 e DM tipo 2 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017).

O DM tipo 1 (DM1), que ocorre em 5 a 10% dos pacientes com a doença, é decorrente da destruição das células beta pancreáticas, que pode ser de origem idiopática ou autoimune, levando à deficiência na produção da insulina. Comumente diagnosticada em crianças e adolescentes, e hoje em dia tem sido diagnosticada também em adultos (AHLQVIST et al., 2018). O motivo da manifestação do DM1 ainda não são completamente compreendidos, sendo decorrente de origem genética ou fatores ambientais tais como infecção viral, entre outros (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

O DM tipo 2 (DM2) caracteriza-se pela resistência periférica ou ineficácia da ação da insulina nos tecidos alvos. Representa cerca de 90% a 95% dos casos, acometendo, geralmente, indivíduos com sobrepeso, obesidade, idade avançada e com antecedência familiar da doença. Além dos valores elevados da glicemia, sinais clínicos como alterações no metabolismo lipídico, polidipsia, poliúria, fadiga, cicatrização lenta de feridas, infecções, formigamento ou dormência de mãos e pés são indícios e sintomas para o diagnóstico do DM2 (AHLQVIST et al., 2018; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017).

A importância dessa doença crônica não transmissível é bem reconhecida, não só por sua alta prevalência nas sociedades atuais, como também pelas

complicações secundárias, tais como: doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia, e retinopatia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017; PASQUALOTTO; ALBERTON; FRIGERI, 2012). No Brasil o tratamento desses pacientes custa milhões ao cofre público e suas complicações representam a maior parcela das causas de óbitos e de gastos com a saúde (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2017; PASQUALOTTO; ALBERTON; FRIGERI, 2012; QUARTI MACHADO ROSA et al., 2018).

Os principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento do DM2 são o sedentarismo, a ingestão de dieta hipercalórica, o sobrepeso, a obesidade e o tabagismo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Dadas as preocupações sobre os fatores de risco do DM2, tem sido bem estabelecido na literatura científica que a manutenção da massa corporal dentro dos limites de normalidade depende do equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (EVERT et al., 2014; LICHTMAN et al., 1992).

Nas populações ocidentais, de países desenvolvidos e em desenvolvimento, o aumento da ingestão de alimentos industrializados, extremamente calóricos e com alto teor de gordura e de sódio tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Alguns fatores relacionados a este comportamento são a maior oferta desses alimentos, a alta palatabilidade e o menor custo, quando comparados ao preço de alimentos naturais e com elevado valor nutricional (BIELEMANN et al., 2015). Além disso, o gasto energético em atividades diárias, em locomoção e nos serviços que dependem de trabalho físico têm diminuído sensivelmente nas populações modernas (CHAPUT et al., 2011). Assim, em conjunto estes comportamentos inadequados favorecem o acúmulo de gordura corporal (ANDRICH et al., 2018; LAHJIBI et al., 2013; SARDINHA et al., 2017).

Em indivíduos com predisposição genética ou nas quais o acúmulo de gordura excede a capacidade do tecido adiposo, que, então, mobiliza ácidos graxos para tecidos não especializados em armazenamento de lipídeos, tais como fígado, rins, pâncreas, músculo estriado esquelético e cardíaco. O acúmulo de lipídeos ectópicos quando associado com a capacidade reduzida da β -oxidação celular caracteriza um processo denominado lipotoxicidade (ALWAHSH et al., 2017; DE CASTRO et al., 2013; DISSARD et al., 2013; ERTUNC; HOTAMISLIGIL, 2016; FU et al., 2009). Essa condição pode impedir a sinalização do substrato do receptor de insulina (IRS) e evoluir para a resistência à insulina e o DM2.

Em condições normais, a ligação da insulina nas subunidades α localizadas na face externa da membrana plasmática, estimula a atividade tirosina-cinase das subunidades β que resulta na autofosforilação dos resíduos de tirosina desencadeado pela hidrólise de moléculas de adenosina trifosfato (ATP). A autofosforilação das subunidades β expõe o sítio ativo dessas subunidades que ativa por fosforilação o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). O IRS-1 ativado (fosforilado) ativa por fosforilação a enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-K) que converte o lipídeo de membrana fosfatidilinositol- 4,5-bisfosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). A geração de PIP₃ ativa a proteína-cinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK) que fosforila a proteína-cinase B (PKB ou Akt) ligada ao lipídeo de membrana PIP₃ (GUO, 2014; MOHD-RADZMAN et al., 2013).

A ativação da PKB/Akt sinaliza a translocação para a membrana plasmática dos transportadores de glicose isoforma 4 (GLUT4) nos miócitos e adipócitos. A translocação dos transportadores GLUT4 armazenados em vesículas intracelulares está acoplada a sinalização de insulina no tecido muscular e adiposo e a fatores como a contração muscular e agentes farmacológicos da família das biguanidas (SALTIEL; KAHN, 2001; SATOH, 2014).

Além disso, diferentes mecanismos de sinalização ocorrem em resposta à insulina. No tecido hepático a insulina através da PKB/Akt estimula a síntese de glicogênio e lipídeos através da ativação das enzimas glicogênio-sintase, citrato-liase, e acetil-CoA-carboxilase. Por outro lado, suprime a produção de glicose hepática ao diminuir a transcrição da enzima fosfoenolpiruvato-carboxicinase (PEPCK). No tecido adiposo o efeito da insulina, auxilia a captação da glicose para produção de energia na forma de ATP, e o excesso de energia ativa a síntese de lipídeos pela ativação da enzima acetil-CoA-carboxilase; ao mesmo tempo que regula negativamente a lipólise por inibição da enzima lipase hormônio-sensível que, indiretamente, diminui a oferta de ácido graxos (AGL) e glicerol para o fígado. No músculo esquelético, a sinalização da insulina aumenta a captação de glicose circulante e estimula a síntese de glicogênio e proteína (SALTIEL; KAHN, 2001; SAMUEL; SHULMAN, 2016).

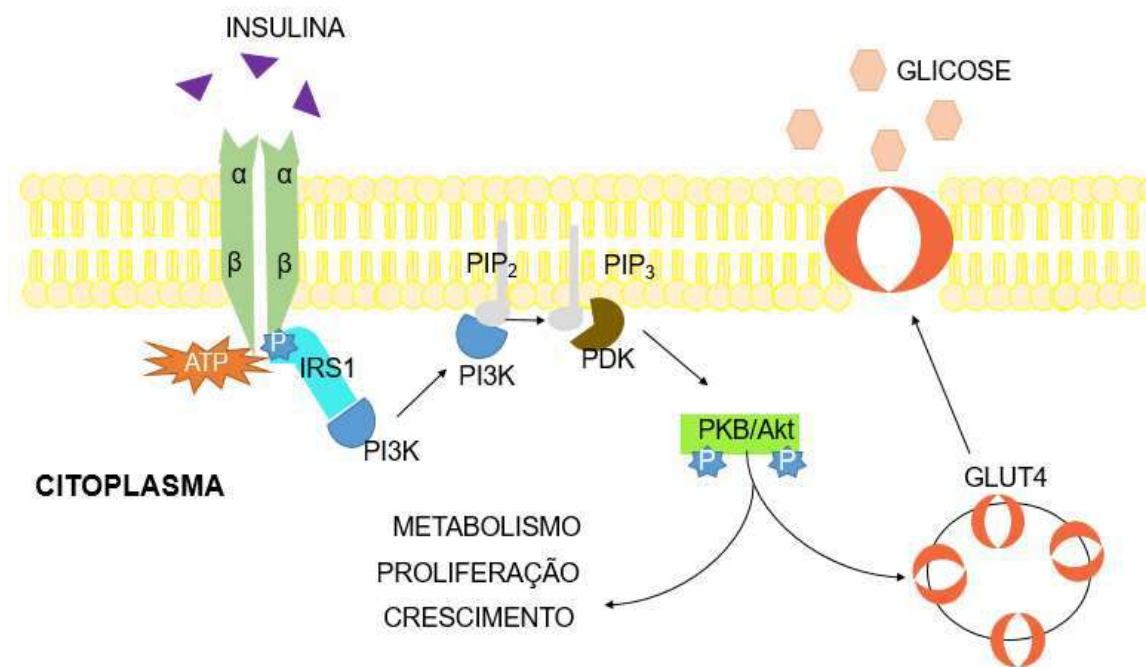


Figura 1. Sinalização da insulina. A insulina liga-se ao seu receptor, os resíduos de tirosina das subunidades β sofrem autofosforilação, desencadeando a cascata de fosforilação por doação de fosfato do ATP. Resultando, na translocação do GLUT4 do citosol para a membrana plasmática de nos miócitos e adipócitos para a captação de glicose sanguínea. A PKB/Akt também está envolvida na regulação de diversas funções celulares. IRS-1: substrato 1 do receptor de insulina; ATP: adenosina trifosfato; PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase; PIP₂: fosfatidilinosito-4,5-bifosfato; PIP₃: fosfatidilinosito-3,4,5-trifosfato; PDK-1: proteína-cinase dependente de PIP₃; PKB/Akt: proteína-cinase B; GLUT4: transportador de glicose isoforma 4; → indica ativação. Adaptado de Mohd-Radzman *et al.*, (2013).

Condições em que os tecidos alvos (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) são incapazes de responder aos estímulos da insulina resulta em resistência periférica à insulina (GUO, 2014; KNIGHTS *et al.*, 2014). De maneira geral, a resistência à insulina surge devido algum defeito na cascata de sinalização de insulina. Em um mecanismo compensatório, as células betas pancreáticas aumentam a secreção da insulina para controlar a glicemia, culminando com hiperinsulinemia. Apesar do excesso de insulina, esta não é capaz de desencadear a sinalização ao interagir com seu receptor nos tecidos alvos e o IRS-1 não é capaz de ser fosforilado, assim, a transmissão do sinal de insulina é prejudicada. Isto resulta em defeitos na absorção de glicose, alterações no metabolismo e no crescimento celular (CORNIER *et al.*, 2008).

Tem sido defendido que o nível elevado de TGL nos adipócitos induz a produção da proteína de quimiotaxia de macrófagos (MCP-1), isso resulta na infiltração e ativação dos macrófagos no tecido adiposo, acarretando numa

inflamação tecidual (HAN; LEVINGS, 2013). Esse quadro estimula os macrófagos a produzirem e secretarem fatores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O TNF- α nos adipócitos aumenta a expressão de enzimas envolvidas no processo de hidrólise de lipídeo (lipólise), acentuando a mobilização de AGL para o plasma (RUAN et al., 2002), e induzindo o armazenamento de lipídeos em tecidos não especializados, caracterizando a lipotoxicidade (GUILHERME et al., 2008; WEISBERG et al., 2003).

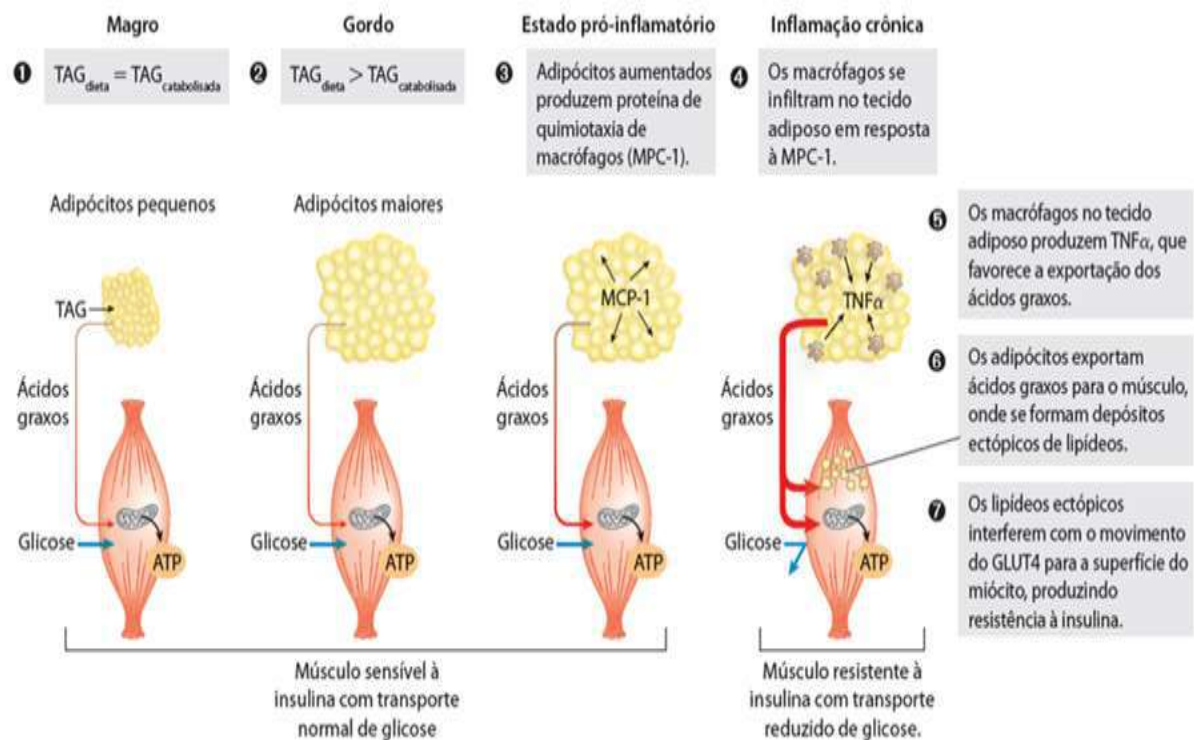


Figura 2: Acúmulo de lipídeos ectópicos - lipotoxicidade. O tecido adiposo saturado de TGL intracelular produz a MCP-1. A MCP-1 atrai os macrófagos para o tecido adiposo, que produz o TNF- α . O TNF- α induz a mobilização dos ácidos graxos para tecidos periféricos, caracterizando a lipotoxicidade. TGL: triacilglicerol; MCP-1: proteína de quimiotaxia de macrófagos; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . Fonte: Nelson e Cox, (2014).

Outra anomalia decorrente do acúmulo de gordura e do DM2 é a alteração da atividade e da expressão da enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH) nos tecidos periféricos (DE TAEYE et al., 2010; PIVACKOVA et al., 2015; ZHA et al., 2014). Conforme ilustrado na figura 1, a sEH é uma enzima que hidrolisa os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET) a ácidos dihidroxieicosatrienóicos (DHET). Os EET, gerados a partir do ácido araquidônico (AA, provenientes das membranas celulares) pelas enzimas citocromo-P450-epoxigenases, têm propriedades anti-hipertensivas,

anti-inflamatórias e anti-apoptóticas. Porém, quando os EET são convertidos pelas enzimas sEH a DHET, a função biológica dos EET é reduzida (CAMPBELL et al., 1996; CHEN et al., 2013; NODE, 1999). Divergente das funções dos EET, os ácidos 20-hidroxi-eicosatetraenóicos (20-HETE) também gerados dos ácidos araquidônicos pela enzima citocromo P450-hidroxilase desempenham funções vasoconstritoras e pró-inflamatórias (FAN et al., 2016; ISHIZUKA et al., 2008; SPECTOR; NORRIS, 2007).

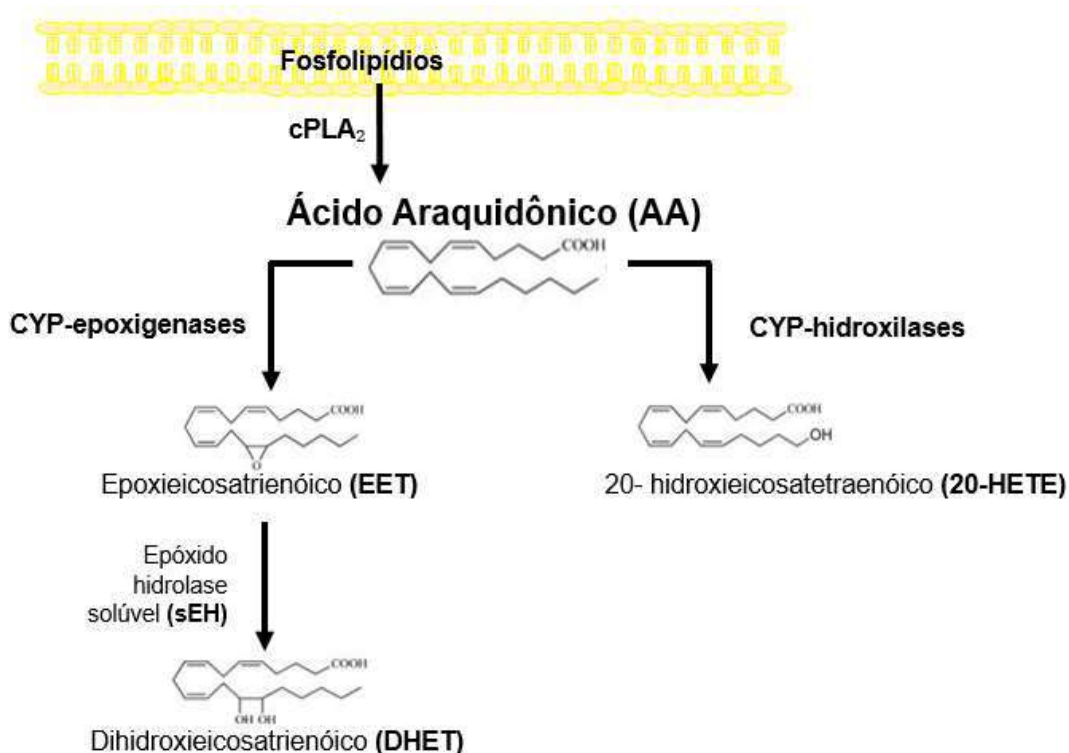


Figura 3. Via metabólica do ácido araquidônico e seus derivados eicosanoides. A cPLA₂ em resposta à estímulos hidrolisa os fosfolípidios da membrana celular e produz AA. Este é convertido à EET e 20-HETE pela CYP-epoxigenases e CYP-hidroxilases, respectivamente. Os EETs são hidrolisados rapidamente pela sEH para DHETs. cPLA₂: fosfolipase A₂ citosólica; AA: ácido araquidônico livre; CYP-epoxigenases: citocromo P-epoxigenases; CYP- hidroxilases: citocromo P-hidroxilases; EET: ácidos epoxieicosatrienoico; 20-HETE: ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico; sEH: epóxido hidrolase solúvel; DHETs: ácidos dihidroxieicosatrienoicos. Adaptado de John D. Imig (2013).

Tem sido descrita na literatura a associação entre concentrações reduzidas de EET e aumento de DHET e de 20-HETE e a hipertensão arterial, comorbidade geralmente encontrada em indivíduos com DM2 (ISHIZUKA et al., 2008; SAVAS et al., 2016; WANG et al., 2003). Além disso, a resistência à insulina em pacientes com DM2 tem sido um fator de risco significativamente maior para doença renal

diabética, levando a alterações nos rins, tais como aumento da sensibilidade ao sal, hiperfiltração glomerular e à redução da função renal (AHLQVIST et al., 2018).

Vários estudos têm demonstrado que a prática de exercício físico regular produz efeitos benéficos em relação à redução e manutenção da massa corporal (BRADBURY et al., 2017), no aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos alvo, no controle da glicemia (DOS SANTOS et al., 2015) dislipidemias (WANG; XU, 2017) e disfunções vasculares (IRIGOYEN et al., 2003). Assim, a prática de exercício físico tem sido amplamente utilizada no tratamento não medicamentoso de doenças metabólicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016), por seus efeitos na redução da gordura corporal e, supostamente pela alterações nas proporções dos produtos do ácido araquidônico.

Embora o exercício físico seja um potencial tratamento não medicamentoso para a redução do risco para DM2 e doenças cardiovasculares, alguns estudos e diretrizes apostam que o exercício aeróbico de intensidade moderada seja o mais adequado, pois certos riscos de exercício físico de alta intensidade devem ser considerados ao recomendar ao público em geral (BENITE-RIBEIRO; SANTOS; DUARTE, 2014; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014; DUVIVIER et al., 2013).

Diante deste cenário, desenvolver modelos experimentais por meio de metodologias que induzam o DM2, de forma similar ao desenvolvimento da doença em seres humanos, pode ser importante para estudos mais fidedignos dos efeitos metabólicos da doença. O estudo do efeito do DM2 e da adiposidade nas proporções dos eicosanoides, derivados do ácido araquidônico, também é de grande valor científico para o desenvolvimento de fármacos possam evitar as comorbidades do DM2 e da obesidade, tais como a hipertensão arterial e as doenças renais. Além disso, investigar o efeito do exercício físico moderado nas alterações metabólicas e dos eicosanoides causadas pelo DM2, pode fornecer informações complementares para o tratamento dessas doenças altamente prevalentes nas populações atuais.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1. Objetivo Geral

No presente estudo testaremos as seguintes hipóteses:

- Hipótese 1) a dieta hiperlipídica pode induzir o DM2 sem a administração de streptozotocina (STZ);
- Hipótese 2) a dieta hiperlipídica e hipercalórica causa efeitos metabólicos, comportamental e morfológicos similares ao do DM2;
- Hipótese 3) a prática de exercício físico moderado tem potencial de reverter as alterações metabólicas causadas pelo DM2 e pela dieta hiperlipídica.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se a administração de dieta hiperlipídica sem o uso de STZ causam efeitos similares ao DM2, por meio da avaliação do ganho de massa corporal, de gordura abdominal, da glicemia e do perfil lipídico;
- Analisar se a ingestão de dieta hiperlipídica afeta o comportamento alimentar, por meio da avaliação da ingestão calórica e da eficiência alimentar;
- Verificar se ingestão de dieta hiperlipídica e o DM2 alteram a atividade das enzimas sEH e CYP-hidroxilase o que, por sua vez, pode aumentar as concentrações plasmáticas dos ácidos DHET e 20-HETE, respectivamente, e reduzir a concentração de EET, por meio da avaliação dos eicosanóides;
- Avaliar se o DM2 e a ingestão de dieta hiperlipídica alteram a integridade morfológica dos rins de ratos Wistar, por meio da histologia dos rins;
- Testar se o exercício físico moderado pode reverter as alterações metabólicas causadas pelo DM2 e pela dieta hiperlipídica sobre os compostos do ácido araquidônico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Para o desenvolvimento do presente estudo, utilizamos plasma congelado e dados armazenados do experimento realizado em 2015 pela equipe de pesquisa dos laboratórios de Bioquímica e de Fisiologia. O protocolo experimental foi desenvolvido no período de junho a dezembro de 2015 (protocolo 034/14, CEUA/UFG). Foram utilizados 57 ratos Wistar machos, da espécie *Rattus norvegicus*, com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFG-Regional Goiânia e mantidos na sala de experimentação do curso de Psicologia da Universidade Federal de Goiás- Regional Jataí. Os animais foram alojados aos pares em gaiolas de polipropileno com bebedouros e substratos de maravalha, acondicionadas em gabinetes para biotério. As condições ambientais foram padronizadas com ciclo circadiano invertido 12h claro/escuro e temperatura ambiental de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. A dieta e a água foram oferecidas *ad libitum*.

4.2. Protocolos Experimentais – Indução ao DM2

O protocolo experimental ocorreu durante um período de nove semanas. Para induzir o DM2, os animais ($n=24$) foram alimentados com uma dieta rica em gordura (dieta hiperlipídica) da Pragsoluções Biociências® (Jaú, SP) contendo 5,35 kcal/g (15,2% kcal proteína, 26,9% kcal carboidrato e 57,2% gordura), e no 13º dia, foram mantidos em jejum por 12 horas. No 14º dia foi administrada uma única injeção via intraperitoneal com baixa dosagem de estreptozotocina (Sigma Aldrich) (STZ diluído em tampão de citrato, pH 4,5 - 25mg/kg de peso corporal do animal), este protocolo foi adaptado de Mansor *et al.*, (2013). A dieta hiperlipídica foi oferecida durante todo o período experimental e este grupo de animais foi denominado como grupo diabético (grupo D). A glicemia capilar, coletada da cauda, sem jejum prévio, foi monitorada semanalmente entre 12:00h e 14:00h com o uso de um glicosímetro (Accu-Chek®). A glicemia em jejum foi avaliada no início e final do experimento.

Para testar o efeito somente da dieta, 8 animais foram alimentados com a mesma dieta hiperlipídica dos animais do primeiro protocolo, mas não receberam a injeção de STZ, este grupo foi denominado como HL.

Animais com idades similares (n= 25) foram utilizados como controle (grupo CO), no 13º dia os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e no 14º dia foi administrada uma única injeção de tampão de citrato (pH 4,5), estes animais receberam dieta balanceada para ratos da empresa a Pragsoluções Biociências®, contendo 3.87 kcal/g (24,8% kcal proteína, 63% kcal carboidrato e 12% kcal gordura).

No final da terceira semana, animais dos grupos CO e D foram subdivididos em outros dois grupos, um sedentário e outro submetido ao exercício físico, formando os seguintes grupos: controle - sedentário (CO-SE); dieta hiperlipídica + STZ- sedentário (D-SE); Controle - exercício físico (CO-EF) e dieta hiperlipídica + STZ - exercício físico (D-EF). Os animais que receberam apenas dieta hiperlipídica, o grupo HL, não foram submetidos ao exercício físico, sendo denominado como HL-SE.

Deste modo, os cinco grupos experimentais foram divididos como exposto na figura 4.

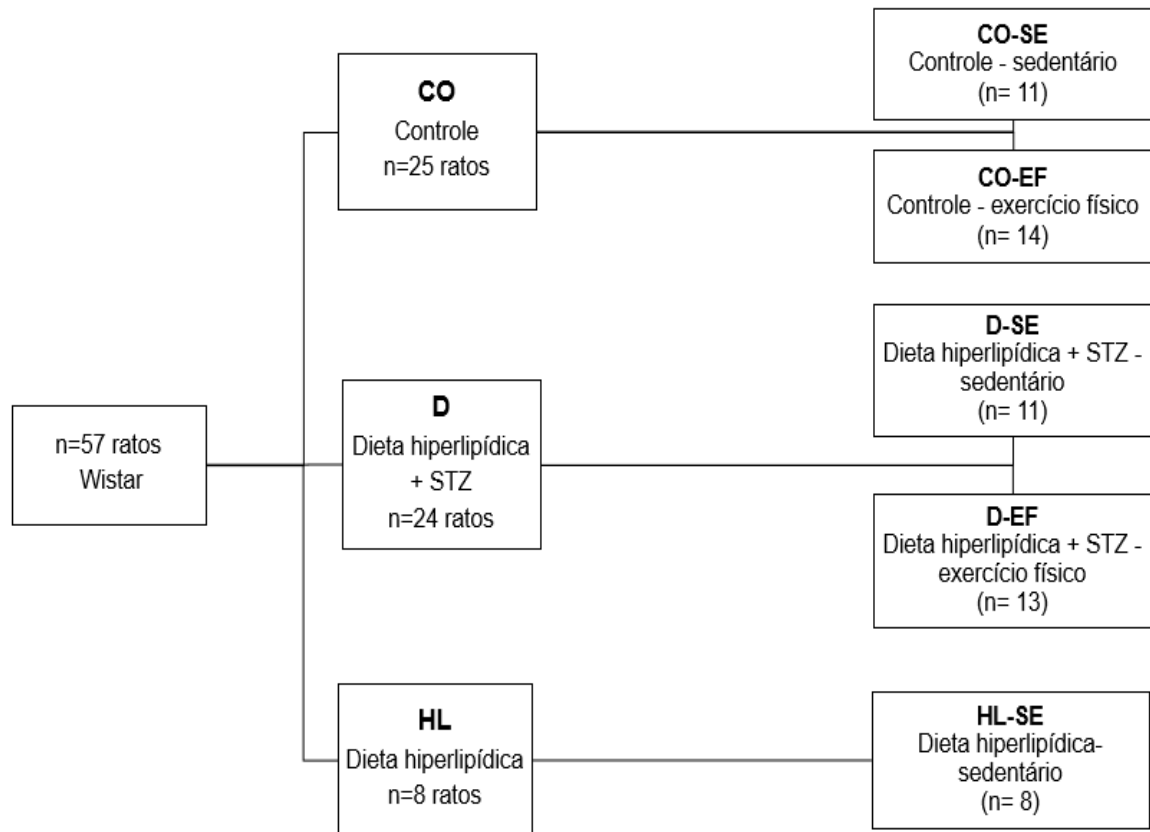


Figura 4. Desenho experimental da divisão dos animais nos grupos. Ratos Wistar foram alocados em grupos para tratamentos com dieta hiperlipídica, estreptozotocina (STZ) e exercício físico segundo o protocolo experimental.

Os animais do grupo de exercício físico foram submetidos a um protocolo de natação adaptado de Lima *et al.*, (2013) durante 6 semanas, com 5 sessões por semana, sem sobrecarga na cauda. O treinamento de natação foi realizado entre 12h e 14h, em baldes com 80 cm de comprimento, 50 cm de largura e 90 cm de profundidade. Na primeira semana a duração do exercício foi de 30 minutos e a cada semana, para melhorar a resistência dos animais, houve incremento de 5 minutos. Os animais foram estimulados a nadar sempre que tentavam boiar.

A figura 5 ilustra todo o período experimental. Ao final do protocolo experimental (9ª semana) e após quarenta e oito horas do término da última sessão de exercício, todos os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano 2,5 vol% e eutanasiados por exanguinação seguido por deslocamento cervical.

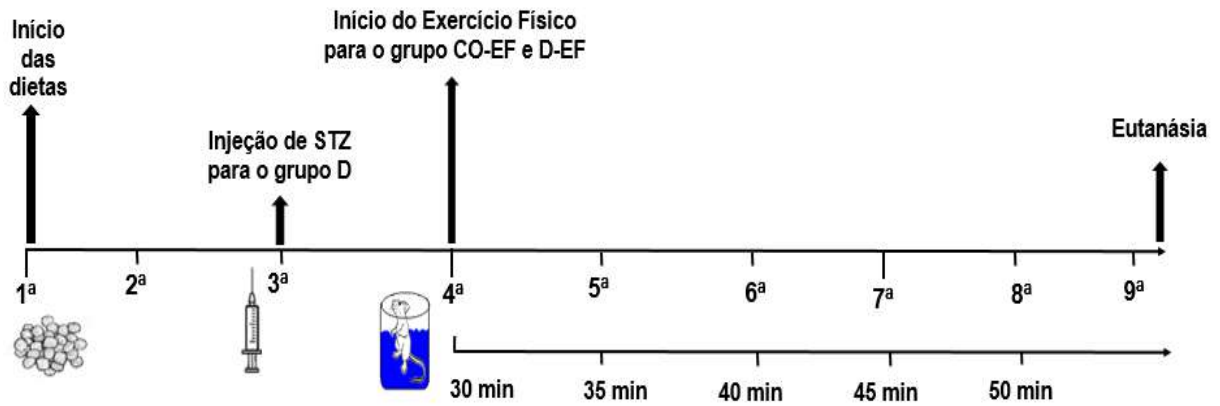


Figura 5. Desenho experimental. Ratos Wistar foram alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica durante todo o período experimento. No início da 3ª semana foi administrada uma única injeção via intraperitoneal com baixa dosagem de estreptozotocina (STZ) aos animais do grupo D. Os grupos de exercício físico foram submetidos a um protocolo de natação com duração inicial de 30 minutos e a cada semana houve incremento de 5 minutos. Ao final do protocolo experimental (9ª semana), os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos.

4.3. Ganho de massa corporal, ingestão calórica e a eficiência alimentar

A quantidade de ração ingerida (em gramas) e a massa corporal foram avaliadas semanalmente por meio de balança digital (Marte®). O ganho de massa corporal foi calculado pela diferença entre a massa corporal final e a inicial do experimento. A caloria média ingerida foi calculada multiplicando-se a quantidade de ração (em gramas) ingerida pela dupla de ratos em cada gaiola pelo valor calórico da ração balanceada (3,87 kcal/g) e hiperlipídica (5,35 kcal/g). O cálculo da ingestão calórica (IC) foi feito pelo consumo de calorias ingeridas (kcal/g) durante a semana pela dupla de animais em cada gaiola dividida pela massa corporal da dupla (em gramas) naquela semana ($IC \times \text{kcalração} / \text{massa corporal}$). O cálculo da eficiência alimentar (EA) foi feito por meio da relação entre o ganho de massa corporal (g) e o consumo de ração da semana dos animais (kcal/g), portanto foi calculada pela divisão da ingestão calórica calculada durante cada semana pelo ganho de massa corporal.

4.4. Coleta de sangue e de tecidos

Ao término do protocolo experimental, o sangue foi coletado com seringa contendo solução anticoagulante inibidora da glicólise (6 g/dl de EDTA e 12 g/dl de fluoreto de potássio do Kit Glistab da Labtest®, Lagoa Santa, MG). Em seguida foi centrifugado a 3000 g/10 min/25°C, o plasma foi coletado e armazenado a -20°C para posteriores análises.

A gordura foi cirurgicamente retirada da região abdominal e aferida em balança de precisão digital. Os rins foram retirados e fixados em Karnovsky (4% paraformaldeído, 4% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹, pH 7,4) e armazenados em álcool 70% (OLIVEIRA et al., 2015).

4.5. Análises bioquímicas

4.5.1. Glicose e perfil lipídico

A glicemia capilar avaliada no início, meio e fim do período experimental, e foi determinada pelo glicosímetro (Accu-Chek®, Santo André /SP). No final do

experimento foram determinadas a glicose plasmática em jejum pelo método da glicose oxidase (Kit colorimétrico da Labtest®), e as concentrações sanguíneas de triacilglicerol (TGL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas por Kits colorimétricos da marca Labtest®. A concentração da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foi determinada pela divisão do valor de TGL por cinco.

4.5.2. Níveis plasmáticos de 20-HETE

Plasmas armazenados e congelados no final do período experimental foram utilizados para o teste de Elisa. No total foram analisadas 21 amostras de plasmas, sendo 3 amostras para o grupo HL-SE, 4 para os grupos CO-SE, CO-EF, D-EF, e 5 para o grupo D-SE.

Para extração de 20-HETE das amostras plasmáticas, foi utilizado o protocolo do kit 20-HETE ELISA (Detroit R & D, Inc Detroit/MI). Utilizou-se 100 µl de plasma distribuídos em tubos de 1,5 ml. Em seguida, foram acrescentados 100 µl de acetato de etila, e o material foi homogeneizado por 30 segundos em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm/10 min/22°C para separação da fase orgânica (lipoproteínas), da interfase (proteínas) e da fase aquosa. A fase orgânica foi coletada e após evaporação da fase líquida foram acondicionadas a – 5°C até o ensaio ELISA.

O teste de ELISA para 20-HETE foi realizado de acordo com as instruções do fabricante Detroit R&D, Inc (Detroit/MI). Foram realizadas diluições seriadas de estoque padrão do kit 20-HETE ELISA (Detroit R&D, Inc), obtendo soluções de concentrações conhecidas (1000ng, 100ng, 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng) para a curva padrão. As amostras foram previamente descongeladas à temperatura ambiente e diluídas com 20 µl de dimetilsulfóxido e 500 µl do tampão de diluição do kit 20-HETE ELISA (Detroit R&D, Inc).

A curva padrão foi realizada em triplicatas na placa. Foram adicionados 200 µl do tampão de diluição nos poços Brancos (B), 100 µl do tampão de diluição e 100 µl do conjugado HRP 20-HETE nos poços de Ligação (B0) e nos poços Padrões. As amostras foram colocadas em duplicatas e acrescidas com conjugado HRP 20-HETE, em volume final de 200 µl nos poços. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem do kit 20-HETE ELISA (Detroit R&D, Inc), em seguida, foi adicionado a cada poço 200 µl da solução de tetrametil benzadina

(TMB). Após mais 30 minutos de incubação, foram adicionados 50 µl ácido sulfúrico 2 N. A placa foi lida em um leitor de placas de ELISA (Thermo Plate ®) a um comprimento de onda de 450 nm.

4.5.3. Níveis plasmáticos de 14,15 DHET

Foram analisadas 32 de amostras plasmáticas congeladas no total, sendo 8 amostras por grupos. Para extração de 14,15 DHET das amostras plasmáticas, foi utilizado o protocolo do kit 14,15-EET/DHET (Detroit R & D, Inc Detroit/MI). Utilizou-se 100 µl de plasma distribuídos em tubos de 1,5 ml. Em seguida, foram acrescentados 100 µl de acetato de etila, e o material foi homogeneizado por 30 segundos em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm/10 min/22°C para separação da fase orgânica (lipoproteínas), da interfase (proteínas) e da fase aquosa. A fase orgânica foi coletada e após evaporação da fase líquida foram acondicionadas a – 5°C até o ensaio ELISA.

O teste de ELISA para kit 14,15-EET/DHET foi realizado de acordo com as instruções do fabricante Detroit R&D, Inc (Detroit/MI). Foram realizadas diluições seriadas de estoque padrão do kit 14,15-EET/DHET ELISA (Detroit R&D, Inc), obtendo soluções de concentrações conhecidas (1000ng, 100ng, 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng) para a curva padrão. As amostras foram diluídas com 20 µl de dimetilsulfóxido e 500 µl tampão de diluição do kit 14,15-EET/DHET (Detroit R & D, Inc Detroit/MI).

A curva padrão foi realizada em duplicatas na placa. Foram adicionados 200 µl do tampão de diluição nos poços Brancos (B), 100 µl do tampão de diluição e 100 µl do conjugado HRP 14,15- DHET nos poços de Ligação (B0) e nos poços Padrões. As amostras foram colocadas em duplicatas e acrescidas com conjugado HRP 14,15- DHET, em volume final de 200 µl nos poços. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem do kit 14,15-EET/DHET ELISA (Detroit R&D, Inc), em seguida, foi adicionado em cada poço 200 µl da solução de tetrametil benzadina (TMB). Após mais 30 minutos de incubação, foram adicionados 50 µl ácido sulfúrico 2 N. A placa foi lida em um leitor de placas de ELISA (Thermo Plate®) a um comprimento de onda de 450 nm.

4.5.4. Níveis plasmáticos de 14,15 EET

Foram analisadas 20 amostras plasmáticas congelados no total, sendo 4 amostras para os grupos CO-SE, CO-EF, D-EF, 3 para o grupo D-SE e 5 para o grupo HL-SE. Para extração de 14,15 EET, 100 µl de plasma foi diluído com 100 µl de acetato de etila e 1 µl do ácido acético (pH 4) em tubos de 1,5 ml. O material foi homogeneizado e centrifugado a 4 000 rpm/10 min/22 °C. As fases orgânicas foram coletadas e após a evaporação foi adicionado 20 µl de etanol e 20 µl de ácido acético deixando reagir por 18 horas em temperatura ambiente, nesta reação os ácidos EET são convertidos em DHET. Após a reação, a solução aquosa foi diluída com 150 µl de água *MilliQ* e 250 µl de acetato de etila e centrifugado a 4000 rpm/10 min/22°C. As fases orgânicas superiores com lipídeos foram coletadas e, após evaporação, acondicionadas a -5 °C até o ensaio ELISA.

Essas amostras incluem EET + DHET. A placa do kit 14,15-EET/DHET contém somente anticorpo para 14,15-DHET, no entanto, o mesmo ensaio ELISA para 14,15- DHET foi repetido. Os valores da leitura do nível plasmático de EET + DHET foram subtraídos com os valores do nível 14,15 DHET, e assim, foram obtidos os níveis de EET na amostra.

4.6. Preparação do tecido renal para análise histológica

Um corte longitudinal foi traçado e fragmentos dos rins foram acondicionados em cassetes histológicos durante 18 horas em álcool 70%, em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos com espessuras de 5 µm em micrótomo manual (Leica RM2235, Biosystems®). As lâminas foram coradas por hematoxilina- eosina e as imagens foram adquiridas em microscópio óptico (Leica ICC50, Biosystems®). A morfologia glomerular foi avaliada a cegas por um patologista.

4.7. Análise Estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm dp$). Os *outliers* foram calculados baseando-se no teorema de Chebyshev ($md \pm 2*dp$), e excluídos das amostras. A distribuição de normalidade dos dados foi verificada pelo teste

Shapiro–Wilk. Para comparação entre as semanas no mesmo grupo da massa corporal foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas com o pós-teste Tukey. Para a comparação entre os grupos na avaliação de massa corporal, ingestão calórica, eficiência alimentar, ganho de massa corporal, gordura abdominal, glicemia, perfil lipídico, e níveis dos ácidos (14,15 DHET, EET, 20-HETE), foram usados o teste de variância, ANOVA de um fator, seguida pelo pós-teste Tukey e o teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn conforme a normalidade da distribuição dos dados. Estes dados foram analisados usando o software Sigmaplot® (Systat, San Jose, CA). Para verificar associações entre as variáveis gordura abdominal, glicemia, perfil lipídico, ingestão calórica total, ganho de massa corporal e eficiência alimentar total foi aplicado o teste de correlação Spearman, usando o software SPSS Statistic® (IBM Corporation, Armonk, NY). O nível de significância foi de $p < 0,05$ e o coeficiente de correlação $\geq 0,60$.

5. RESULTADOS

5.1. Massa Corporal

A massa corporal dos grupos é apresentada na figura 6. Não foram encontrados *outliers* e na comparação entre os grupos não houve diferença significativa da massa corporal. Houve o aumento da massa corporal durante o experimento. Em todos os grupos não foram encontradas diferenças significativas da massa corporal na 7ª e 8ª semana experimental.

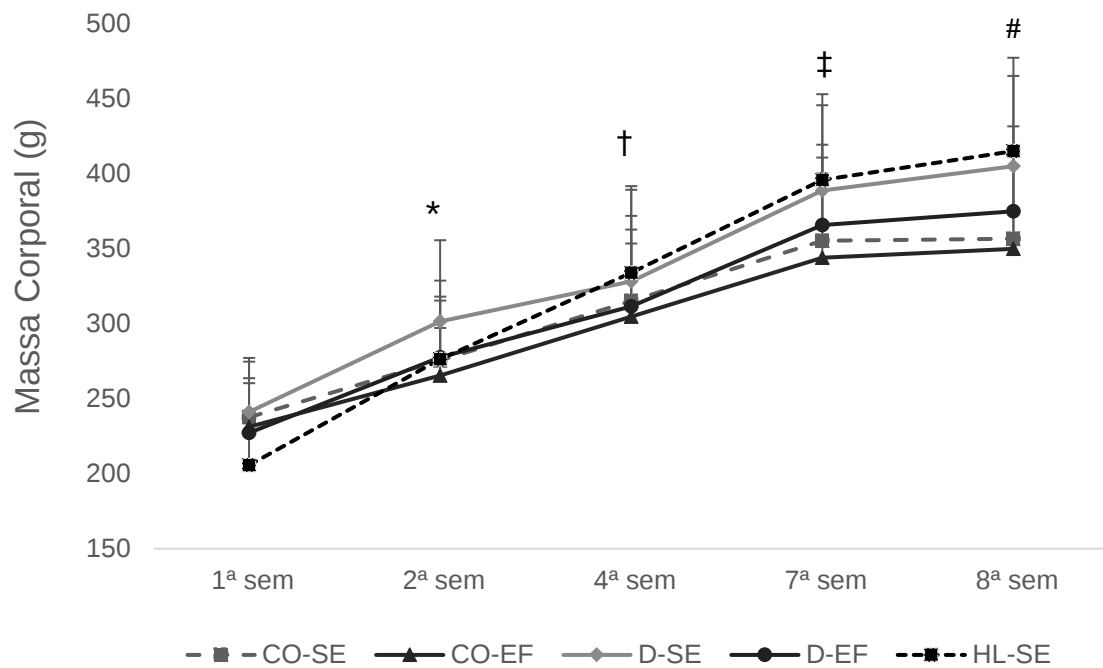


Figura 6. Massa corporal durante o experimento. CO-SE= controle- sedentário (n=11), CO-EF= controle- exercício físico (n=14), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina-sedentário (n=11), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina-exercício físico (n=13), HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário (n=8). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA de medida repetida com o pós-teste Tukey para comparação da massa corporal no mesmo grupo no decorrer das semanas, as diferenças estatísticas foram: * $p < 0,001$ 2ª sem vs 1ª semana; † $p < 0,001$ 4ª sem vs 1ª, 2ª semana; ‡ $p < 0,001$ 7ª sem vs 1ª, 2ª e 4ª semana; # $p < 0,001$ 8ª sem vs 1ª, 2ª e 4ª semana.

5.2. Ganho de Massa Corporal e de Gordura Abdominal

O ganho de massa corporal durante todo o protocolo experimental é apresentado na figura 7. Não foram encontrados *outliers* e pode-se observar que o ganho da massa corporal foi maior no grupo HL-SE do que nos demais grupos. Os animais do grupo D-SE também apresentaram diferença significativa no ganho de massa corporal em relação aos grupos controles (CO-SE e CO-EF).

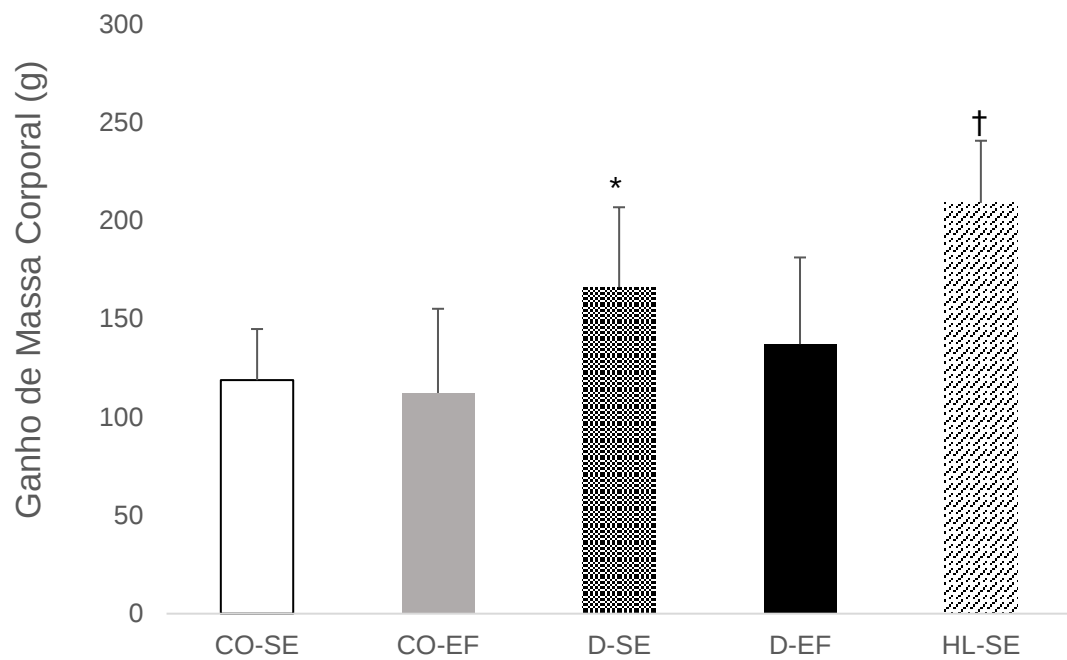


Figura 7. Efeito do protocolo experimental no ganho de massa corporal. CO-SE= controle - sedentário (n=11), CO-EF= controle - exercício físico (n=14), D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário (n=11), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico (n=13), HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário (n=8). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA de um fator com pós-teste Tukey, * $p < 0,05$ D-SE vs CO-SE e CO-EF; † $p < 0,01$ HL-SE vs CO-SE, CO-EF e D-EF.

Na figura 8 são apresentados os valores referentes a gordura abdominal. Apenas um *outlier* do grupo D-SE foi excluído. A gordura abdominal foi maior nos animais do grupo HL-SE quando comparado aos grupos D-SE e controles (C-S e CO-EF). Para o grupo D-EF a gordura abdominal foi significativamente maior em comparação aos grupos controles (CO-SE e CO-EF).

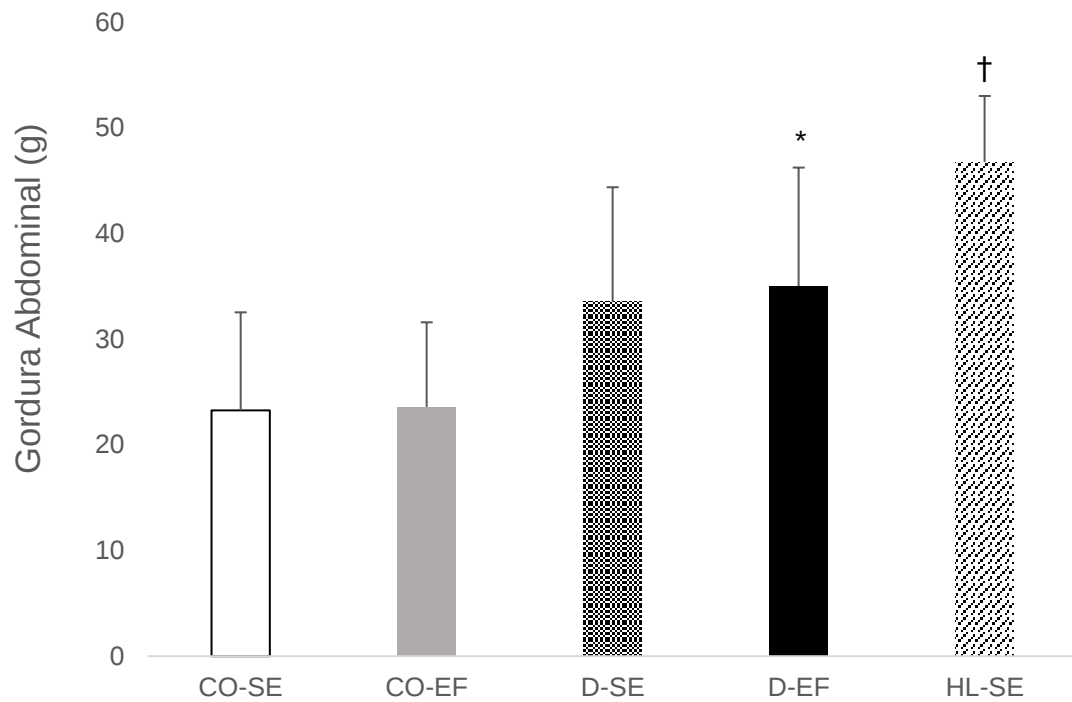


Figura 8. Efeito do protocolo experimental na gordura abdominal. CO-SE= controle-sedentário (n=11), CO-EF= controle- exercício físico (n=13), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário (n=10), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico (n=14), HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário (n=8). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA de um fator com pós-teste Tukey, * $p < 0,001$ D-EF vs CO-SE e CO-EF; † $p < 0,001$ HL-SE vs CO-SE, CO-EF e D-SE.

5.3. Perfil lipídico e Glicemia

A figura 9 apresenta os valores dos níveis plasmáticos de triglicérides livres (TGL), das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL). Nas análises dos níveis de triacilglicerol livres (TGL) e da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foram excluídos dois *outliers* para os grupos CO-EF e D-EF e um *outlier* para o grupo HL-SE.

Os valores plasmáticos de TGL e VLDL foram maiores nos animais HL-SE quando comparados aos grupos submetidos ao exercício físico (D-EF, CO-EF). Por outro lado, os valores da lipoproteína de alta densidade (HDL) foram maiores nos grupos exercitados (CO-EF e D-EF) quando comparados animais de grupos sedentários (Figura 9).

Na figura 10 são apresentados os valores dos níveis plasmáticos de glicemia em jejum. Após a retirada de dois *outliers* para os grupos CO-EF e D-EF e um *outlier* para o grupo D-SE, verificou-se que a glicose em jejum foi maior nos grupos D-SE, D-EF e HL-SE do que nos grupos CO-SE e CO-EF.

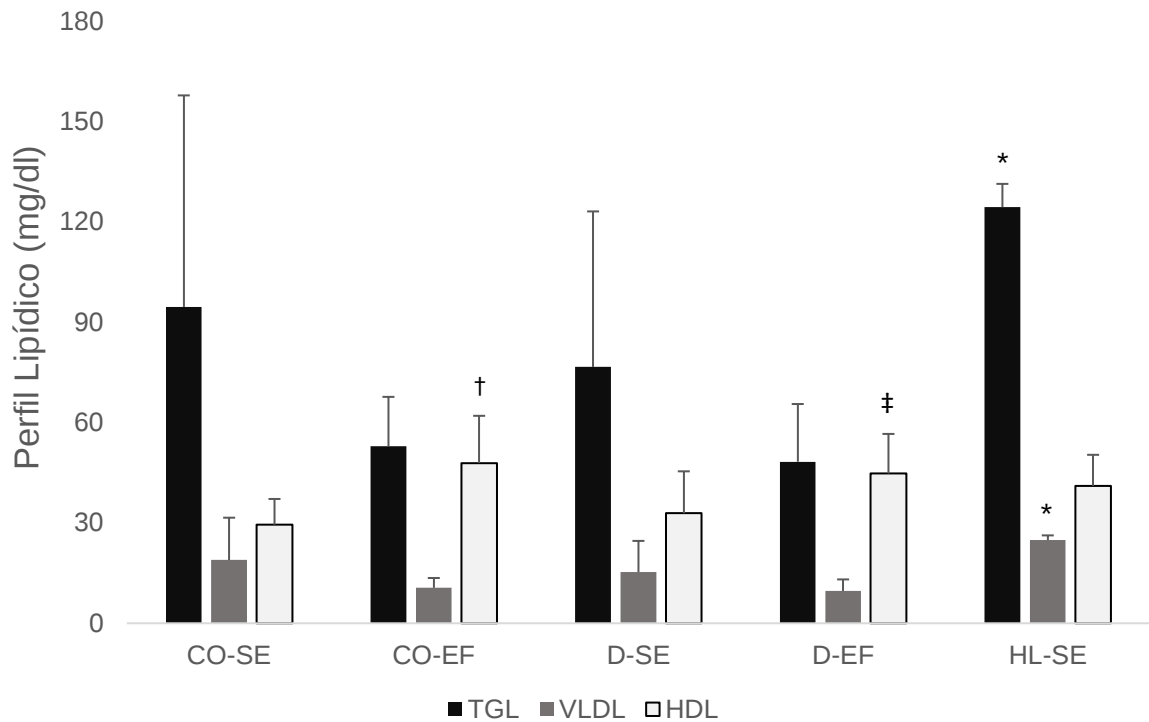


Figura 9. Perfil lipídico dos grupos. CO-SE= controle- sedentário (n=11), CO-EF= controle-exercício físico (n=11), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário (n=11), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico (n=11), HL-SE= dieta hiperlipídica - sedentário (n=7). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, * $p < 0,05$, HL-SE vs D-EF. Pelo teste ANOVA de um fator com pós-teste Tukey, as diferenças estatísticas foram: † $p < 0,05$ CO-EF vs CO-SE e D-SE; ‡ $p < 0,05$ D-EF vs CO-SE.

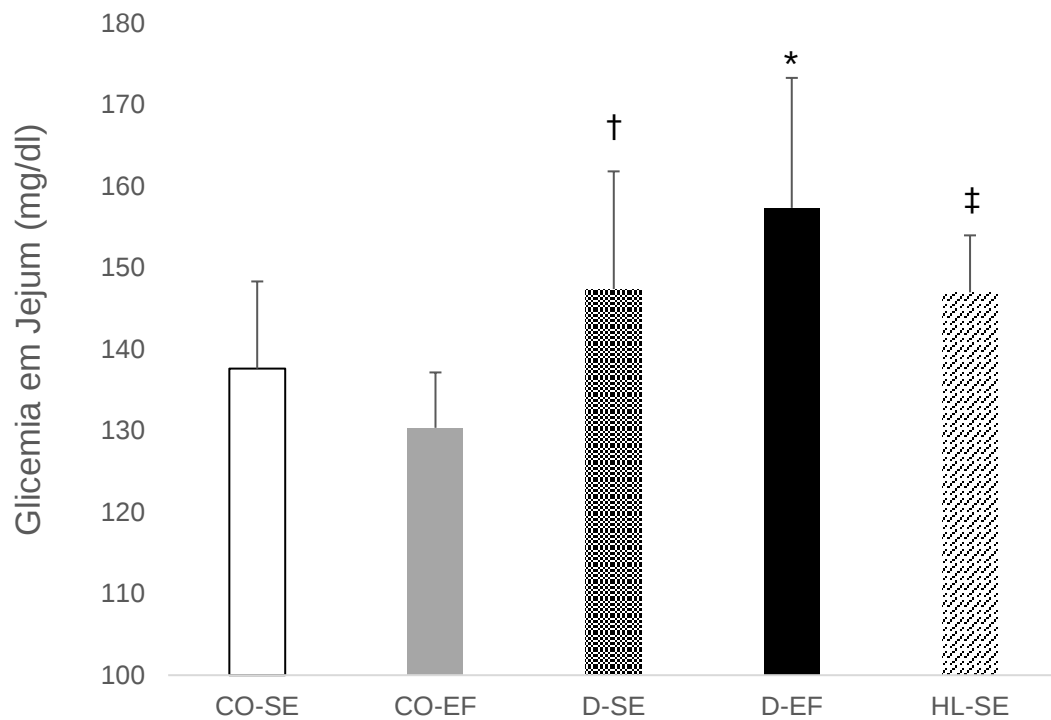


Figura 10. Glicemia em Jejum. CO-SE= controle- sedentário (n=11), CO-EF= controle - exercício físico (n=12), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina- sedentário (n=11), D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico (n=11), HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário (n=7). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA de um fator com pós-teste Tukey, * $p < 0,05$ D-EF vs CO-SE e CO-EF; † $p < 0,05$ D-SE vs CO-EF; ‡ $p < 0,001$, HL-SE vs CO-EF.

Na figura 11 estão apresentadas a glicemia capilar mensurada em diferentes momentos do experimento (início, meio e fim). Foram retirados três *outliers* para o grupo D-EF, dois para os grupos D-SE e CO-EF, um *outlier* para o grupo CO-SE. Não houve diferença significativa da glicemia capilar entre os grupos no início do experimento. O nível da glicose capilar foi maior no meio do período experimental para os animais dos grupos D-SE e D-EF quando comparado ao grupo CO-SE. E no final do experimento a glicemia capilar foi maior para os animais D-SE e D-EF quando comparados aos grupos controles.

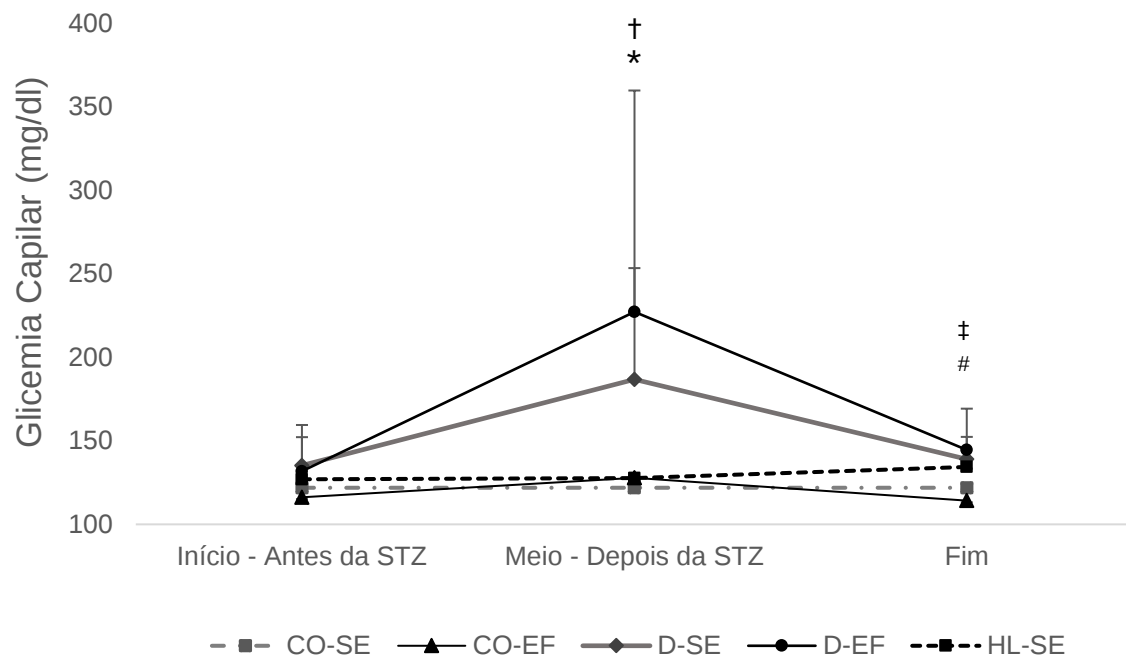


Figura 11. Glicemia capilar mensurada antes e após a administração de estreptozotocina (STZ) e no início do exercício físico. CO-SE= controle - sedentário (n=10), CO-EF= controle - exercício físico (n=13), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina- sedentário (n=10), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico (n=12), HL-SE= dieta hiperlipídica - sedentário (n=8). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, * $p < 0,001$ D-EF vs CO-SE; † $p < 0,001$ D-SE vs CO-SE. ANOVA de um fator com pós-teste Tukey, ‡ $p < 0,05$ D-EF vs CO-SE e CO-EF; # $p < 0,05$ D-SE vs CO-SE e CO-EF.

5.4. Ingestão Calórica e Eficiência Alimentar

Os valores médios da ingestão calórica (IC) são apresentados na tabela 1. Foram retirados dois *outliers* do grupo D-SE, sendo um da 1ª semana e outro da 7ª semana.

Na comparação entre grupos não houve diferença significativa na ingestão calórica na 1ª, 2ª, 4ª e 7ª semanas experimentais. Mas na 8ª semana os valores da ingestão calórica foram maiores para os animais dos grupos controles (CO-SE, CO-EF) quando comparados aos grupos experimentais (D-SE, D-EF, HL-SE). A ingestão calórica total (ICT) entre os grupos foi maior nos animais do CO-EF em relação ao grupo D-SE e no grupo HL-SE em comparação aos demais (Tabela 1).

Tabela 1. Valores (média $\pm$ desvio padrão) da ingestão calórica de ratos Wistar divididos nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica - sedentário.

Ingestão calórica (kcal/g)							
	N	1 ^a e 2 ^a sem	N	4 ^a sem	7 ^a sem	8 ^a sem	TOTAL
CO-SE	25	1,8 $\pm$ 0,6	11	1,9 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1	1,9$\pm$0,4 *	7,8 $\pm$ 1,2
CO-EF			14	1,9 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1	1,9$\pm$0,3 †	8,0$\pm$1,1 ‡
D-SE	32	2,0 $\pm$ 0,7	11	2,1 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,6
D-EF			13	2,2 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 1,5
HL-SE			8	2,3 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	9,6$\pm$0,9 #

Teste ANOVA de um fator com pós-teste Tukey as diferenças estatísticas foram: * $p < 0,001$ CO-SE vs D-SE, D-EF, HL-SE; † $p < 0,001$ CO-EF e D-SE, D-EF, ‡ $p < 0,05$ CO-EF vs D-SE; # $p < 0,05$ HL-SE vs CO-SE, CO-EF, D-SE, D-EF.

Na Tabela 2 são apresentados os valores referentes a eficiência alimentar (EA). Foram encontrados no total três *outliers* para os grupos CO-SE e CO-EF, sendo excluídos da 2ª e 4ª semana do CO-SE, e um *outlier* da 2ª semana do CO-EF. Também foram encontrados três *outliers* para os grupos D-SE e D-EF, sendo excluídos um da 2ª e 4ª semana do grupo D-SE, e retirado da 8ª semana para o grupo D-EF.

Na comparação entre grupos não houve diferença significativa na eficiência alimentar na 2ª, 4ª e 7ª semanas experimentais. Na 8ª semana os valores da eficiência alimentar foram maiores para o grupo HL-SE em comparação aos grupos controles, e nos animais do D-EF em relação ao grupo CO-EF. A eficiência alimentar total (EAT) entre os grupos foi maior para os animais D-SE e HL-SE quando comparados aos animais dos grupos controles (Tabela 2).

Tabela 2. Valores (média $\pm$ desvio padrão) da eficiência alimentar de ratos Wistar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica - sedentário.

Eficiência alimentar									
	N	2ª sem	N	4ª sem	N	7ª sem	N	8ª sem	TOTAL
CO-SE			10	0,08±0,02	11	0,07±0,02	11	0,01±0,05	0,21±0,06
CO-EF	25	0,08±0,03	14	0,08±0,02	14	0,06±0,02	14	0,01±0,07	0,22±0,07
D-SE			10	0,09±0,02	11	0,09±0,03	11	0,05±0,04	0,33±0,09 ‡
D-EF	32	0,11±0,04	13	0,07±0,02	13	0,08±0,03	13	0,07±0,09 *	0,31±0,11
HL-SE			7	0,09±0,03	8	0,08±0,02	8	0,12±0,03 †	0,40±0,04 †

Teste ANOVA de um fator com o pós-teste Tukey as diferenças estatísticas foram: * $p < 0,05$ D-EF vs CO-EF; † $p < 0,001$, HL-SE vs CO-SE, CO-EF; ‡ $p < 0,05$, D-SE vs CO-SE, CO-EF.

5.5. Níveis Plasmáticos de 20-HETE e 14,15 EET/DHET

Na figura 12 estão apresentados os níveis plasmáticos dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico (14,15 EET/DHET e 20-HETE). Foram encontrados quatros *outliers* nos ácidos 14,15 DHET, apenas excluídos um *outlier* aos grupos CO-SE, CO-EF, D-EF e HL-SE. Não houve *outliers* para os ácidos EET e 20-HETE. Não houve diferença significativa em nenhuma análise (Figura 12).

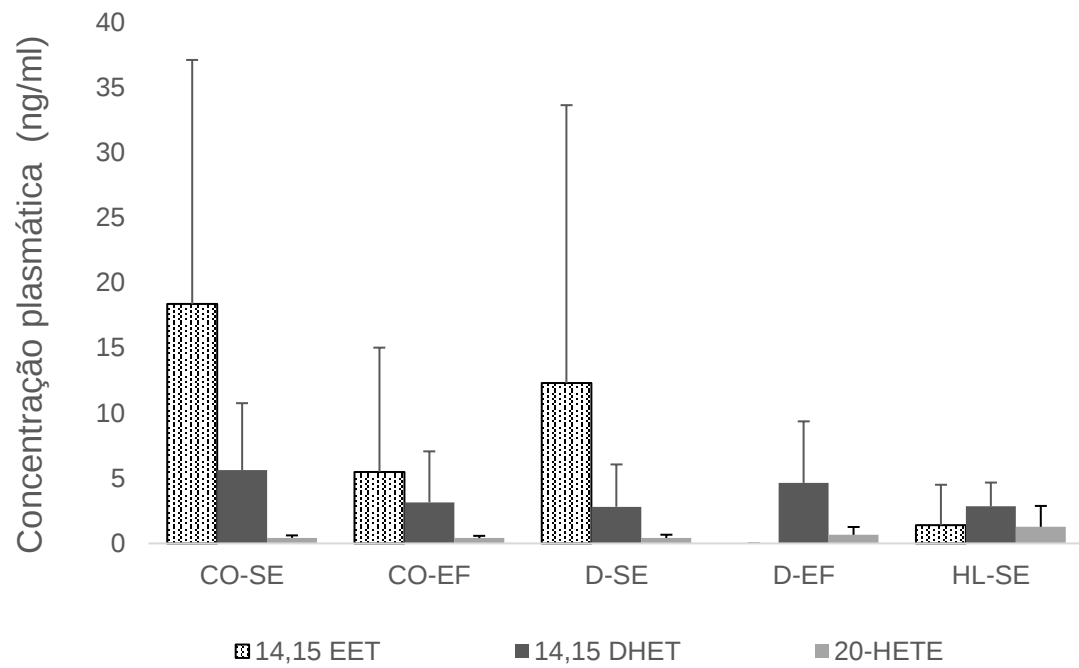


Figura 12. Níveis plasmáticos dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico (14,15 DHET/EET e 20-HETE). CO-SE= controle - sedentário, CO-EF= controle - exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica - sedentário. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5.6. O Efeito do protocolo de indução ao DM2 sobre o tecido renal

Na figura 13 pode-se observar a fotomicrografia renal de acordo com o grupo experimental. Os resultados demonstram que o protocolo não foi eficiente para acarretar lesão e comprometimento dos glomérulos (setas), túbulos renais (estrelas) e cápsula de Bownan (*).

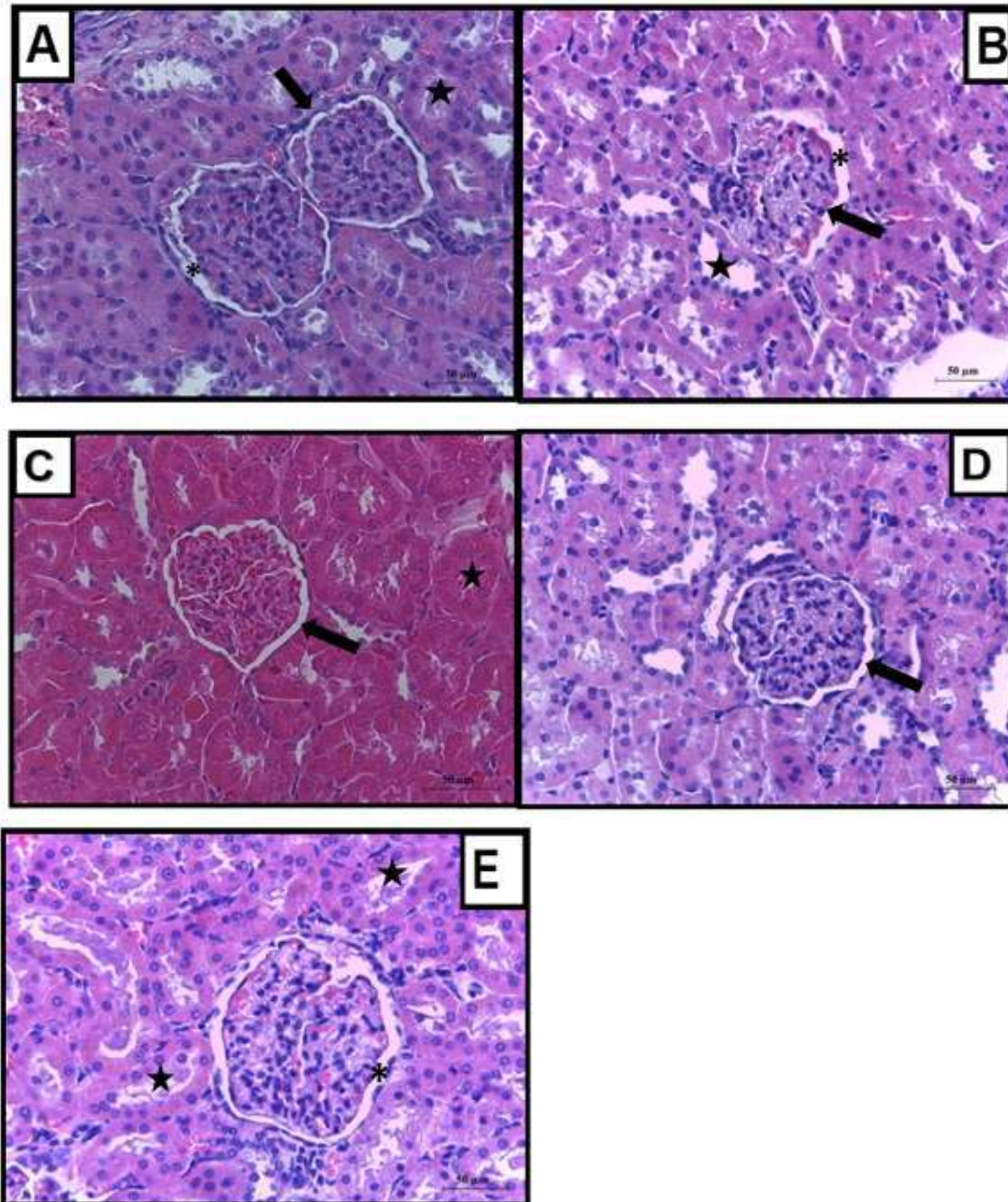


Figura 13. Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos. CO-SE= controle + sedentário (A), CO-EF= controle + exercício físico (B), D-SE= dieta hiperlipídica + estreptozotocina - sedentário (C), D-EF= dieta hiperlipídica + estreptozotocina -exercício físico (D), HL-SE= dieta hiperlipídica + sedentário (E). Nenhuma lesão ou comprometimento nos tecidos foram observados. Os glomérulos são indicados pelas setas, túbulos renais pelas estrelas e cápsula de Bownan (*); Hematoxilina-eosina (Aumento de 40x, barra = 50 μ m.).

5.7. Correlações

Conforme apresentado na tabela 3, as variáveis gordura abdominal e eficiência alimentar total associaram-se com os níveis plasmáticos de TGL, VLDL, HDL e glicemia capilar final no grupo CO-SE. Neste grupo houve também correlações positivas entre o ganho de massa corporal com os níveis plasmáticos de TGL, VLDL, HDL. No grupo CO-EF, a gordura abdominal não se correlacionou com os indicadores bioquímicos, mas o ganho de massa corporal correlacionou-se positivamente com os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e glicemia capilar final. Também houve correlações positivas entre ingestão calórica total e os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e a glicemia capilar final (Tabela 3).

Em relação aos grupos experimentais, no grupo D-SE foram encontradas correlações positivas entre gordura abdominal e os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e glicemia capilar final, entre ingestão calórica total e os níveis plasmáticos de HDL e a glicemia capilar final (Tabela 3), de forma similar aos grupos controle (CO-SE e CO-EF), assim como no grupo D-EF, no qual houve associações positivas entre gordura abdominal e os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e glicemia capilar do meio do experimento. No entanto, foram encontradas associações negativas entre gordura abdominal e glicemia capilar do início do experimento. As variáveis ganho de massa corporal e ingestão calórica total também foram associadas positivamente entre os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e HDL e a glicemia capilar do meio e final do experimento (tabela 3). Por outro lado, no grupo HL-SE foi encontrada apenas associação positiva entre gordura abdominal e o ganho de massa corporal (tabela 3).

Tabela 3. Associações entre as variáveis investigadas. Gordura abdominal (GA), glicemia em jejum, níveis plasmáticos de triglicérides livres (TGL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL), ingestão calórica total (ICT), ganho de massa corporal (GM), eficiência alimentar total (EAT) e glicemia capilar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário.

		Glicemia Jejum	TGL	VLDL	HDL	Glicemia Capilar Início	Glicemia Capilar Meio	Glicemia Capilar Final
CO-SE	GA	0,510	0,773*	0,773*	0,636*	-0,383	0,126	0,761*
	GM	0,244	0,651*	0,651*	0,451	-0,112	-0,176	0,457
	ICT	0,296	0,164	0,164	0,264	-0,178	0,176	0,169
	EAT	0,183	0,861*	0,861*	0,779*	-0,571	0,210	0,669*
CO-EF	GA	-0,508	0,582	0,582	0,566	-0,294	-0,352	0,469
	GM	-0,403	0,609*	0,609*	0,615*	-0,394	-0,160	0,631*
	ICT	-0,572	0,736*	0,736*	0,448	-0,298	0,074	0,758*
	EAT	-0,323	0,441	0,441	0,357	-0,443	-0,003	0,104
D-SE	GA	0,092	0,745*	0,745*	0,248	-0,539	0,750*	0,650
	GM	0,064	0,273	0,273	0,064	-0,406	-0,018	0,243
	ICT	0,578	0,382	0,382	0,636*	-0,351	0,285	0,636*
	EAT	-0,433	0,219	0,219	0,251	-0,267	0,432	0,371
D-EF	GA	0,152	0,661*	0,661*	0,552	-0,607*	0,741*	0,614
	GM	0,046	0,774*	0,774*	0,692*	-0,256	0,571*	0,715*
	ICT	-0,097	0,893*	0,893*	0,832*	-0,382	0,659*	0,674*
	EAT	0,065	0,292	0,292	-0,014	-0,035	0,366	0,301
HL-SE	GA	0,000	0,214	0,214	-0,667	-0,487	0,929*	0,333
	GM	-0,048	0,179	0,179	-0,524	0,126	0,667	0,262
	ICT	0,000	0,179	0,179	-0,048	0,126	0,667	0,262
	EAT	-0,048	-0,143	-0,143	-0,024	0,180	-0,071	0,214

Correlação de Spearman, * p<0,05.

Na tabela 4 estão apresentadas as correlações entre o perfil lipídico e a glicemia em jejum e a capilar de cada grupo. Nos grupos CO-SE, CO-EF e D-EF foram encontradas associações positivas entre os níveis plasmáticos de HDL e a glicemia capilar do final do experimento. No entanto, foram encontradas associações negativas entre HDL e a glicemia capilar do início do experimento no grupo CO-SE, e entre HDL e a glicemia capilar final do experimento no HL-SE. Foram também encontradas correlações positivas entre os níveis plasmáticos de TGL, VLDL e a glicemia capilar final no grupo D-SE. Entre TGL, VLDL e glicemia capilar do meio do experimento para o grupo D-EF (Tabela 4).

Tabela 4. Associações entre as variáveis investigadas. Triglicérides livres (TGL), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL, glicemia em jejum e glicemia capilar nos grupos CO-SE= controle- sedentário, CO-EF= controle- exercício físico, D-SE= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- sedentário, D-EF= dieta hiperlipídica+ estreptozotocina- exercício físico, HL-SE= dieta hiperlipídica- sedentário.

		Glicemia Jejum	Glicemia Capilar Início	Glicemia Capilar Meio	Glicemia Capilar Final
CO-SE	TGL	0,182	-0,506	0,100	0,560
	VLDL	0,182	-0,506	0,100	0,560
	HDL	0,451	-0,697*	0,360	0,733*
CO-EF	TGL	-0,409	-0,342	-0,293	0,473
	VLDL	-0,409	-0,342	-0,293	0,473
	HDL	-0,261	-0,744*	-0,397	0,650*
D-SE	TGL	0,310	-0,638*	0,406	0,745*
	VLDL	0,310	-0,638*	0,406	0,745*
	HDL	0,365	-0,214	0,127	0,382
D-EF	TGL	-0,308	-0,508	0,620*	0,561
	VLDL	-0,308	-0,508	0,620*	0,561
	HDL	-0,285	-0,215	0,392	0,681*
HL-SE	TGL	-0,250	0,580	0,214	0,571
	VLDL	-0,250	0,580	0,214	0,571
	HDL	0,333	-0,018	-0,810*	-0,024

Correlação de Spearman, * p<0,05.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo testamos várias hipóteses. A primeira foi se a dieta hiperlipídica poderia induzir o DM2 sem a administração de streptozotocina (STZ). De acordo com nossos resultados consideramos que nossa hipótese 1 foi corroborada, pois a dieta hiperlipídica causou um efeito metabólico similar ao do grupo induzido pelo protocolo da Mansor et al. (2013) e o que ocorre durante o desenvolvimento do DM2 em humanos.

Conforme esperado, os animais que foram submetidos ao protocolo de indução ao DM2 com dieta hiperlipídica associada à estreptozotocina (STZ) (D-SE e D-EF) apresentaram maior ganho de massa corporal e de gordura abdominal, glicemia em jejum e capilar acima dos parâmetros de normalidade (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017; MANSOR et al., 2013). Não encontramos alterações significativas no perfil lipídico, pois TGL e VLDL foram similares aos grupos controle.

De forma similar aos grupos D-SE e D-EF, os animais sedentários que receberam apenas dieta hiperlipídica (HL-SE) apresentaram as mesmas alterações encontradas nos animais dos grupos induzidos ao DM2, tais como: maior ganho de massa corporal, maior concentração de gordura abdominal, maior glicemia em jejum, em comparação aos grupos controles. Além disso, apresentaram dislipidemia caracterizada pelo aumento da concentração plasmática de triglicerídeos (TGL) e da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), alterações que não foram encontradas nos animais dos grupos D-SE e D-EF.

Nossos resultados nos grupos submetidos aos protocolos de indução ao DM2, com ou sem STZ, estão de acordo com outros estudos que relatam que o sedentarismo quando acompanhado de alta ingestão de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica direciona à anormalidades nos níveis de lipídeos séricos e ao aumento da gordura corporal e consequentemente da deposição de lipídeos em tecidos ectópicos que prejudica a capacidade de ação da insulina (BRØNS; GRUNNET, 2017; MORALES; BUCAREY; ESPINOSA, 2017). Como utilizamos dieta hiperlipídica para a indução do DM2, supomos que a evolução do quadro apresentado esteja associado ao processo de lipotoxicidade (BRØNS; GRUNNET, 2017), no qual o tecido adiposo atinge o limite máximo de expansão e deixa de armazenar os lipídeos de forma eficiente, acarretando no depósito intracelular de lipídeos em tecidos não especializados, e desencadeando defeitos na sinalização da

insulina, capacidade mitocondrial e lesões teciduais (ALWAHSH et al., 2017; ERTUNC; HOTAMISLIGIL, 2016; FU et al., 2009; FUKUSHIMA; LOPASCHUK, 2016; GOODPASTER et al., 2001; GUILHERME et al., 2008).

Nossa hipótese é suportada pela literatura, pois tem sido defendido que o aumento do fluxo de AGL para os tecidos periféricos, como músculo esquelético, eleva a demanda de enzimas envolvidas na síntese de TGL. A enzima diacilglicerol-aciltransferase (DAGT) catalisa o último passo da via monoacilglicerol- diacilglicerol- triacilglicerol e qualquer falha na síntese dos TGL pode promover aumento de diacilglicerol (DAG) intracelular (CHEOL et al., 2007; LIU et al., 2007). Conforme a figura 14, o DAG elevado ativa a proteína-quinase C (PKC) que estimula a fosforilação da serina do IRS-1, tornando-o resistente de ser fosforilado em tirosina, e impedindo a transmissão do sinal de insulina, como resultado a absorção de glicose e a resistência à insulina é instalada (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014; BRØNS; GRUNNET, 2017; DROSATOS, 2016; ERTUNC; HOTAMISLIGIL, 2016; MORALES; BUCAREY; ESPINOSA, 2017; SAMUEL; PETERSEN; SHULMAN, 2010; YU et al., 2002).

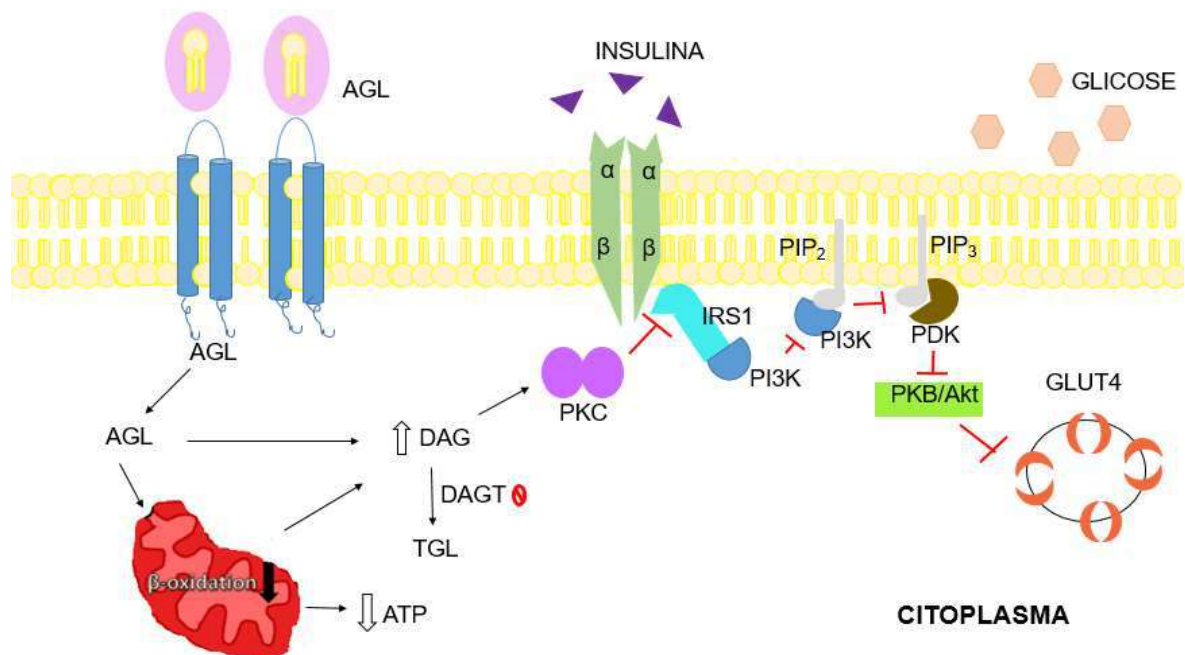


Figura 14: Resistência à insulina - lipotoxicidade. O acúmulo de AGL, acompanhado da baixa capacidade oxidativa e falha na síntese dos TGL promove o excesso de DAG, esta molécula ativa a PKC, que estimula a fosforilação da serina do IRS-1 e impede a transmissão do sinal de insulina. PKC: proteína cinase C; IRS1: substrato do receptor de insulina; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; GLUT4: transportador de glicose tipo 4; TGL: triacilglicerol; DAG: diacilglicerol; DAGT: diacilglicerol aciltransferase; ATP: adenosina trifosfato; AGL: ácidos graxos; α: subunidades alfa do receptor de insulina, β: subunidades beta do receptor de insulina; **T** indica inibição. Adaptado de Chokshi et al. (2012).

Nossa segunda hipótese, de que o aumento da ingestão calórica e da eficiência alimentar (por meio da dieta hiperlipídica), contribuiria para o aumento da gordura corporal e do processo de lipotoxicidade, alteraria as proporções dos eicosanóides não foi evidenciada. Em nossas análises encontramos resultados que demonstraram que a eficiência alimentar foi maior nos grupos D-SE e HL-SE, mas não encontramos diferenças entre os grupos nas proporções dos eicosanóides que pudessem sustentar nossa hipótese inicial.

Em relação ao comportamento alimentar, os hormônios leptina e insulina regulam, a longo prazo, a ingestão alimentar e o gasto energético, promovendo o equilíbrio da massa corporal. Mediante a ingestão de dieta com alto teor de gordura, tem sido descrito que o aumento da concentração plasmática de AGL dificulta o transporte da insulina e leptina pela barreira hematoencefálica o que prejudica o processo de sinalização desses hormônios no núcleo arqueado, resultando em aumento da ingestão calórica e diminuição do gasto energético que resulta em aumento da eficiência alimentar (EL-HASCHIMI et al., 2000; KAIYALA et al., 2000). Ao longo do experimento os animais dos grupos controle mantiveram a ingestão calórica, enquanto, os grupos que consumiram dieta hiperlipídica, tiveram uma redução da ingestão calórica durante o período de experimento. Apesar de não termos detectado aumento da ingestão calórica em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica, a eficiência alimentar foi maior nos grupos D-SE e HL-SE.

Já em relação aos ácidos 14,15 EET/DHET e 20 HETE uma sugestão para não termos encontrado diferenças nas concentrações plasmáticas dos eicosanóides é o curto período experimental do presente estudo, pois no estudo de Liu *et al.*, (2012) foi descrito o aumento na expressão da enzima sEH no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em longo prazo (16 semanas), mas não foi notado esse efeito em um protocolo com período mais curto de oferta de alimentos gordurosos aos animais (8 semanas) (LIU *et al.*, 2012). Não descartamos, contudo, a suposição de que possa ter ocorrido algum erro metodológico durante o processo de extração dos ácidos, pois os valores dentro de um mesmo grupo são muito discrepantes, com elevados desvios padrões, apesar da remoção dos outliers. Apesar do exposto, na média, os valores plasmáticos de 14,15 DHET e 14,15 EET foram similares ao do presente estudos em animais de grupos controles (CAI et al., 2013; CHEN et al., 2015; DAI et al., 2017; GUO et al., 2018).

Estudos com inibidores do gene da enzima sEH em ratos têm fornecido evidências favoráveis para sua influência sobre a homeostase da glicose, seja pelo aumento da secreção de insulina (LUO et al., 2010), na melhora da sensibilidade à insulina (LURIA et al., 2011), ou pela inibição apoptótica de células beta pancreáticas (CHEN et al., 2013).

Nossa investigação do efeito do DM2 e da ingestão de dieta hiperlipídica sobre a integridade morfológica dos rins de ratos Wistar também não retornou resultados que possam sustentar nossa hipótese inicial, pois não detectamos lesões ou comprometimento dos glomérulos e túbulos renais nos grupos. Dissard et al. (2013) investigaram ratos com síndrome metabólica após oito meses de dieta com alto teor de frutose e gordura e constataram lesões renais com hiperfiltração glomerular moderada, juntamente com um aumento na inflamação renal. Similarmente, Jiang et al. (2005) identificaram o acúmulo de lipídeos nos tecidos renais, nos animais que desenvolveram glomeruloesclerose induzida pela obesidade e pela dieta hiperlipídica em dozes semanas experimentais. Dessa forma, supomos que um protocolo mais longo nos permitiria visualizar tais alterações renais.

Adicionalmente, Elmarakby et al. (2011) investigaram a deleção do gene da sEH em ratos com DM induzido por estreptozotocina, e observaram a melhora na função endotelial, na redução da inflamação e na lesão renal decorrentes do diabetes. Por isso, tem recebido muita atenção no progresso da lesão vascular renal (CHEN et al., 2011; KIM et al., 2015). Assim, a inibição da enzima sEH pode ser uma alternativa para o equilíbrio de EETs em indivíduos com diabetes mellitus (HARRIS; HAMMOCK, 2013; ROCHE et al., 2015) e uma alternativa para o tratamento farmacológico para a doença.

Finalmente, em relação ao teste do efeito do exercício físico moderado sobre as alterações metabólicas e sobre os eicosanoides, produtos do ácido araquidônico, causadas pelo DM2 e pela dieta hiperlipídica podemos considerar que o EF foi eficiente somente para aumentar as concentrações de HDL dos animais exercitados em comparação aos sedentários. Apesar de ter sido demonstrado em outros estudos que o exercício físico pode reverter a condição causada pelo pré-diabetes ou melhorar o controle glicêmico e lipídico em pessoas com DM2 (BRADBURY et al., 2017; LU et al., 2016).

Nos animais do grupo D-EF, o exercício físico não reverteu o ganho de massa e o acúmulo de gordura abdominal, e não modificou a ingestão calórica total

(ICT) e a eficiência alimentar total (EAT). Nesse grupo a glicemia de jejum e capilar, após a injeção de STZ, foi significativamente superior quando comparada aos grupos CO-SE e CO-EF, o que pode facilmente ser justificado pela destruição das células beta e redução abrupta da secreção de insulina. A deficiência e/ou ausência da insulina compromete o influxo de glicose para as células e ativa a gliconeogênese hepática. A gliconeogênese hepática como qualquer outra via metabólica é regulada por reguladores alostéricos, regulação hormonal e regulação transcricional, principalmente de enzimas chaves como a fosfoenolpiruvato-carboxicinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (GIRALT et al., 2018). Em indivíduos não diabéticos a gliconeogênese hepática e a lipogênese são vias reguladas reciprocamente, no entanto, no indivíduo diabético ambas as vias metabólicas supracitadas ocorrem simultaneamente, ocasionando hiperglicemia e dislipidemia (BROWN; GOLDSTEIN, 2008).

No grupo D-EF as correlações positivas entre glicemia capilar e ganho de massa corporal (GM) e ICT nos levam a concluir que o exercício físico moderado não teve o efeito esperado sobre o controle glicêmico e no comportamento alimentar, quando associado à ingestão de dieta hiperlipídica. As correlações positivas entre GM e TGL nos permitem inferir que o GM foi principalmente um ganho de gordura e que o exercício físico moderado não foi capaz de reverter, ou seja, a dieta hiperlipídica foi determinante no grupo D-EF. No grupo D-EF foi encontrado uma correlação positiva entre a glicemia capilar versus HDL, o que não era esperado, já que anormalidades nos níveis séricos dos lipídeos, como aumento do TGL, VLDL e LDL e diminuição do HDL são frequentemente associadas ao DM2 (EBARA et al., 2017). A associação inexplicável entre os parâmetros de HDL e a hiperglicemia nos animais do grupo D-EF precisam ser reavaliada com mais cautela.

Por outro lado, nos animais do grupo HL-SE houve uma correlação negativa entre glicemia capilar e HDL, o que mimetiza as condições fisiopatológicas encontrada nos pacientes com DM2 (EBARA et al., 2017; LIN et al., 2018). Estudando a associação inversa de hiperglicemia e HDL em pacientes com DM2, Ebara et al, (2017) observaram que o baixo nível de HDL nesses pacientes está associado a um alto risco de complicações trombóticas e desenvolvimento de placas de aterosclerose. O transporte do HDL é um transporte reverso, essa lipoproteína transporta o excesso de colesterol das paredes dos vasos sanguíneos para o fígado para ser degradado. Segundo Lin et al, (2018) a relação entre TGL/HDL é um

marcador para avaliar resistência à insulina e diabetes, sendo que nos casos supracitados essa relação seria baixa, o que nos permite sugerir assertivamente que apesar de apenas a glicemia de jejum (e não a capilar) dos animais do grupo HL-SE ter sido significativamente maior do que do grupo CO-EF, esses animais apresentaram uma baixa relação TGL/HDL, podendo sim, ser usado com um modelo confiável para o estudo do DM2.

Em contrapartida, quando associado à dieta equilibrada, notamos o efeito benéfico do exercício físico nos animais do grupo controle exercitado (CO-EF). Os animais deste grupo apresentaram maior concentração plasmática de lipoproteína de alta densidade (HDL) quando comparado aos grupos CO-SE e D-SE, esta associação foi similar às do grupo D-EF. Observamos que a ingestão calórica total (ICT) do grupo CO-EF foi maior quando comparada ao grupo D-SE. O aumento da ICT nos animais supracitados provavelmente está associado ao exercício físico e a dieta balanceada que apresentava um valor energético 72% menor que a dieta hiperlipídica. Com relação ao GM e GA nos grupos controle, o exercício físico não influenciou. Assim, os animais do grupo CO-EF não atingiram alterações significativas em termos de composição corporal e glicêmica, consideramos estes animais estão dentro dos parâmetros de normalidade (LIMA et al., 2014).

Como efeito do exercício físico, pode-se obter o aumento do transporte de ácidos graxos para as células musculares, e pela necessidade energética eleva a β -oxidação, como consequência reduz os níveis de TGL e VLDL no plasma (SIGAL et al., 2004; ZHANG et al., 2018). O gasto energético melhora a capacidade oxidativa das mitocôndrias para a geração de energia (WANG; XU, 2017). Tem sido descrito que a prática regular de exercício físico pode promover a vasodilatação, formação de novos vasos sanguíneos e redução da resistência vascular periférica, sendo, portanto, eficiente para o tratamento da hipertensão arterial (IRIGOYEN et al., 2003), importante co-morbidade do DM2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016, 2017).

Adicionalmente, no músculo estriado esquelético resistente à insulina, o exercício físico aumenta a absorção de glicose ao induzir o aumento da expressão da calmodulina-cinase dependente de cálcio (CaMK) e da proteína-cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A contração muscular ativa a CaMK pelo influxo de cálcio disparado pela despolarização da membrana plasmática e pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, como também desencadeia a ativação da

AMPK por meio de alterações no status energético. Estas proteínas estão envolvidas na ativação de moléculas intermediárias da cascata insulínica que permitem a translocação do transportador de glicose isoforma 4 (GLUT4) para a membrana dos miócitos (DOS SANTOS et al., 2015).

No controle da ingestão alimentar, tem sido aventado que o exercício físico moderado pode reduzir a ingestão alimentar, por meio do controle da hiperleptinemia e da hiperinsulinemia que tornam ineficiente a ação desses hormônios na regulação da massa corporal (BENITE-RIBEIRO; SANTOS; DUARTE, 2014). Apesar disso, no presente estudo os animais do grupo dieta hiperlipídica com STZ não apresentaram diferença estatística na ingestão calórica total.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo concluímos que o protocolo para a indução do DM2 sem o uso de estreptozotocina é adequado para simular, em um modelo animal, o desenvolvimento da doença da mesma forma que ocorre em humanos. Sugerimos que um protocolo mais longo, de indução ao DM2, seja eficiente para promover todas as alterações metabólicas, comportamentais (de ingestão calórica), morfológicas e, inclusive, as comorbidades encontradas em indivíduos que tenham DM2 sem controle glicêmico eficiente ao longo dos anos. Não detectamos alterações nas concentrações dos eicosanóides 14,15 EET/DHET e 20 HETE nos animais submetidos aos protocolos de indução ao DM2, provavelmente por causa da curta duração do período experimental. O exercício físico foi eficiente em melhorar o perfil lipídico mesmo nos animais induzidos ao DM2, mas não demonstrou efeito nos demais parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- AHLQVIST, E. et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 6, n. 5, p. 361–369, 2018.
- ALWAHSH, S. et al. Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 285, 2017.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. Supplement 1, p. S11–S24, 2017.
- ANDRICH, D. E. et al. Altered Feeding Behaviors and Adiposity Precede Observable Weight Gain in Young Rats Submitted to a Short-Term High-Fat Diet. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2018, p. 1–10, 2018.
- BENITE-RIBEIRO, S. A.; SANTOS, J. M. DOS; DUARTE, J. A. R. Moderate physical exercise attenuates the alterations of feeding behaviour induced by social stress in female rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, n. 2, p. 142–149, 2014.
- BIELEMANN, R. M. et al. Consumption of ultra-processed foods and their impact on the diet of young adults. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 49–28, 2015.
- BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 1, p. a009191–a009191, 2014.
- BRADBURY, K. E. et al. Association between physical activity and body fat percentage, with adjustment for BMI: a large cross-sectional analysis of UK Biobank. **BMJ Open**, v. 7, n. 3, p. e011843, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: Diabetes Mellitus. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 36, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: Obesidade. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 38, 2014.
- BRØNS, C.; GRUNNET, L. G. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: a causal mechanism or an innocent bystander? **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 2, p. R67–R78, 2017.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 95-6, 2008.
- CAI, Z. et al. CYP2J2 overexpression increases EETs and protects against angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 5, p. 1448–1456, 2013.

CAMPBELL, W. B. et al. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. **Circulation Research**, v. 78, n. 3, p. 415–423, 1996.

CHAPUT, J.-P. et al. Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 5, p. e12–e20, 2011.

CHEN, G. et al. Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 attenuates nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 96, n. 1–4, p. 63–71, 2011.

CHEN, G. et al. CYP2J2 overexpression attenuates nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 308, n. 2, p. E97–E110, 2015.

CHEN, L. et al. Beneficial effects of inhibition of soluble epoxide hydrolase on glucose homeostasis and islet damage in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 42–48, 2013.

CHEOL, S. C. et al. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22678–22688, 2007.

CHOKSHI, A. et al. Ventricular assist device implantation corrects myocardial lipotoxicity, reverses insulin resistance, and normalizes cardiac metabolism in patients with advanced heart failure. **Circulation**, v. 125, n. 23, p. 2844–2853, 2012.

CORNIER, M.-A. et al. The Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 777–822, 2008.

DAI, M. et al. CYP2J2 and Its Metabolites EETs Attenuate Insulin Resistance via Regulating Macrophage Polarization in Adipose Tissue. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 46743, 2017.

DE CASTRO, U. G. M. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 1, p. 136, 2013.

DE TAEYE, B. M. et al. Expression and regulation of soluble epoxide hydrolase in adipose tissue. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 18, n. 3, p. 489–98, 2010.

DISSARD, R. et al. Long Term Metabolic Syndrome Induced by a High Fat High Fructose Diet Leads to Minimal Renal Injury in C57BL/6 Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76703, 2013.

DOS SANTOS, J. M. et al. The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. **Metabolism**, v. 64, n. 12, p. 1619–1628, 2015.

DROSATOS, K. Fatty old hearts: role of cardiac lipotoxicity in age-related cardiomyopathy. **Pathobiology of Aging & Age-related Diseases**, v. 6, n. 1, p. 32221, 2016.

DUVIVIER, B. M. F. M. et al. Minimal Intensity Physical Activity (Standing and Walking) of Longer Duration Improves Insulin Action and Plasma Lipids More than Shorter Periods of Moderate to Vigorous Exercise (Cycling) in Sedentary Subjects When Energy Expenditure Is Comparable. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

EBARA, S. et al. Inverse associations of HDL cholesterol and oxidized HDL with d-dimer in patients with type 2 diabetes mellitus. **Thrombosis Research**, v. 155, p.12-15, 2017.

EL-HASCHIMI, K. et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1827–1832, 2000.

ELMARAKBY, A. A. et al. Deletion of soluble epoxide hydrolase gene improves renal endothelial function and reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced type 1 diabetes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, p. R1307–R1317, 2011.

ERTUNC, M. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 12, p. 2099–2114, 2016.

EVERT, A. B. et al. Nutrition Therapy Recommendations for the Management of Adults With Diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S120–S143, 2014.

FAN, F. et al. Molecular mechanisms and cell signaling of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular pathophysiology. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 21, p. 1427–63, 2016.

FU, J. H. et al. The combination of a high-fat diet and chronic stress aggravates insulin resistance in Wistar male rats. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 117, n. 7, p. 354–360, 2009.

FUKUSHIMA, A.; LOPASCHUK, G. D. Cardiac fatty acid oxidation in heart failure associated with obesity and diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 10, p. 1525–1534, 2016.

GHEIBI, S.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 605–613, 2017.

GIRALT, A. et al. E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes. **Molecular Metabolism**, v. 11, p. 104–112, 2018.

GOODPASTER, B. H. et al. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: Evidence for a paradox in endurance-trained athletes. **Journal of Clinical**

Endocrinology and Metabolism, v. 86, n. 12, p. 5755–5761, 2001.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 367, 2008.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **The Journal of endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1–T23, 2014.

GUO, Y. et al. TPPU enhanced exercise-induced epoxyeicosatrienoic acid concentrations to exert cardioprotection in mice after myocardial infarction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1489–1500, 2018.

HAN, J. M.; LEVINGS, M. K. Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 2, p. 527–532, 2013.

HARRIS, T. R.; HAMMOCK, B. D. Soluble epoxide hydrolase: Gene structure, expression and deletion. **Gene**, v. 526, n. 2, p. 61–74, 2013.

IMIG, J. D. Epoxyeicosatrienoic acids, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, and renal microvascular function. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 2–7, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas, 8th**. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>.

IRIGOYEN, M. C. et al. Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. **Rev Bras Hipertens**, v. 10, n. 2, p. 109–116, 2003.

ISHIZUKA, T. et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 324, n. 1, p. 103–110, 2008.

JIANG, T. et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32317–32325, 2005.

KAIYALA, K. J. et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. **Diabetes**, v. 49, n. 9, p. 1525–1533, 2000.

KIM, J. et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 308, n. 2, p. F131–9, 2015.

KNIGHTS, A. J. et al. Adipokines and insulin action: A sensitive issue. **Adipocyte**, v. 3, n. 2, p. 88–96, 2014.

LAHJIBI, E. et al. Impact of objectively measured sedentary behaviour on changes in insulin resistance and secretion over 3 years in the RISC study: interaction with

weight gain. **Diabetes & metabolism**, v. 39, n. 3, p. 217–25, 2013.

LICHTMAN, S. W. et al. Discrepancy between Self-Reported and Actual Caloric-Intake and Exercise in Obese Subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 27, p. 1893–1898, 1992.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1–9, 2014.

LIMA, F. D. et al. Swimming Training Induces Liver Mitochondrial Adaptations to Oxidative Stress in Rats Submitted to Repeated Exhaustive Swimming Bouts. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

LIN, D. et al. Associations of lipid parameters with insulin resistance and diabetes: A population-based study. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 1423–1429, 2018.

LIU, L. et al. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 6, p. 1679–1689, 2007.

LIU, Y. et al. Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis by Reduced Systemic Inflammatory Status in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39165, 2012.

LU, Y. et al. Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in highfat-diet fed Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, 2016.

LUO, P. et al. Inhibition or deletion of soluble epoxide hydrolase prevents hyperglycemia, promotes insulin secretion, and reduces islet apoptosis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 430–8, 2010.

LURIA, A. et al. Soluble epoxide hydrolase deficiency alters pancreatic islet size and improves glucose homeostasis in a model of insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. 9038–9043, 2011.

MANSOR, L. S. et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. **Cardiovascular diabetology**, v. 12, n. 1, p. 136, 2013.

MOHD-RADZMAN, N. H. et al. Potential Roles of Stevia rebaudiana Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 718049, 2013.

MORALES, P. E.; BUCAREY, J. L.; ESPINOSA, A. Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6°.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NODE, K. Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. **Science**, v. 285, n. 5431, p. 1276–1279, 1999.

OLIVEIRA, L. M. DE et al. Morfometria do compartimento intertubular dos testículos de roedores silvestres *Necomys lasiurus* e *Rhipidomys macrurus* (Cricetidae: Sigmodontinae) capturados em área de cerrado do sudoeste de Goiás. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 2319, 2015.

PASQUALOTTO, K. R.; ALBERTON, D.; FRIGERI, H. R. Diabetes mellitus e Complicações. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 134–145, 2012.

PIVACKOVA, L. et al. Endothelial dysfunction in animal models of glucose intolerance and diabetes is accompanied by different expression of key enzymes of epoxyeicosatrienoic acids pathway. **Journal of hypertension**, v. 33 Suppl 1, p. e83-2015.

QUARTI MACHADO ROSA, M. et al. Disease and Economic Burden of Hospitalizations Attributable to Diabetes Mellitus and Its Complications: A Nationwide Study in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 2, p. 294, 2018.

ROCHE, C. et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 9, p. H1020–H1029, 2015.

RUAN, H. et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : Implications for insulin resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3176–3188, 2002.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **The Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2267–2277, 2010.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 12–22, 2016.

SARDINHA, L. B. et al. Sedentary Patterns, Physical Activity, and Cardiorespiratory Fitness in Association to Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. APR, 2017.

SATOH, T. Molecular Mechanisms for the Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Uptake by Small Guanosine Triphosphatases in Skeletal Muscle and Adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18677–18692, 2014.

SAVAS, Ü. et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (HETE)-dependent Hypertension in Human Cytochrome P450 (CYP) 4A11 Transgenic Mice. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 291, n. 32, p. 16904–16919, 2016.

SIGAL, R. J. et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.10, p. 2518-39, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2015–2016. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, n. 6, p. 1–348, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018. **Diabetes Mellitus Tipo 1 E Tipo2**, p. 1 -383, 2017.

SPECTOR, A. A.; NORRIS, A. W. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 3, p. C996-1012, 2007.

WANG, M. H. et al. Downregulation of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats with diet-induced hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 4 I, p. 594–599, 2003.

WANG, Y.; XU, D. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 132, 2017.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J Biol.Chem.**, n. 0021–9258 JC–HIV, 2002.

ZHA, W. et al. Functional characterization of cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids in adipogenesis and obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 10, p. 2124–2136, 2014.

ZHANG, Q. et al. Treatment of Diabetic Mice with a Combination of Ketogenic Diet and Aerobic Exercise via Modulations of PPARs Gene Programs. **PPAR Research**, v. 2018, p. 1–13, 2018.

ANEXOS

Anexo I. Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 07 de março de 2016.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PEDIDO DE EMENDA DO PROTOCOLO Nº. 034/14

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** “O Efeito do Exercício nas Alterações Epigenéticas do PGC1 – O Impacto no Diabetes Mellitus Tipo 2”
2. **Pesquisador Responsável:** Sandra Aparecida Benite Ribeiro- Coordenação, elaboração do projeto, coleta e análise dos dados- Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Campus Jatobá.
3. **Unidade/Órgão do pesquisador: Pesquisadores Participantes:**
Dra. Júlia Matzenbacher dos Santos - Elaboração do projeto, coleta e análise dos dados
Dr. Marcos Lázaro Moreli - Análise dos dados
Guilherme Pinheiro Santos - Coleta e análise dos dados
4. **Unidade onde será realizado:** Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Campus Jatobá.
5. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 06/06/2014
6. **Data da apresentação do Pedido de Emenda:** 15/02/2016
7. **Justificativa da Ementa:** Prorrogação do prazo por motivo de atraso na liberação de verba para a pesquisa pela FAPEG. Os experimentos com animais já foram executados, mas as dosagens bioquímicas não foram realizadas por falta de verba.

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **APROVOU**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Substantiado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em **outubro de 2018**.

III - Data da reunião: 7/03/2016

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Anexo II. Projeto de pesquisa cadastrado no sistema da UFG.

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas Emitido em 22/07/2018 15:33			 CERCOMP Centro de Recursos Computacionais
Projeto de Pesquisa			
Dados do Projeto Pesquisa			
Código:	PI02748-2014		
Título do Projeto:	O Efeito do Exercício nas Alterações Epigenéticas do PGC1 O Impacto no Diabetes Mellitus Tipo 2		
Tipo do Projeto:	COM Financiamento (Projeto Novo)		
Categoria do Projeto:	Pesquisa Científica		
Situação do Projeto:	EM ANDAMENTO		
Unidade:	COORDENACAO DE GRADUACAO JATAI (11.04.10)		
Centro:			
Palavra-Chave:	Epigenética; Diabetes Mellitus		
E-mail:	sandrabeneite@gmail.com		
Período do Projeto:	06/06/2014 a 31/10/2018		
Áreas de Conhecimento, Grupo e Linha de Pesquisa			
Áreas de Conhecimento:			
Ciências Biológicas - Fisiologia - Fisiologia Geral (Área de Avaliação)			
Grupo de Pesquisa:	Linha de Pesquisa:	Morfofisiologia, Clínica e Cirurgia animal	
Possui Cooperação Internacional:	Não		
Resumo			
A prevalência mundial de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) aumentou consideravelmente nas últimas décadas. O acúmulo intramuscular de metabólitos dos ácidos graxos tem sido gradualmente apontado como fator central de uma condição denominada de lipotoxicidade que induz a resistência à insulina. A homeostase das mitocôndrias é rigidamente controlada por uma via de sinalização que consiste de proteínas que são transcritas no núcleo e transportadas para a mitocôndria. O receptor é ativado por proliferadores de peroxissoma ativado por receptor coativador gama-17 (PGC1) que é importante regulador desse processo nas mitocôndrias. No músculo esquelético resistente à insulina, o PGC1 é regulado para baixo, resultando em modificação pós-tradução de histonas anormais e modificações epigenéticas. Além disso, têm sido demonstrados os benefícios do exercício físico regular na melhoria da sensibilidade à insulina, no entanto, o mecanismo para este efeito não está inteiramente identificado. Portanto, o presente projeto tem como objetivo verificar o efeito do exercício aeróbico sobre a modificação epigenética do PGC1 e sobre a função mitocondrial em animais diabéticos tipo 2. Ratos Wistar serão induzidos ao DM2 pela combinação de uma pequena dose de estreptozotocina (STZ) e de dieta com alto teor de gordura (High Fat Chow® - Jackson Laboratory, Sacramento, contendo 5.3 kcal/g, compreendendo 60% das calorias em gordura, 35% de proteína e 5% de carboidrato). Ratos com idades similares, não diabéticos, recebendo ração equilibrada serão identificados como controle. Após isso, os animais de ambos os grupos serão divididos em duas condições: com ou sem exercício físico. Espera-se que o diabetes induza a biogênese subnormal das mitocôndrias e o exercício atenuar os efeitos do DM2.			
Introdução/Justificativa			
(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da UFG em geral)			
O diabetes mellitus (DM) é uma desordem complexa que constitui um grande problema de saúde pública. Dados epidemiológicos demonstram que a prevalência de diabetes entre os adultos era de 285 milhões em 2010, e este valor está previsto para chegar 439 milhões em 2030 (Shaw et al. 2010; Chan et al. 2010). O Brasil é o 10º país com maior prevalência de DM no mundo, com 7,6% da população. A incidência de mortalidade global atribuída ao DM em 2000 foi de 2,9 milhões de mortes, enquanto no Brasil o DM é a quinta causa de morte, afetando 2,5% da população. (American Diabetes Association 2012; Viana et al. 2013). Além disso, o DM é responsável por 44% das complicações renais, 60% das amputações não traumáticas de membros inferiores e a retinopatia diabética é a principal causa de cegueira no adulto em idade ativa. (2012 Fang et al.; Santos et al. 2008; Santos et al. 2011). O DM tipo 2 (DM2) é responsável por pelo menos 90-95 % dos casos. Está associado à mudanças no estilo de vida (dietas de alta energia com atividade física reduzida), aumento do sobrepeso e da obesidade (American Diabetes Association 2012; Viana et al. 2013; Santos et al. 2008). O DM2 é caracterizado por hiperglicemia e alterações do metabolismo lipídico resultante pela incapacidade das células β pancreáticas de secretar insulina e/ou por defeito da ação adequada da insulina. Os principais fatores de risco são o excesso de massa corporal, o sedentarismo, o envelhecimento e os fatores genéticos (American Diabetes Association 2012; Santos et al. 2012). Os miócitos e os adipócitos são os principais locais nos quais a insulina age para induzir a absorção de glicose por meio da ativação e da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular. O GLUT4 no seu estado de repouso, está localizado em vesículas intracelulares, no citosol, para se translocar para a membrana celular é necessária a ativação de uma complexa cascata intracelular (Karylowski et al. 2004; Santos et al. 2008). Qualquer interrupção nesta via afeta o transporte de glicose para o citosol (Moller et al. 2001). No entanto, para além de outros fatores como a insulina, a contração muscular e agentes farmacológicos também podem ativar o GLUT4 promovendo sua translocação para a membrana no músculo esquelético (Jessen et al. 2005; Mu et al. 2001; Musi et al. 2001). Além disso, vários estudos demonstram que o exercício físico agudo aumenta a absorção de glicose no músculo esquelético e que a atividade física regular melhora a capacidade da insulina em estimular os transportadores de glicose em repouso (Hayashi et al. 1997; Jessen et al. 2005; Leng et al. 2004; Santos et al. 2008; Santos et al. 2012). Apesar das pesquisas sobre o apresentado, o mecanismo exato responsável para a resistência à insulina e a melhoria da resposta à insulina induzida pelo exercício ainda não estão totalmente identificados.			
Objetivos			
O objetivo geral do presente projeto é verificar o efeito do exercício aeróbico sobre a modificação epigenética do PGC1 e seu papel sobre a disfunção mitocondrial e o desenvolvimento de resistência à insulina. Para atingir o objetivo geral do projeto, o DM2 será induzido em ratos Wistar pela combinação de agente farmacológico que destrói parte de células pancreáticas associado a uma dieta rica em gordura. Após o desenvolvimento da resistência à insulina nos animais, estes irão realizar exercícios aeróbicos durante 6 semanas. No final, as modificações epigenéticas experimentais no gene PGC1, a disfunção mitocondrial e a sensibilidade à insulina serão avaliadas. Objetivo específico 1: Determinar o efeito da dieta rica em gordura e a redução da secreção de insulina na modificação das histonas no gene PGC1 e a ligação com seus reguladores. De acordo com estudos anteriores a combinação de dieta rica em gordura com uma dose baixa de estreptozotocina induz o acúmulo de metabólitos lipídicos e a resistência à insulina, características da diabetes tipo 2. Para confirmar a eficácia do protocolo da indução do DM2, a concentração de glicose será avaliada após a indução e no final do protocolo experimental, a resistência à insulina será medida pelo HOMA. Como mencionado acima a modificação pós-translacional de histona desempenha um papel na expressão de			

genes, e as HDACs parece ser aumento do músculo esquelético de resistência à insulina. Portanto, a acetilação das histonas (AcH3K9) e a metilação (H3K9 - 3me) em promotor de PGC1 serão avaliados no músculo esquelético pela imunoprecipitação da cromatina (chip). Além disso, pretendemos verificar se tal modificação epigenética induzida pelo aumento de metabólitos de lipídios intramusculares afeta a ligação do fator de transcrição MEF2 na região promotora de PGC1 e isso também será medido pela técnica de chip. A expressão gênica e proteica de PGC1 será avaliada por RTPCR e por técnicas de Western blot.

Objetivo específico 2: Quantificar o efeito da metodologia de resistência à insulina sobre a função mitocondrial e a concentração de GLUT4. A função mitocondrial e a concentração GLUT4 desempenham importante papel na resistência à insulina no músculo esquelético, e ambos parecem ser regulados por PGC1 como discutido anteriormente. No presente projeto, será verificada se a modificação epigenética em PGC1 afeta a homeostase das mitocôndrias, a biogênese e a expressão da concentração de GLUT4 no músculo esquelético. Para avaliar a homeostase das mitocôndrias, uma enzima do ciclo do ácido cítrico (Krebs), a citrato sintase, será quantificada por ELISA, e a relação entre a proteína das mitocôndrias com uma proteína citosólica será avaliada (CoxIV: 8#946; actina) por western blot, sendo utilizada para calcular a concentração de mitocôndrias. Além das proteínas que medeiam a mitocôndria, a biogênese de GLUT4, NRF1 e TFAM serão quantificados por RTPCR e pela técnica de western blot.

Objetivo específico 3: Verificar o efeito do exercício aeróbico sobre a resistência à insulina, a modificação epigenética do PGC1 na homeostase das mitocôndrias e na concentração de GLUT4 no músculo esquelético de animais resistentes à insulina. O exercício aeróbico parece atenuar a resistência à insulina, aumentando a concentração de mitocôndrias e de GLUT4 via atividade PGC1. Vamos verificar no músculo esquelético se o efeito do exercício aeróbico sobre PGC1 é devida as modificações na cromatina. Portanto, depois de 6 semanas de natação forçada, modificações nas histonas, como Ac - H3K9 e H3K9 - 3me, e a ligação de MEF2 e PGC serão medidas na área do promotor do gene responsável pela transcrição de PGC1 no músculo esquelético. A conexão entre as modificações epigenéticas induzidas pelo exercício em animais resistentes à insulina, homeostase das mitocôndrias e concentração GLUT4 também serão quantificadas por métodos mencionados nos objetivos anteriormente.

Metodologia

Neste experimento serão utilizados ratos Wistar com 8 semanas de idade, obtidos a partir do Biotério Central da UFG. Os animais serão mantidos na sala de experimentação da Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, localizado na fazenda experimental em ciclo circadiano invertido 12h

luz/escuro, temperatura ambiental de 21°C±1. Os animais serão mantidos em pares em gaiolas de polipropileno natural, autoclavável com dimensões de 41x34x168mm, com maravalha no fundo (devidamente higienizadas) bebedouro e tampa de aço inox. Durante a fase experimental os animais receberão ração especial normal (20% kcal proteína, 70% kcal carboidrato e 10% kcal gordura) e hiperlipídica (20% kcal proteína, 20% kcal carboidrato e 60% gordura) comercializada pela empresa Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ) ad libitum. Esta ração é desenvolvida especialmente para indução de obesidade e diabetes tipo 2. O fornecimento de água será ad libitum em bebedouros próprios. O protocolo experimental prevê a formação de 8 Grupos com 5 animais/grupo, num total de 40 animais. No protocolo experimental prevê-se a utilização de 5 animais em cada grupo porque é o número mínimo necessário para as análises estatísticas. De acordo com nossas pesquisas anteriores publicadas em importantes periódicos da área usando metodologia similar, grupos com N de 6 (Benite-Ribeiro et al. 2014 e Santos et al. 2012) e N de 10 (Santos et al. 2013 e Santos et al. 2014) foram suficientes para que parâmetros alcançassem a significância estatística. Entretanto, como no processo de indução ao diabetes nem todos os animais têm aumento da glicemia, solicitamos a inclusão de mais 40 animais (num total de 80 ratos) para serem solicitados ao Biotério Central, caso o protocolo não seja bem sucedido. Em nossa experiência com indução do diabetes tipo 1, não temos tido morte de animais por causa do procedimento de indução, pois utilizamos o STZ imediatamente ao preparar a solução e assim não temos observado casos de convulsões e morte durante este procedimento.

Para induzir o diabetes mellitus, os ratos (n = 20) serão alimentados com uma dieta rica em gordura durante três semanas com ração própria hiperlipídica (20% kcal proteína, 20% kcal carboidrato e 60% gordura) comercializada pela empresa Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ), contendo 5,3 kcal/g, das quais 60% das calorias são gordura, 35% de proteínas e 5 % de carboidratos. No 13º dia, os ratos serão mantidos em jejum por 12 horas e no dia seguinte será dada uma única injeção intraperitoneal com baixa dosagem de estreptozotocina (Sigma Aldrich) (STZ em tampão de citrato, pH 4 - 25mg/kg de peso corporal do animal). Em seguida, a dieta rica em gordura será oferecida durante todo o período experimental (este grupo de animais será denominado como HF). Animais com idades similares animais (n = 20) serão utilizados como controle, os animais receberão ração balanceada para ratos e receberão no 13º dia injeção de tampão de citrato (este grupo de animais será denominado como CO). No final da terceira semana, será coletado sangue para mensuração da glicemia. Animais com glicemia maior do que 11,1 mmol/L (200 mg/dl) serão considerados diabéticos (Wang et al. 2013). Esta metodologia de indução de DM2 foi validado por Mansor et al. (2013). Os animais serão pesados a cada semana e a ingestão de alimentos será medida duas vezes por semana. Para minimizar o sofrimento do animal e o aparecimento de efeitos secundários da diabetes, como nefropatia, neuropatia e retinopatia, a glicemia será monitorada duas vezes por semana com o uso de um glicosímetro (one touch Johnson & Johnson ®) e caso o animal apresente valor superior a 400mg/dl uma dose única de 2U de insulina será aplicada como

realizado por nosso grupo e por outros pesquisadores. Caso o animal apresente valores de glicemia superiores a 400mg/dl durante um período superior a uma semana, será sacrificado (anestesiado seguindo o protocolo de associação de Cetamina +Xilazina (80mg de Cetamina + 15mg de Xilazina /kg de massa corporal).

No final da terceira semana, animais dos grupos CO e HF, serão sub-divididos em dois grupos, um sedentário e outro submetido ao exercício formando os seguintes grupos: controle + sedentário (CO-SE); elevado teor de gordura na dieta + sedentário (HF-SE). Controle + exercício físico (CO-EF) e dieta rica em gorduras + exercício físico (HF- EF). Os animais do grupo de exercício serão submetidos a um protocolo de natação durante 6 semanas, com 3 sessões por semana de 60 minutos por dia. O tanque que vai ser utilizado no presente estudo irá medir 80 cm de comprimento, 50 cm de largura e 90 cm de profundidade. O treinamento de natação será sempre realizado entre 12h e 14 h. O treinamento começará com uma sobrecarga de 5% da massa corporal do rato preso à cauda. Para melhorar a resistência do treino, a sobrecarga será aumentada em 1% a cada duas semanas. O grupo de controle será colocado num tanque similar com água superficial (5 cm) durante 30 minutos, 5 dias por semana sem a sobrecarga nem a necessidade de natação dos ratos para se manterem na superfície, adaptado de Lima et al. (2013). Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais serão anestesiados com cetamina+Xilazina (80mg de cetamina + 15mg de xilazina /kg de massa corporal), sacrificados por exanguinação e o sangue e o músculo gastrocnêmio serão coletados. As carcaças dos animais mortos serão mantidos em congelador específico situado no Laboratório de Anatomia Animal UFG/Jataí e em seguida entregues ao descarte realizado pela prefeitura municipal.

Resultados Esperados

Os resultados do presente projeto contribuirão para o desenvolvimento de campos importantes na ciência, tais como, diabetes mellitus, modificação epigenética e fisiologia do exercício. Entender o papel da modificação epigenética em certas doenças é um desafio para comunidade científica, uma vez que não é clara a forma como o o ambiente afeta a funcionalidade das células e quais as modificações epigenéticas resultam na resistência à insulina e no desenvolvimento de DM2. Acreditamos que o presente projeto também irá elucidar questões relativas à modificação epigenética induzidas pelo exercício. Além disso, o fato de que nós associaremos os resultados de animais com os de humanos fará com que os nossos resultados sejam ainda mais relevantes, porque pode abrir portas para futuros estudos clínicos importantes neste campo

Referências

CZUBRYT MP, MCANALLY J, FISHMAN GI, OLSON EN. REGULATION OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA COACTIVATOR 1 ALPHA (PGC-1 ALPHA) AND MITOCHONDRIAL FUNCTION BY MEF2 AND HDAC5. PROC NATL ACAD SCI U S A. 2003 FEB 18;100(4):1711-6.

EVANS MG, SCARPULLA RC. INTERACTION OF NUCLEAR FACTORS WITH MULTIPLE SITES IN THE SOMATIC CYTOCHROME C PROMOTER. CHARACTERIZATION OF UPSTREAM NRF-1, ATF, AND INTRON SP1 RECOGNITION SEQUENCES. J BIOL CHEM. 1989 AUG 25;264(24):14361-8.

GUILHERME A, VIRBASIJUS JV, PURI V, CZECH MP. ADIPOCYTE DYSFUNCTIONS LINKING OBESITY TO INSULIN RESISTANCE AND TYPE 2 DIABETES. NAT REV MOL CELL BIOL. 2008 MAY;9(5):367-77.

LENG Y, STEILER TL, ZIERATH RJ. EFFECTS OF INSULIN, CONTRACTION, AND PHORBOL ESTERS ON MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE SIGNALING IN SKELETAL MUSCLE FROM LEAN AND OB/OB MICE. *DIABETES* 2004; 53: 1436-1444.

LIMA FD, STAMM DN, DELLA-PACE ID, DOBRACHINSKI F, DE CARVALHO NR, ROYES LF, SOARES FA, ROCHA JB, GONZÁLEZ-GALLEGO J, BRESCIANI G. SWIMMING TRAINING INDUCES LIVER MITOCHONDRIAL ADAPTATIONS TO OXIDATIVE STRESS IN RATS SUBMITTED TO REPEATED EXHAUSTIVE SWIMMING BOUTS. *PLOS ONE*. 2013;8(2):E55668.

MOOTHA VK, LINDGREN CM, ERIKSSON KF, SUBRAMANIAN A, SIHAG S, LEHAR J, PUIGSERVER P, CARLSSON E, RIDDERSTRÅLE M, LAURILA E, HOUSTIS N, DALY MJ, PATTERSON N, MESIROV JP, GOLUB TR, TAMAYO P, SPIEGELMAN B, LANDER ES, HIRSCHHORN JN, ALTSHULER D, GROOP LC. PGC-1 α -RESPONSIVE GENES INVOLVED IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION ARE COORDINATELY DOWNREGULATED IN HUMAN DIABETES. *NAT GENET*. 2003 JUL;34(3):267-73.

PIANTADOSI CA, SULIMAN HB. MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION FACTOR A INDUCTION BY REDOX ACTIVATION OF NUCLEAR RESPIRATORY FACTOR 1. *J BIOL CHEM*. 2006;281:324333.

RIEUSSET J. MITOCHONDRIA AND ENDOPLASMIC RETICULUM: MITOCHONDRIA/ENDOPLASMIC RETICULUM INTERPLAY IN TYPE 2 DIABETES PATHOPHYSIOLOGY. *INT J BIOCHEM CELL BIOL*. 2011 SEP;43(9):1257-62.

RINGHOLM S, OLESEN J, PEDERSEN JT, BRANDT CT, HALLING JF, HELLSTEN Y, PRATS C, PILEGAARD H. EFFECT OF LIFELONG RESPIRATORY SUPPLEMENTATION AND EXERCISE TRAINING ON SKELETAL MUSCLE OXIDATIVE CAPACITY IN AGING MICE: IMPACT OF PGC-1 α . *EXP GERONTOL*. 2013 NOV;48(11):1311-8.

RYTINKI MM, PALVIMO JJ. SUMOYLATION ATTENUATES THE FUNCTION OF PGC-1 α . *J BIOL CHEM*. 2009 SEP 18;284(38):26184-93.

SCARPULLA RC. TRANSCRIPTIONAL PARADIGMS IN MAMMALIAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND FUNCTION. *PHYSIOL REV*. 2008 APR;88(2):611-38.

SCARPULLA SC. METABOLIC CONTROL OF MITOCHONDRIAL BIOGENESIS THROUGH THE PGC-1 FAMILY REGULATORY NETWORK. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA*. 2011 JUL;1813(7):1269-78.

YAN J, FENG Z, LIU J, SHEN W, WANG Y, WERTZ K, WEBER P, LONG J, LIU J. ENHANCED AUTOPHAGY PLAYS A CARDINAL ROLE IN MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN TYPE 2 DIABETIC GOTO-KAKIZAKI (GK) RATS: AMELIORATING EFFECTS OF (-)-EPIGALLATECHIN-3-GALLATE. *J NUTR BIOCHEM*. 2012 JUL;23(7):716-24.

Financiamentos

Entidade Financiadora	Natureza do Financiamento	Valor Financiado	Data Inicio	Data Fim
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ	Auxílio Financeiro	R\$ 20.000,00		

Membros do Projeto

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Tipo de Participação
127.328.868-82	SANDRA APARECIDA BENITE RIBEIRO	DOCENTE	30	Coordenador
004.771.431-05	VALKÍRIA ALVES DE LIMA RODRIGUES	DISCENTE	12	Colaborador
000.000.000-00	JÚLIA MATZENBACHER DOS SANTOS	EXTERNO	10	Colaborador
050.462.268-85	DENISE SILVA DE OLIVEIRA	DOCENTE	20	Colaborador
186.447.078-09	MARCOS LAZARO MORELI	DOCENTE	20	Colaborador
050.253.631-44	KAMILA LAUANY LUCAS LIMA	DISCENTE	12	Colaborador

[illegible]

ANÁLISES DOS RESULTADOS													
PREPARAÇÃO DOS ARTIGOS													
2016													
Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
10. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS DADOS													
20. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS RESULTADOS													
PREPARAÇÃO DOS ARTIGOS													
2017													
Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
10. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS DADOS													
20. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS RESULTADOS													
PREPARAÇÃO DOS ARTIGOS													
2018													
Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out			
10. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS DADOS													
20. PROTOCOLO EXPERIMENTAL													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES BIOQUÍMICAS													
ANÁLISES DOS RESULTADOS													
PREPARAÇÃO DOS ARTIGOS													
Histórico do Projeto													
Data	Situação		Usuário										
18/06/2018	GRAVADO		SANDRA APARECIDA BENITE RIBEIRO / sandrabenite										
19/06/2018	SUBMETIDO		SANDRA APARECIDA BENITE RIBEIRO / sandrabenite										
27/06/2018	EM ANDAMENTO		BRUNA JUNQUEIRA RIBEIRO / brunajr										

Relatório Emitido por: SANDRA APARECIDA BENITE RIBEIRO