

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DA EXPRESSÃO DE
HSP70 ENTRE CAMUNDONGOS C57BL/6J MACHOS E FÊMEAS**

Gisele Bettú Grigolo

PORTO ALEGRE

2018

Gisele Bettú Grigolo

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DA EXPRESSÃO DE
HSP70 ENTRE CAMUNDONGOS C57BL/6J MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Krause

PORTO ALEGRE

2018

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã e à minha sobrinha que, sobretudo, amam uns aos outros e que me ensinaram que tudo o que eu sonhar eu sou capaz de realizar e que me incentivaram em cada empreitada sempre me instruindo a buscar a felicidade.

Agradecimentos

Os processos de construção nesse mundo, seja a construção que for, de um prédio, ou de uma família, ou de conhecimento, não é possível se fazer por um indivíduo único. E podendo contar com um número imensurável de pessoas, é que concluo mais este processo de construção de conhecimento para a ciência e de muito aprendizado para mim.

De forma muito especial trago no coração e agradeço os colegas de laboratório com os quais durante toda a nossa convivência me deram a oportunidade de aprender muito do que eles sabem. O Jerônimo me mostrou que somos capazes de vencer distâncias para alcançarmos o que queremos e ainda trazer bolinhos de queijo pros colegas. O Lucas me mostrou como a organização é uma boa aliada do sucesso. A Marcela me ensinou que se não nos esquecermos da gentileza podemos ganhar destaque no SIC! O Jorge me mostrou que a persistência é uma grande virtude. O Carlinhos foi meu norte e meu bom conselheiro em tantas situações. A Rossana me ensinou o valor de ser autêntica, e a ter muito orgulho da minha profissão. O Everton me mostrou que a perseverança nos faz alcançar sonhos que parecem tão distantes. A Dona Ritinha é a prova de que podemos sempre contar com amigos. A Pati me ensinou a dar a mão a todos os que se apresentam sem olhar a quem, sendo ela a responsável pela possibilidade da minha conclusão!

Sem dúvida os presentes mais maravilhosos que ganhei nesses anos de mestrado foram os amigos que fiz, e eu pude contar com duas pessoas durante todo esse tempo não somente em questões técnicas, mas principalmente em questões emocionais fazendo da Heleninha e da Inesinha duas pessoas tão especiais que se tornaram minhas grandes amigas. Obrigada por terem me ouvido e me aconselhado tantas vezes.

Ao Professor Paulo Ivo, agradeço por ter me mostrado que é possível ser um gênio intelectualmente falando e ainda assim ser uma pessoa amável, gentil.

Se existe sorte na vida, o destino certamente me abençoou com a maior sorte que eu poderia ter tido nessa jornada, a orientação do Professor Maurício. Não somente por ser um orientador atencioso, gentil e sábio, tens minha admiração pela pessoa que és. Obrigada por me receber em tua sala sempre me perguntando como eu estava antes de tudo, e muito obrigada por confiar em mim. E principalmente obrigada por ter um plano B, um C, um D e todos quantos eu precisei na manga. Certamente os alunos que passam

pelas tuas aulas são sortudos também e dizem que os orientandos sempre acabam parecidos com seus orientadores, nesse caso, mais uma vez, sorte a minha!

Ao meu namorado, Everton, eu tenho que agradecer, pois em toda a adversidade que uma mudança de cidade e um mestrado pode trazer tu conseguiste me segurar no colo e não me deixar cair em nenhum momento. Junto contigo eu adotei uma segunda família sem a qual certamente eu também não teria conseguido meus sogros e teus irmãos.

À minha família amada, a quem dediquei esse trabalho, agradeço por ter uma mãe que é o anjo da minha vida e que me orgulho de mim mesma cada vez que percebo que estou mais parecida com ela. Esse trabalho também é teu por tu ter me incentivado a buscar minha felicidade e tudo o que eu quisesse e me ensinado que sou capaz que concluo mais essa etapa hoje. Tenho um pai que me ensinou que as coisas devem ser feitas com amor, com graça e principalmente com bom humor. Ainda tenho que agradecer a minha irmã, pois ser um orgulho pra ti muitas vezes me impulsionou para dar continuidade a este trabalho e obrigada principalmente pela Fernanda que eu aprendi a amar como se fosse minha! Aos meus tios, meus avós e meus primos que são parte da minha vida, esse trabalho também é dedicado a vocês, pois vocês são a razão de cada esforço e o motivo de cada decisão tomada!

O presente trabalho foi financiado com recursos do CNPq, incluindo bolsa, e da UFRGS. Agradeço também à própria UFRGS, instituição que me aceitou como aluna e a tantas outras pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a construção deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Os lipídeos da dieta desempenham um importante papel no desenvolvimento da obesidade, e a ingestão excessiva está relacionada com problemas de saúde como o diabetes mellitus do tipo dois (DMT2). A obesidade tem como consequência um estabelecido estado de inflamação crônica de baixo grau, também característico do diabetes, das doenças neurodegenerativas e de doenças cardiovasculares. No entanto, o desenvolvimento da obesidade, inflamação e da resistência à insulina parece ocorrer de forma diferente entre machos e fêmeas mamíferos submetidos a uma dieta rica em lipídeos (*High fat diet*, HFD). As proteínas de choque térmico, mais especificamente as da família de 70 kDa (HSP70), são reguladoras-chaves da inflamação (anti-inflamatória) e da sensibilidade à insulina. Recentemente, foram reportadas na literatura diversas diferenças na expressão dessas proteínas, tendo as mesmas sido mostradas em machos e fêmeas em diferentes tecidos.

Objetivos: Esse trabalho teve como objetivos investigar e comparar os efeitos crônicos da HFD sobre a sensibilidade à insulina, estresse oxidativo, metabolismo e expressão de HSP70 entre camundongos C57BL/6J machos e fêmeas.

Metodologia: Quarenta camundongos C57BL/6J machos e fêmeas foram alimentados com HFD (ou dieta padrão) por 16 semanas sendo os grupos divididos em 1) Machos em dieta padrão (MP); 2) Machos em dieta hiperlipídica (MHFD); 3) Fêmeas em dieta padrão (FP) e 4) Fêmeas em dieta hiperlipídica (FHFD). Os parâmetros avaliados foram: consumo de ração e de peso dos animais semanalmente; teste oral de tolerância à glicose (OGTT), a cada 4 semanas de tratamento; colesterol total, triglicérides e glicemia de jejum. No fígado foi avaliado TBARS, e a expressão da HSP70 em músculo esquelético (gastrocnêmio e sóleo) e fígado dos animais.

Resultados: Conforme esperado, foi encontrado aumento do peso dos animais, e aumento da área sob a curva do OGTT a partir da quarta semana no grupo MHFD. Curiosamente, nas fêmeas do grupo FHFD, as diferenças no OGTT apareceram somente na décima sexta semana. A HFD induziu aumento do colesterol total em todos os animais (♂ e ♀), no entanto, o aumento da glicemia de jejum ocorreu somente no grupo MHFD (em relação ao MP). A expressão de HSP70 aumentou no grupo MHFD em comparação ao grupo MP no sóleo. Além disso, tanto no sóleo quanto no gastrocnêmio, a HSP70 aumentou no grupo MHFD em relação ao grupo FHFD.

Conclusão: As fêmeas parecem estar mais protegidas do que animais machos dos efeitos da HFD no que diz respeito à sensibilidade à insulina e metabolismo, independentemente da expressão reduzida da HSP70 no músculo esquelético nelas encontrada. Apesar de não mensurado, sugerimos que as maiores concentrações de estrogênio possa estar mediando as diferenças encontradas.

Palavras-chave: obesidade, resistência à insulina, machos e fêmeas, HSP70.

ABSTRACT

Introduction: Dietary lipids play an important role in the development of obesity, and overeating is related to health problems such as type 2 diabetes mellitus (DMT2). Obesity results in an established state of chronic low-grade inflammation, also characteristic of diabetes, neurodegenerative diseases and cardiovascular disease. However, the development of obesity, inflammation and insulin resistance appears to occur differently between male and female mammals undergoing a high fat diet (HFD). Heat shock proteins, more specifically those of the 70 kDa family (HSP70), are key regulators of inflammation (anti-inflammatory) and insulin sensitivity. Recently, several differences in the expression of these proteins have been reported between males and females in different tissues. **Objectives:** The objective of this study was to investigate and compare the chronic effects of HFD on insulin sensitivity, oxidative stress, metabolism and HSP70 expression, between male and female C57/BL6J mice. **Methods:** Forty male C57/BL6J mice and were fed HFD (or standard diet) for 16 weeks and the groups were divided into 1) Males on standard diet (MP); 2) Males on a hyperlipidic diet (MHFD); 3) Females on standard diet (PF) and 4) Females in hyperlipidic diet (FHFD). The criteria analyzed were: food intake and weekly weight of animals; oral glucose tolerance test (OGTT), every 4 weeks of treatment; total cholesterol, triglycerides, and fasting glycemia. TBARS was analyzed in liver, and HSP70 was analyzed in skeletal muscle and liver (gastrocnemius and soleus). **Results:** As expected, the weight of the animals was increased in animal in a HFD, and the OGTT area under the curve increased in the MHFD group compare to MP from the fourth week of treatment. Interestingly, in female in the FHFD group, differences in OGTT did not appear before the last month of treatment. Total cholesterol was higher in all HFD animals, despite being males or females. The increase in fasting blood glucose occurred only in MHFD group (relative to MP). HSP70 expression increased in the MHFD group compared to the MP group in the soleus. In addition, HSP70 increased in the MHFD group compared to the FHFD group in the gastrocnemius and the soleus either. **Conclusion:** Females appear to be more protected than HFD males concerning insulin sensitivity and metabolism in a way not dependent on HSP70 expression in skeletal muscle. Although not measured, we suppose that higher concentrations of estrogen may play a role, according to the differences found.

Keywords: obesity, insulin resistance, male e female, HSP70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Comportamento da expressão de HSP72 ao longo da evolução do diabetes do tipo 2 e sua relação com a sensibilidade à insulina.
- Figura 2:** Efeitos da inflamação e da HSP72 intracelular na cascata de sinalização da insulina.
- Figura 3:** Alocação de camundongos machos e fêmeas do estudo
- Figura 4:** Grupos experimentais
- Figura 5:** Desenho experimental e desenvolvimento do estudo
- Figura 6:** Composição da dieta padrão de biotério e da dieta hiperlipídica (HFD)
- Figura 7:** Consumo de ração dos animais durante o período de administração das dietas padrão e HFD
- Figura 8:** Ganho de peso dos machos ao longo da intervenção
- Figura 9:** Ganho de peso das fêmeas ao longo da intervenção
- Figura 10:** Comparação do ganho de peso entre animais machos e fêmeas ao longo da intervenção
- Figura 11:** Comportamento do peso da gordura abdominal total
- Figura 12:** Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 0
- Figura 13:** OGTT da área sobre a curva dos animais na semana 0
- Figura 14:** Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 4
- Figura 15:** OGTT da área sobre a curva dos animais na semana 4
- Figura 16:** Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 8
- Figura 17:** OGTT da área sobre a curva dos animais na semana 8
- Figura 18:** Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 12
- Figura 19:** OGTT da área sobre a curva na semana 12
- Figura 20:** Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 16
- Figura 21:** OGTT da área sobre a curva na semana 16
- Figura 22:** OGTT durante as 16 semanas de tratamento
- Figura 23:** Triglicerídeos plasmáticos
- Figura 24:** Colesterol Plasmático Total
- Figura 25:** Glicemia de Jejum dos animais ao final das 16 semanas de tratamento
- Figura 26:** T-BARS no fígado dos animais
- Figura 27:** Imunodeteção de HSP70 no músculo gastrocnêmio
- Figura 28:** Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo
- Figura 29:** Imunodeteção de HSP70 no fígado dos animais
- Figura 30:** Vias de indução de resistência à insulina em machos e aumento da expressão de HSP induzida por dieta hiperlipídica

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – Proteína quinase B	IL-6 – Interleucina 6
AMPK – proteína quinase ativada por adenosina monofosfato	IL-10 – Interleucina 10
ATP – adenosina trifosfato	IMC – Índice de Massa Corporal
DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo II	IR – <i>Insulin Receptor</i>
E2 – 17 β -Estradiol	JNK – c-Jun quinase N-terminal
ERO - Espécies Reativas do Oxigênio	MHFD – Machos dieta hiperlipídica
ERN – Espécies Reativas do Nitrogênio	MP – Machos Padrão
FHFD – Fêmeas dieta hiperlipídica	NF-κB – <i>Nuclear Factor kappa B</i>
FP – Fêmeas Padrão	NKRF – <i>NF-κB Repressing Factor</i>
HFD – <i>High Fat Diet</i>	OGTT – <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
HFD – <i>High Fat Diet</i>	OMS – Organização Mundial da Saúde
HIF1-α – <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>	PI3K – Fosfossilinositol-3-quinase
HSF-1 – <i>Heat Shock Factor 1</i>	SUS – Sistema Único de Saúde
HSP - <i>Heat Shock Protein</i>	TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
HSP70 – <i>70 kDa Heat Shock Protein</i>	TLR-4 – <i>Toll Like Receptor 4</i>
iHSP70 – <i>intracellular 70 kDa Heat Shock Protein</i>	TNF-α – <i>Transcription Nuclear factor-α</i>
eHSP70 – <i>extracellular 70 kDa Heat Shock Protein</i>	WB – <i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Epidemiologia da obesidade.....	12
1.2 Obesidade e Inflamação.....	13
1.3 Resistência à Insulina.....	15
1.4 HSP e a Resistência à Insulina.....	18
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. HIPÓTESE.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Local de Realização dos Experimentos.....	25
4.2 Considerações Éticas.....	26
4.3 Cálculo do tamanho amostral.....	26
4.4 Animais.....	27
4.5 Desenho Experimental.....	28
4.6 Dieta Hiperlipídica.....	30
4.7 Determinação de peso dos animais e consumo de ração.....	32
4.8 OGTT.....	32
4.9 Coleta dos tecidos.....	33
4.10 Determinação dos Triglicerídeos plasmáticos.....	34
4.11 Determinação do Colesterol Plasmático.....	34
4.12 Determinação de T-BARS.....	35
4.13 Expressão de proteínas pela técnica de Western Blot.....	35
4.14 Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Consumo de ração.....	38
5.2 Peso dos animais e peso da gordura abdominal.....	39
5.3 OGTT.....	43
5.4 Triglicerídeos plasmáticos.....	49
5.5 Colesterol Total.....	50
5.6 Glicose.....	51

5.7 TBARS no fígado.....	52
5.8 Efeito da Dieta Hiperlipídica sobre a expressão de HSP70.....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da obesidade

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) trazem valores alarmantes sobre a obesidade na atualidade, apresentando em 2016 mais de 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso, e destes, mais de 650 milhões obesos. Ainda 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos também apresentam peso elevado para parâmetros considerados saudáveis. Esses números são capazes de prever consequências graves para o indivíduo e para a sociedade que se confirmam quando se avaliam dados relacionados a essas comorbidades associadas à obesidade e quando se avalia os custos dessa epidemia para a economia mundial.

A obesidade pode ser caracterizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), um cálculo genérico e prático usado para avaliar a condição de uma população em relação ao peso delimitando tanto o baixo peso, como sobrepeso e obesidade. Conforme este índice o indivíduo será considerado obeso se a divisão de seu peso pela sua altura elevada ao quadrado for igual ou maior que 30 kg/m^2 . A obesidade é uma condição que resulta de um excedente de energia e é caracterizada também por um aumento do armazenamento de lipídios e expansão do tecido adiposo modificando as funções endócrinas e metabólicas deste tecido tornando-se um fator de risco para diversas outras doenças. (Ursula e Tchoukalova, 2014)

Há grande preocupação acerca desses dados pelas consequências da obesidade em diversos aspectos da vida do indivíduo e na sociedade. Estudos mostram o impacto negativo desta condição na qualidade de vida (Corica et al. 2015), saúde física, saúde mental, com diversos distúrbios psicológicos sendo frequentemente observados em indivíduos obesos (Fontaine e Barofsky, 2001), e funcionalidade social (Wadden et al, 2002). Ainda diversas comorbidades são diretamente associadas com a obesidade como Diabetes Mellitus Tipo II (DMT2), Hipertensão Arterial Sistêmica e Doença Coronariana (Corica, 2014) fazendo da obesidade, inclusive, uma importante causa de discriminação social (Stunkard e Wadden, 1992).

Dessa forma, a obesidade tornou-se uma epidemia mundial com consequências sérias que ultrapassam malefícios ao indivíduo obeso apenas e envolve grande

dispêndio de recursos públicos com gastos que, no Brasil em 2011, por exemplo, chegaram a R\$ 488 milhões ao Sistema Único de Saúde (SUS). Tais fatos fazem com que cada vez mais pesquisadores busquem entender os mecanismos associados às suas causas e consequências.

Interessantemente, no mundo, homens apresentam maior taxa de sobrepeso enquanto entre as mulheres a prevalência de obesidade é maior (WHO, 2016). Sabe-se que são muitos os fatores que contribuem para essa diferença e que tais fatores variam quando se olha localmente uma população em função das condições socioeconômicas e educacionais específicas. Tendo em vista, que há entre homens e mulheres, diferenças hormonais, que controlarão desde gasto e armazenamento energético até a reprodução, tem-se uma possível explicação para tal comportamento da prevalência de sobrepeso e obesidade. (White e Tchoukalova, 2014)

1.2 Obesidade e Inflamação

A obesidade tem como causa um desbalanço energético em que há maior ingestão de nutrientes do que a necessidade para o gasto do indivíduo. O corpo humano, evoluído para uma grande capacidade de economia de energia além da eficiente capacidade de armazenamento energético, irá promover, nessa condição, um aumento do armazenamento de triglicérides e uma consequente hipertrofia do tecido adiposo. Como consequência tem-se um fluxo sanguíneo desequilibrado que será um dos fatores favoráveis a um aumento na produção de fatores inflamatórios e à infiltração de células imunes no tecido adiposo (Trayhurn, 2013) Além disso, como consequência da nutrição excessiva e da falta de exercício, o organismo sofrerá um profundo impacto no metabolismo das células imunes e em sua função (Keane et al, 2015) favorecendo novamente o estabelecimento da condição de inflamação nesse tecido.

As doenças metabólicas decorrentes da obesidade, como DM2 ou Esteatose Hepática, por exemplo, são consequência desta estabelecida inflamação à qual o indivíduo obeso é acometido. Sendo assim essa denominada Inflamação Crônica de Baixo Grau é uma característica comum da obesidade e da Diabetes. (Krause et al, 2012).

Uma das características dos indivíduos obesos são os altos níveis de ácidos graxos circulantes plasmáticos liberados pela expansão do tecido adiposo (Teng et al,

2014). Esses nutrientes promovem a inflamação através de vias de sinalização independentes e dependentes de *Toll-like receptor quatro* (TLR-4), e os efetores incluem moléculas pró-inflamatórias bem conhecidas, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), I κ B, c-Jun quinase N-terminal (JNK) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Teng et al, 2014 e Keane et al, 2017), que são importantes e já bem estabelecidas vias de sinalização celular pró-inflamatórias. Além da liberação de lipídios, a expansão do tecido adiposo também leva à secreção de substâncias ativadoras de inflamação, como TNF- α e IL-6, que podem promover estimulação e invasão de leucócitos, e menor secreção de fatores anti-inflamatórios, como adiponectina e IL-10 (Trayhurn, 2013). À medida que há expansão do tecido adiposo, a conseqüente infiltração de células imunes é exposta a um ambiente hipóxico de redução do fluxo sanguíneo (Trayhurn, 2013 e Johnson et al, 2012), alterando assim o perfil metabólico para uma maior utilização de energia por via glicolítica ao invés da respiração mitocondrial. Isso pode levar e comprometer os leucócitos a um fenótipo pró-inflamatório (M1) e ainda a um aumento da infiltração dessas células imunológicas. (Keane et al, 2015).

A resposta imune é regulada pelo delicado balanço entre células imunológicas em estado anti-inflamatório e aquelas de perfil pró-inflamatório. Curiosamente, perfis metabólicos específicos alinham-se com esses fenótipos pró- e anti-inflamatórios. Por exemplo, células M1 e células T usam glicólise para obtenção de energia, enquanto M2 utilizam respiração mitocondrial. Uma alça de retroalimentação é então estabelecida onde as citocinas secretadas promovem a infiltração de macrófagos adicionais da circulação (Johnson et al, 2012). Estas células imunológicas têm muitos ativadores e respondem a vários tipos de estímulos, incluindo citocinas, adipocinas, endotoxinas, nutrientes e outras células (necróticas e apoptóticas). Entre esses ativadores tem-se o HIF1 α que será um sensor nutricional e bioenergético intracelular projetado para alterar as vias metabólicas e, portanto, a polarização das células imunes. Outros reguladores metabólicos importantes incluem proteína quinase ativada por AMP (AMPK), mTOR e SIRT1 (Keane et al, 2017).

Há certa heterogeneidade no que diz respeito à polarização das células imunológicas dentro do tecido adiposo e de outros tecidos sensíveis à insulina na obesidade (Liu et al, 2012). Durante um evento inflamatório agudo, como uma infecção, a resposta pró-inflamatória rápida desfechada por células imunológicas é sequencialmente seguida por uma resolução de inflamação, onde os leucócitos se convertem em um fenótipo anti-inflamatório, o que é auxiliado por uma mudança no

metabolismo bioenergético celular (Liu et al, 2012). Porém, diferentemente das respostas adaptativas que levam a uma resolução da inflamação, esses leucócitos pró-inflamatórios cronicamente estimulados não se convertem em um fenótipo anti-inflamatório, possivelmente devido ao ambiente nutricional incessante e à contínua sinalização pró-inflamatória da expansão do tecido adiposo. (Keane, 2017).

É por isso que a resposta inflamatória induzida pela obesidade é frequentemente de "baixo grau" em comparação a uma resposta imune à infecção aguda, e isso ocorre, porque as células imunes anti-inflamatórias localizadas dentro do tecido inflamado tentam atenuar a resposta pró-inflamatória das células vizinhas (Liu et al, 2012) fazendo com que a intensidade dessa resposta não atinja os níveis observados em inflamações agudas.

Assim, a transição da pró para a anti-inflamação parece ser um mecanismo metabólico disfuncional chave na obesidade e nas doenças metabólicas consequências dessa condição. Uma compreensão mais clara das mudanças moleculares e metabólicas que polarizam os leucócitos primários em certos fenótipos inflamatórios pode permitir o desenvolvimento de agentes, intervenções e tratamentos capazes de reduzir o estado deletério das células imunes e levar à resolução desejada da inflamação (Keane et al, 2017).

1.3 Resistência à insulina

Tem-se a obesidade e o supra descrito processo Inflamatório Crônico de Baixo Grau como a principal causa do acometimento pela DMT2 em indivíduos obesos. Esse processo ocorre através da persistência da obesidade e das consequências metabólicas dessa condição. A expansão do tecido adiposo aliado aos fatores que estabelecem o perfil pró-inflamatório do tecido promovendo o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias irá contribuir para a resistência à insulina até que se estabeleça a DMT2 no indivíduo (Krause et al, 2015).

A importância do funcionamento normal do organismo quanto à responsividade à insulina dá-se em função de que, uma vez liberada na circulação pelas células β em resposta aos níveis elevados de glicose no sangue, a insulina provoca seus efeitos anabólicos por meio da associação com o receptor transmembrana de insulina (IR) nos tecidos-alvo. A homeostase metabólica de combustíveis no corpo inteiro é rigidamente

regulada pela liberação de insulina das células β pancreáticas, que interage com os tecidos-alvo, como músculo, tecido adiposo e fígado, para remover ativamente o excesso de glicose do sangue. Por outro lado, o glucagon liberado pelas células α pancreáticas mobiliza a glicose desses tecidos durante os períodos de jejum ou aumento do gasto energético em situações de grande demanda como durante o exercício, por exemplo, a fim de manter uma concentração global de glicose no sangue de 4,0 a 6,0 mmol (Newsholme et al, 2016). O comprometimento desses processos metabólicos leva a condições crônicas hiperglicêmicas, dislipidêmicas ou glicolipotóxicas que têm uma influência prejudicial em vários tecidos e órgãos, incluindo ilhotas pancreáticas, músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, levando a condições patológicas como DMT2, acidente vascular cerebral, doença renal e outras manifestações da síndrome metabólica.

Em circunstâncias normais, a interação da insulina com o receptor de insulina (IR) promoverá a conversão de ácidos graxos em triacilgliceróis, usando o glicerol 3-fosfato derivado da glicose como substrato para a esterificação, nos adipócitos. Consequentemente, a insulina induz uma absorção coordenada de ácidos graxos e glicose no tecido adiposo, seguida pela esterificação em triacilglicerol. Obviamente, qualquer desregulação dessas vias levará a níveis excessivos de glicose e ácidos graxos circulantes, o que é observado no DM2 (Zhang et al, 1994). A interação com a insulina induz a autofosforilação do receptor e o recrutamento e fosforilação das proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS) e a ativação das cascatas de sinalização associadas, como por exemplo a via da PI3K e da Akt (White et al, 1988 e White et al, 2003). A Akt é um importante regulador da translocação de vesículas de GLUT-4 para a membrana plasmática, o que é crítico para a captação intracelular de glicose livre em tecidos sensíveis à insulina (Taniguchi, 2006 e Henriksen, 2011).

A resistência à insulina, característica que define o estado de DMT2, refere-se à resposta celular deficiente em resposta a sinalização ativada pelo receptor de insulina em tecidos insulinosensíveis, como o fígado, musculoesquelético, adiposo (Newsholme, 2014) e cérebro (Talbot et al, 2012 e Bomfim et al, 2012). Isso resulta na redução da captação de glicose por esses tecidos, com um aumento concomitante na produção de glicose hepática, levando a concentrações plasmáticas elevadas. A mudança subsequente na homeostase da glicose aumenta a sobrecarga sobre as células β -pancreáticas, que em resposta secretam mais insulina, a fim de restaurar os níveis de carboidratos normais do sangue. (Newsholme, 2015)

Em 1993, a relação entre obesidade e DM2 foi descrita *in vivo*, quando os investigadores demonstraram que os níveis TNF- α em camundongos aumentavam durante o desenvolvimento da obesidade (Hotamisligil, 1993). Quando o TNF- α estava neutralizado, a sensibilidade insulínica era melhorada (Hotamisligil et al, 1993), ligando a inflamação do tecido adiposo à resistência à insulina. O TNF α é um dos principais responsáveis pela resistência insulínica do músculo esquelético e, além disso, também pode induzir a ativação de sinais de estresse nas células pancreáticas, levando à disfunção mitocondrial que culmina na falência celular e morte (Krause, 2011 e Krause, 2015).

Esse perfil pró-inflamatório irá promover a resistência à insulina prejudicando a cascata de resposta à ligação da insulina com seu receptor (Chung et al, 2008 e Verdile et al, 2015). De fato, a expressão excessiva de citocinas pró-inflamatórias e proteínas sinalizadoras, como TNF- α e JNK1, derivadas da expansão adiposa, pode induzir hiperfosforilação da serina de IRS1 (Hotamisligil, 1996 e Stuart, 2014), particularmente no resíduo Ser636. Tal interferência na cascata de sinalização de insulina também ocorre devido a mutações ou modificações estruturais em qualquer um dos nós de sinalização na via de sinalização da insulina. Foram associadas ao desenvolvimento dessa falta de responsividade, mutações e hiperfosforilação associada aos compostos serina dos IRs, e, especulou-se que isso se deve à diminuição da interação com a PI3K (Saini, 2010). Ainda, a modificação estrutural por hiperfosforilação da serina nos resíduos Ser302, Ser307, Ser612 e Ser632 na IRS1 foi sugerida como um importante elemento mecanicista responsável pelo aumento da resistência à insulina em modelos de roedores (Saini, 2010).

As EROs que são produzidas a partir de processos inflamatórios nos tecidos periféricos (por exemplo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo), são capazes de interagir com o IR e suas vias de sinalização. Esse processo é mais uma via pela qual a inflamação irá promover a resistência à insulina já que o resultado é uma falha da célula em responder adequadamente aos níveis de insulina (Newsholme et al, 2014 e Verdile et al, 2015). Este é mais um determinante chave na patogênese do DM2 sendo que o resultado final de uma condição de inflamação e aumento de produção de EROs continuada será a incapacidade das células β pancreáticas de produzir quantidades suficientes de insulina para manutenção da homeostase da glicose (Newsholme, 2016). As EROs aumentam as vias de transdução de sinal que afetam a ativação e a

translocação do NF- κ B para o núcleo (Dai et al, 2000). Assim, os sinais inflamatórios dependentes de NF- κ B são fortemente afetados pelos níveis de EROs e ERNs.

Esse fenótipo resistente à insulina pode ser consequência de um mecanismo direto, que promove diminuição da expressão de IR ou dessensibilização ao ligante de insulina inclusive por um mecanismo que está sob controle de um feedback negativo mediante altas concentrações do hormônio (Foti et al, 2005 e Verdile et al, 2015).

Ligados ao processo de sensibilização do IR estão hormônios secretados na circulação pelo próprio tecido adiposo como leptina e a adiponectina. Em 1994, a leptina mostrou modular o consumo de alimentos e o gasto de energia via sinalização neuroendócrina no hipotálamo (Zhang et al, 1994). Comparativamente, a adiponectina demonstrou promover melhor sensibilidade à insulina, e camundongos com deficiência de adiponectina foram severamente resistentes à insulina (Tateya et al, 2013). Assim, acredita-se que as adipocinas modulem a sensibilidade à insulina nos principais órgãos alvos da insulina.

1.4 HSP e a Resistência à Insulina

Como mecanismo de proteção da célula contra estresses como estresse metabólico ou desbalanço redox, a Resposta de Choque Térmico (HSR, do inglês, *heat shock response*) torna-se um aliado muito importante através da ativação e expressão das Proteínas de Choque Térmico (HSPs). A relação dessas proteínas e da resposta de choque térmico no combate à resistência à insulina tem sido intensamente investigada. Vários estudos foram conduzidos utilizando terapia de calor em animais e modelos in vitro, (Henstridge et al, 2014 e Hooper et al, 2014 e Krause et al, 2015), exercício físico (Gillum et al, 2013) ou utilização de fármacos (Gupte et al, 2009) como as melhores estratégias para indução ativação e da expressão das HSPs, sendo as duas primeiras as mais utilizadas para estudo científico.

Houve nesses modelos melhora na sensibilidade à insulina que foram atribuídas, em parte, ao aumento da expressão da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), cuja expressão intracelular no músculo esquelético estava diminuída na obesidade e diabetes (Rodrigues-Krause et al, 2012), e foi altamente induzida por terapia de calor (Hooper et al, 2014). A expressão reduzida de HSP70 é uma característica comum em diversas condições associadas à inflamação de baixo grau, como DMT2,

envelhecimento e obesidade (Krause et al, 2015 e Rodrigues-Krause et al, 2012 e Krause et al, 2014). Outros estudos, ainda mostraram que, em pacientes com DMT2, a terapia de imersão em água quente melhorou controle glicêmico (Hooper, 1999) e ainda, que essa, apresenta uma correlação inversa entre expressão de RNAm de HSP72 e o grau de diabetes tipo 2 (Kurucz, 2002).

Essas proteínas (HSPs) em condições basais da célula têm uma expressão que corresponde a 1 % da expressão de proteínas total da célula, podendo chegar a até 2 %. Sua principal função é a de chaperona molecular mantendo e reestruturando proteínas que não estão com seu dobramento correto e a função adequada, função esta essencial para a economia de energia do meio celular. De forma muito relevante para este trabalho, elas ainda exercem um papel fundamental na resolução da inflamação nos tecidos tendo uma ação específica como anti-inflamatórias (no meio intracelular) ou pró-inflamatórias (no meio extracelular), dependendo de onde se as estuda. Em relação à sua principal função, a de chaperona molecular, a HSP72 o faz através de sua forte interação com proteínas desdobradas e da consequente ligação com estas que demandará a energia proveniente de um ATP ligado à chaperona para o redobramento da proteína alvo.

A importância delas no meio biológico é evidenciada quando discorremos sobre o fato de que as HSPs são quase tão antigas quanto a própria vida, com 2,6 bilhões de anos, e notavelmente evolutivamente conservadas. Até mesmo em vegetais, HSP70 permanece 70% homóloga à HSP70 humana (Hooper et al. 2010). Essas chaperonas moleculares são capazes de proteger as células e suas organelas de sucumbirem a insultos estressantes, seja por calor, frio, oxidação, radicais livres, toxinas ou hipóxia. Tem-se bem claro o papel dessas proteínas nas vias inflamatórias e ainda uma evidência de que estas tem participação importante no processo de sinalização da insulina quando se avalia os diferentes tipos de fibra muscular e suas características. Fibras de contração lenta (altamente oxidativas) têm maiores níveis de expressão de HSP70, menor ativação de citocinas inflamatórias e melhor sinalização de insulina em comparação com fibras de contração rápida. (Hopper et al, 2014)

Os papéis do HSP70 foram expandidos para incluir a modulação de condições de doenças crônicas (Kampinga, 2007) tais como DMT2 e obesidade (Chung, 2008 e Krause, 2011). Além disso, há um aspecto intrigante da fisiologia da HSP70, sua versatilidade em induzir ações antagônicas, dependendo da localização da proteína (Rodrigues-Krause, 2012). Por exemplo, HSP70 intracelular (iHSP70) exerce um

poderoso efeito anti-inflamatório, enquanto que no meio extracelular (eHSP70) a mesma proteína possui papel oposto, induzindo a ativação de várias vias pró-inflamatórias. De fato, a exposição crônica a eHSP70 (Ehses, 2010) induz a ativação de várias vias pró-inflamatórias provavelmente via ligação a *Toll-like-receptor* (TLR) de membrana. Vários medicamentos indutores de HSP70 estão sendo investigados, ou estão em ensaios clínicos para neuropatia diabética e doenças neurodegenerativas e podem ser considerados para a prevenção da resistência à insulina (Gupte et al, 2009).

Como regulador primário da resposta de choque térmico, o fator de transcrição responsável pela resposta ao choque térmico, *Heat Shock Factor 1* (HSF-1), é mantido em forma monomérica e inativo em condições em que não há estímulo (Akerfelt et al, 2010). A ativação de HSF-1 é um mecanismo de múltiplas etapas que envolve sua fosforilação, trimerização, translocação nuclear e ligação no DNA a elementos de choque térmico (HSE) localizados nas regiões promotoras de genes de choque térmico (Krause et al, 2011) mediante a apresentação de um estímulo como um agente estressor para a célula. Observa-se a importância do HSF-1 como mecanismo de defesa celular quando se avalia os valores diminuídos de HSF-1 encontrados em diversas patologias humanas, incluindo DM2 (Akerfelt et al, 2010).

Também foi demonstrado que a HSP70 diminui o estresse oxidativo, de forma que fazem parte da maquinaria antioxidante intracelular, tornando a HSP70 expressa no meio intracelular ainda mais importante para a inibição da apoptose e da inflamação (Geiger e Gupte, 2011), tendo sido relatada a interação entre o iHSP70 e as citocinas pró-inflamatórias no nível regulatório de genes inclusive.

A via da expressão da iHSP70 tem um papel inibitório para o NF- κ B tanto pela ação inibitória do HSF1 sobre fator NF- κ B quanto diretamente pela HSP70 que impedirá a translocação deste fator para o núcleo (Karpe e Tikoo, 2014). O HSF1 irá controlar o NKRF, que por sua vez é supressor do NF- κ B. Essa relação está demonstrada quando se vê uma curva de expressão parecida entre HSF1 e NKRF em relação ao tempo e a exposição a diferentes temperaturas (Coccia et al, 2017).

O fator HSF-1 também pode contribuir diretamente para os processos de combate à inflamação e a exposição a agentes prejudiciais para a célula sendo capaz de se ligar à região promotora do gene TNF- α suprimindo a transcrição deste composto (Singh et al, 2002 e Xiao et al, 1999). Essa regulação também ocorre na direção oposta, com o TNF- α também agindo sobre o HSF-1 reprimindo sua ativação (Coccia et al,

2017). Além disso, demonstrou-se que a JNK1 fosforila a HSF1 no seu domínio regulador, causando a supressão da atividade de transcrição do HSF1 (Daí et al, 2000). Dessa forma tem-se o melhor esclarecimento dos mecanismos e vias pelos quais a HSP70 e o ativador de sua transcrição, o HSF-1 de forma direta e indireta promovem a resolução ou diminuição da inflamação através da regulação da transcrição genética de genes pró-inflamatórios.

Dados de estudos demonstram a capacidade do tratamento térmico e a consequente indução da expressão da HSP70 para restaurar a captação de glicose e melhorar a sinalização de insulina no músculo esquelético de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura. Resultados indicam que o tratamento térmico pode prevenir um aumento na fosforilação de JNK e ativação de IKK, possivelmente através de interação direta com a HSP70. Estes resultados fornecem fortes evidências de que a indução de HSP70 no músculo esquelético pode ser um tratamento terapêutico potencial para a resistência à insulina induzida pela obesidade (Gupte 2009). Isso indica que a proteção da HSP70 está fortemente associada à prevenção da fosforilação da JNK (Chung et al. 2008). Há evidências de que o efeito inibitório da HSP72 (membro da família da HSP70) na ativação da JNK ocorre pela ligação directa de HSP72 a JNK impedindo a ativação de JNK, conforme estudos de imunoprecipitação mostrado em cultura de células (Park, 2001).

Archer et al, em 2017, mostram um gráfico em que hipotetiza uma janela de tempo antes de se estabelecer a resistência à insulina no indivíduo em que os valores de HSP72 estariam altos bem como a secreção de insulina e estaria se iniciando o processo de dessensibilização da responsividade à insulina. Na janela de tempo seguinte há a estabelecida resistência à insulina, os níveis de glicose já não são mais adequados e a partir deste ponto a expressão de HSP72 no músculo esquelético diminui deixando a célula desprotegida e poupada de um dos mecanismos de defesa contra a resistência à insulina (Archer, 2017).

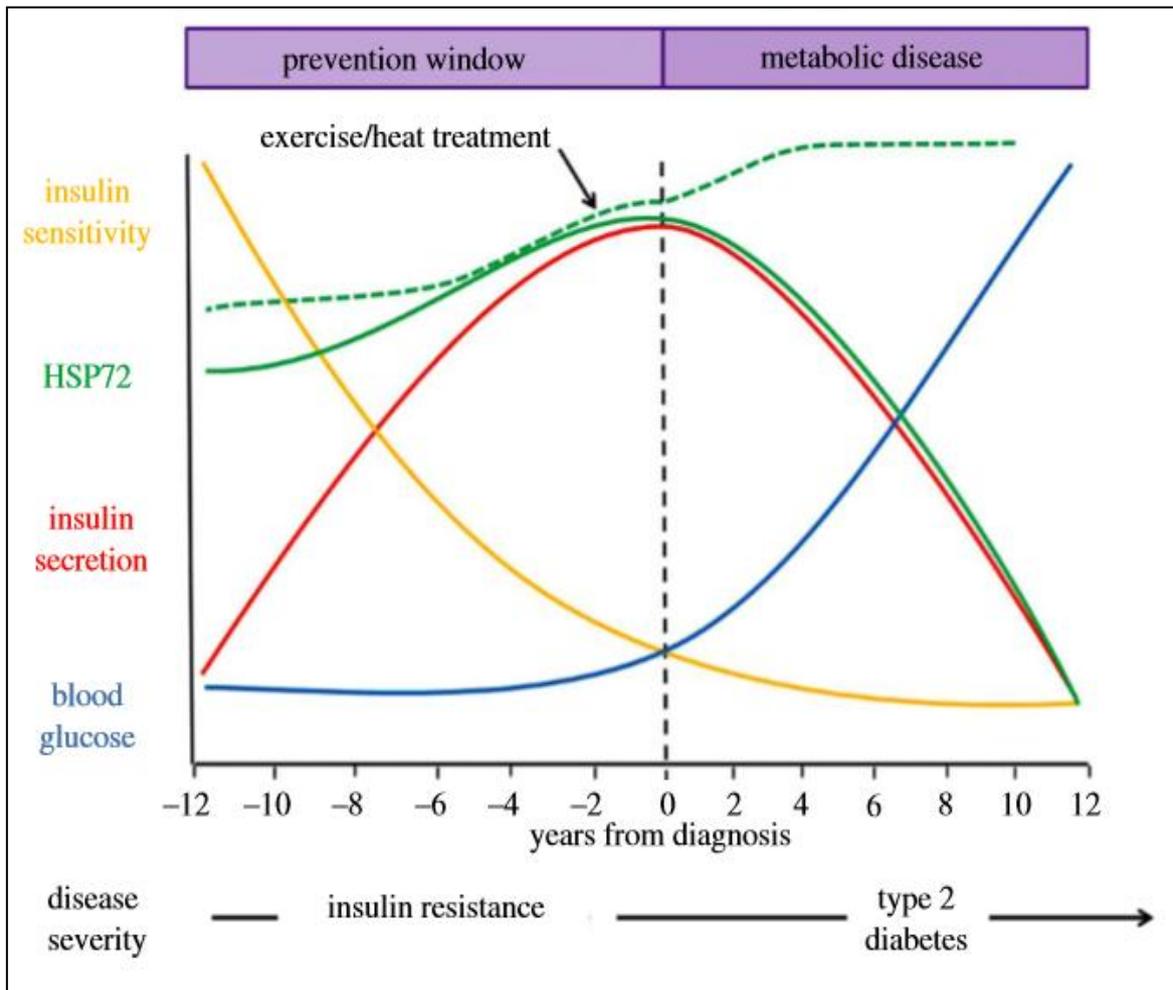


Figura 1. Comportamento da expressão de HSP72 ao longo da evolução do DM2 e sua relação com a sensibilidade à insulina.

Percebe-se neste gráfico a importância da função da HSP72 no processo de resistência à insulina no indivíduo e sua capacidade de auxílio na prevenção da DM2.

O músculo esquelético, como principal tecido responsável pela captação de glicose mediada por insulina em todo o corpo (De Fronzo, 1981 e Song et al, 1999), terá um papel importante na prevenção da DM2. As HSP72s são expressas no músculo esquelético e são fortemente induzidas com treinamento físico (Morton et al, 2006 e Tupling et al, 2007) fazendo com que seja também um tecido em que há bastante investigação a cerca da expressão dessas proteínas, bem como métodos para a indução de sua expressão e os mecanismos da ação dela sobre a resistência à insulina. Estudo mostra que a superexpressão da HSP72 reduz a atrofia do músculo esquelético e o estresse oxidativo (Broome, 2006). Portanto, o músculo esquelético é uma escolha lógica como o tecido alvo para os benefícios da superexpressão de HSP. Estudo prévio indicam que os níveis basais de HSPs diferem entre os tipos de fibras musculares, com

os músculos oxidativos de contração lenta, que apresentam maior expressão constitutiva de HSPs do que os músculos glicolíticos de contração rápida (Gupte, 2008). Em contraste, os músculos de contração rápida possuem maior capacidade de indução de HSP em resposta a estressores fisiológicos e exercícios (Gupte, 2008 e Oishi, 2002).

O esquema abaixo representa a ação já comprovada da HSP sobre a resistência à insulina agindo em vias que promovem diretamente a dessensibilização à insulina pela cascata de sinalização, ou ainda em vias ativadoras de agentes pró-inflamatórios.

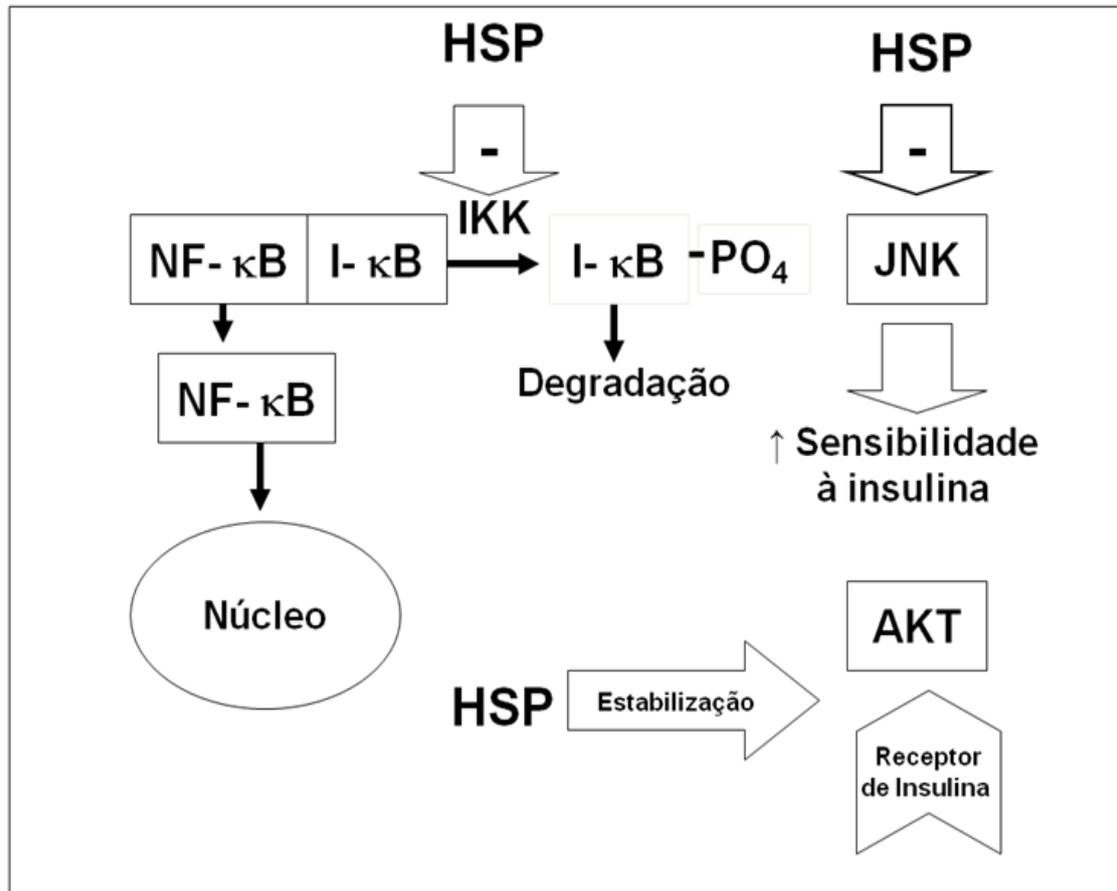


Figura 2: Efeitos da inflamação e da HSP72 intracelular na cascata de sinalização da insulina. Fonte: Tese de Patrícia Bock Martins, 2015 (Efeito da suplementação de Glutamina e Dipeptídeo L-alanil-L-glutamina sobre a expressão da (HSP70) e a sinalização da insulina em camundongos tratados com dieta hiperlipídica) disponível em Lume Repositório Digital - UFRGS.

Conforme os estudos apresentados nesse texto, a relação da HSP no meio intracelular com a obesidade e o estabelecimento do DM2 tem uma relação contrária em que, conforme se perde a proteção da resposta ao choque térmico por meio da expressão das HSPs, também se perde uma importante forma de resolução do perfil inflamatório na condição de Inflamação Crônica de Baixo Grau, e ainda se perde uma forma de defesa contra a resistência à insulina através da proteção da cascata de sinalização da

insulina. Sendo assim há uma diminuição considerável dos níveis dessa proteína em razão do aparecimento da resistência à insulina.

Quando se avalia diferentemente machos e fêmeas quanto à expressão das HSPs em relação à diversos estímulos estressores das células, de acordo com o tecido avaliado há divergências nos resultados encontrados em machos dos encontrados nas fêmeas, tanto em humanos (Xiong, 2015 e Njemini, 20017) quanto em modelos animais (Cheng, 2015). Tal divergência parece estar relacionada com tecido avaliado. Por exemplo, no tecido cardíaco, há maior expressão de HSPs em fêmeas mostrando que estas estão mais protegidas contra lesões ou cardiopatias do que os machos. (Stice, 2011) No momento em que se avalia tecido hepático, os machos estão mais protegidos com uma expressão mais elevada de HSP do que as fêmeas (Chen, 2015).

Porém a maior parte destes estudos avalia as diferenças mediante estresses como o exercício ou o choque térmico pela elevação da temperatura corporal, mas nenhum avalia a expressão dessas proteínas e a diferença entre os sexos mediante um tratamento indutor de obesidade e de resistência à insulina.

Como vimos até então as HSPs podem ser muito benéficas e protetoras no processo de acometimento da obesidade e do DM2, porém machos e fêmeas apresentam diferenças no desenvolvimento e evolução dessas doenças. Uma das possíveis razões pela qual essas diferenças ocorrem pode estar diretamente relacionada com a expressão das HSPs em tecidos metabólicos importantes, conforme investigam alguns poucos estudos. A maior parte das justificativas para as diferenças encontradas na expressão das HSPs baseia-se na diferença na liberação de hormônios sexuais entre os sexos mostrando tais divergências na presença ou ausência do estrogênio (Stice, 2011) ou da testosterona (Chen, 2015).

Sendo assim, investigamos nesse trabalho como se comporta o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina mediante um tratamento com dieta hiperlipídica em machos e fêmeas e relacionamos essas características com a expressão das HSPs em tecido metabólicos chaves como fígado e músculo esquelético (gastrocnêmio e sóleo).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar o desenvolvimento da resistência à insulina, induzida pela dieta hiperlipídica, entre camundongos C57BL/6J machos e fêmeas, e a expressão da proteína de choque térmico HSP70 em tecido muscular esquelético e hepático.

2.2 Objetivos Específicos

- Submeter camundongos C57BL/6J machos e fêmeas a tratamento de dieta hiperlipídica por 16 semanas;
- Verificar e comparar o desenvolvimento da intolerância à glicose desses animais e indiretamente da resistência à insulina.
- Verificar e comparar a expressão de HSP70 muscular e hepática dos camundongos C57BL/6J machos e fêmeas após a intervenção dietética

3. HIPÓTESE

Considerando as atuais evidências da maior proteção cardiovascular e metabólica contra os efeitos de uma dieta hiperlipídica apresentada pelas fêmeas, hipostenizamos que estas apresentam maior expressão das proteínas de choque térmico HSP70, havendo, portanto, a ocorrência menor de resistência à insulina em camundongos fêmea em relação aos machos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de Realização dos Experimentos

Os procedimentos e experimentações deste projeto foram todos realizados no Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) do Departamento de Fisiologia da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado no campus central da UFRGS (Av. Sarmiento Leite n° 500, 2° andar, laboratório 02, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS).

4.2 Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFRGS), sob n° 21293, após prévia revisão realizada por parecerista ad hoc nomeado para o projeto por comissão específica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos para o uso científico de animais, estabelecidos pela Lei n° 11794, Lei Arouca (BRASIL, 2008), e pelas resoluções normativas 12 e 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2013).

4.3 Cálculo do Tamanho Amostral

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o programa Minitab versão 15, tendo como base para cálculo os resultados dos protocolos experimentais de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa. Neste contexto, o tamanho de amostra foi utilizado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura 20 ± 10 ng/ml para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70) (Febbraio *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2014). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para nível de significância de 0,05%.

Considerados estes parâmetros, o número de animais por grupo foi de 5, porém, como o volume de sangue e pesos dos tecidos de cada animal seriam insuficientes para a realização de todas as análises (cada animal fornece cerca de 500 μ L de sangue, e eram necessários cerca de 1000 μ L para as análises), foi utilizado um tamanho amostral de 10 animais por grupo. O número de animais utilizados para a execução do projeto foi o mínimo possível para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. Desta forma, foram utilizados 2 grupos de animais machos e 2 grupos de animais fêmeas da linhagem C57BL/6J, totalizando 40 animais no estudo.

4.4 Animais

Foram utilizados neste estudo, 20 camundongos fêmeas e 20 camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J, recém desmamados (3 semanas) fornecidos pelo Biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos durante a experimentação neste mesmo local. Foram divididos 5 animais por caixa de polipropileno (33cm x 17cm, Figura 3), sob iluminação com sistema de LEDs controladas eletronicamente, com ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa do ar mantida entre 50 a 60%, tendo em vista que a temperatura termoneutra para camundongos dentro de seus respectivos ninhos deve estar próxima de 29-30 °C .



Figura 3: Alocação dos camundongos machos e fêmeas do estudo. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno (33cm x 17cm) sendo 5 animais por caixa com água e ração *ad libitum*.

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais, e do Código Brasileiro de Experimentação Animal - 1988, em conformidade com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (NIH). Os animais foram mortos por decapitação com uso de guilhotina para roedores. O objetivo da decapitação é a obtenção do volume total do sangue do animal para dosagens de marcadores importantes para determinação da resistência à insulina e perfil lipídico dos mesmos.

4.5 Desenho experimental

Os animais machos e fêmeas foram divididos em quatro grupos cujas diferenças foram o gênero do animal e a dieta ao qual estes foram submetidos (dieta padrão de biotério ou dieta hiperlipídica).

Os quatro grupos são:

Grupo I (**MP**): 10 animais machos submetidos a uma dieta padrão de biotério com comida e água *ad libitum* por 16 semanas.

Grupo II (**MHFD**): 10 animais machos submetidos a uma dieta hiperlipídica confeccionada em laboratório com especificações de valor energético e composição, descritas a seguir, por 16 semanas.

Grupo III (**FP**): 10 animais fêmeas, submetidas à mesma dieta padrão que os machos por 16 semanas.

Grupo IV (**FHFD**): 10 animais fêmeas, submetidas à mesma dieta hiperlipídica que os machos por 16 semanas.

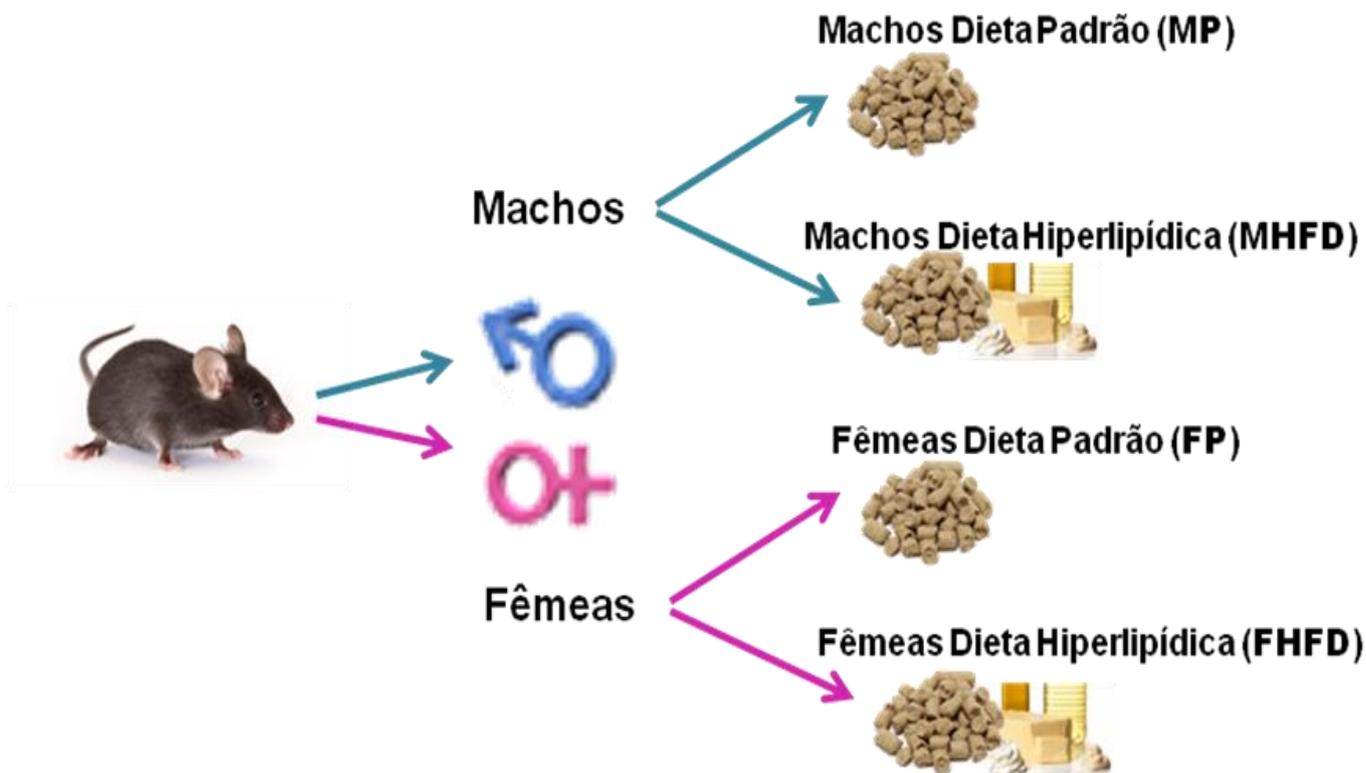


Figura 4: Grupos Experimentais. O estudo foi dividido em dois grupos iniciais: machos e fêmeas e dentro de cada um desses ainda foi realizada a divisão dos grupos de acordo com a dieta à qual os animais foram submetidos.

Os animais foram submetidos às respectivas dietas imediatamente após o desmame, ou seja, com 3 semanas de vida. O acompanhamento do desenvolvimento da obesidade foi feito a partir do controle de peso corporal a cada 4 semanas, além do controle de consumo de ração realizado semanalmente. A sensibilidade à insulina foi medida (indiretamente) a partir do Teste Oral de Tolerância a Glicose (OGTT) a cada 4 semanas de dieta dos animais. Esse teste foi realizado através da aplicação, por gavagem, de uma solução de 50% de glicose em água, na concentração de 10g/Kg de peso corporal, após jejum de 8h.

A morte aconteceu 24h após o último dia de tratamento com a dieta respectiva de cada um dos grupos. Os animais foram decapitados para que se pudesse realizar a coleta do sangue para fins de avaliação de parâmetros metabólicos. No momento da morte, foram coletados os tecidos de interesse para análises deste estudo: músculos gastrocnêmios e sóleos, e fígado, para posterior avaliação dos conteúdos proteicos. Observa-se em fêmeas alojadas em mesmo local e em mesmas caixas a sincronização do ciclo estral desses animais, por tanto não houve a necessidade de confirmação de fase

do ciclo no momento da morte em função de que todas estariam na mesma fase do ciclo já que alocadas juntas por 16 semanas.

O esquema a seguir exemplifica e demonstra períodos e tratamentos dos grupos supracitados.

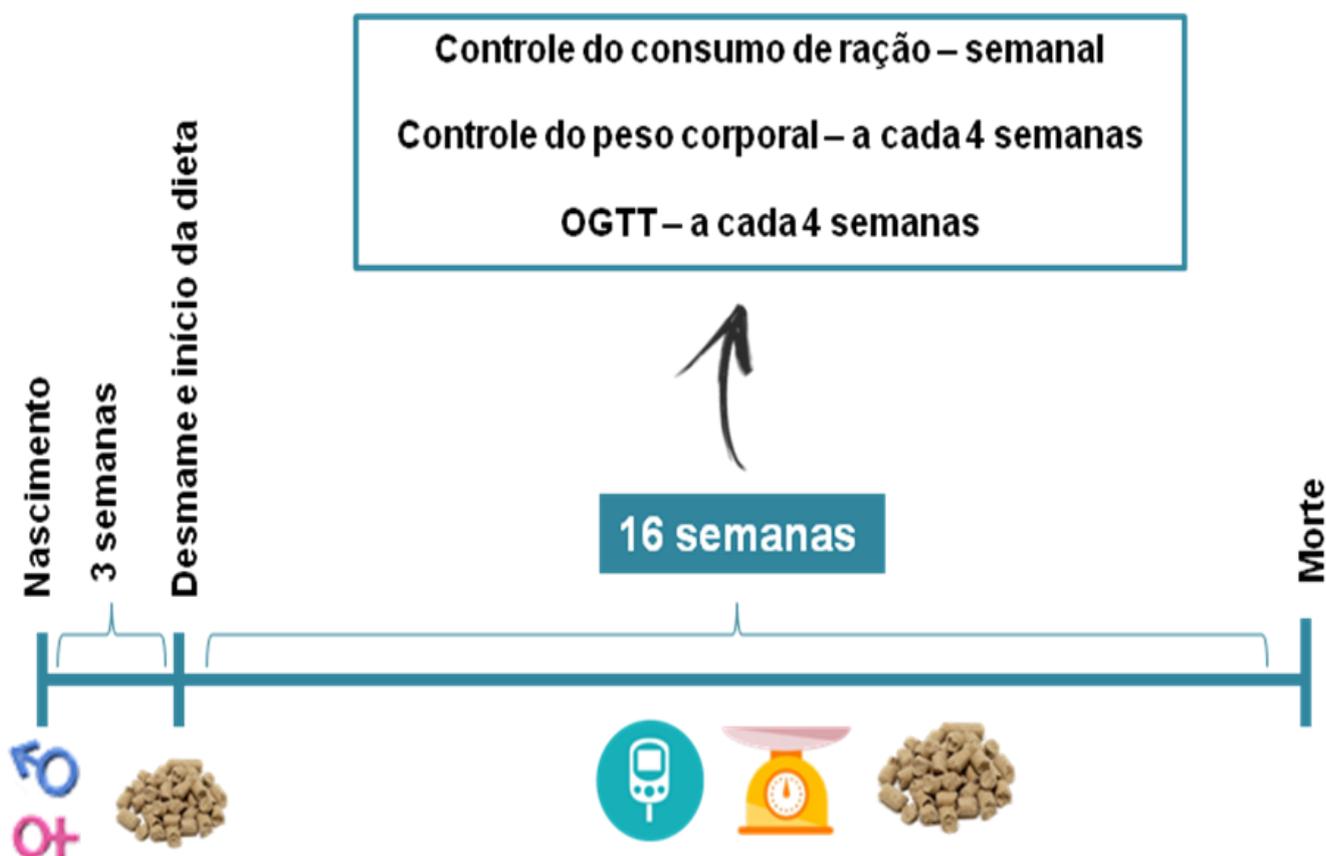


Figura 5: Desenho experimental e desenvolvimento do estudo. Representa temporalmente os eventos prévios à eutanásia dos animais. O início da dieta padrão ou da HFD se inicia em seguida ao desmame. A partir deste momento há o controle do peso dos animais bem como o controle do consumo de ração semanalmente e o OGTT realizado a cada 4 semanas. A eutanásia ocorre após 16 semanas de tratamento.

4.6 Dieta hiperlipídica

Neste estudo, para induzir a obesidade e a resistência à insulina nos animais, fez-se uso de uma dieta hiperlipídica confeccionada a partir da dieta padrão de biotério em nosso laboratório. A dieta padrão de biotério foi composta por 11,4% de gordura, 62,8%

de carboidrato 25,8% de proteína totalizando 12,6 kJ / g de ração. A partir da dieta padrão de biotério foi confeccionada, em laboratório, a dieta hiperlipídica para a utilização em dois dos nossos grupos experimentais. A dieta hiperlipídica foi composta de 58% de gordura, 25,6% de carboidrato, 16,4% de proteína totalizando 23,4 kJ / g de ração. A gordura adicional da dieta hiperlipídica era proveniente de banha de porco industrializada (Santa Clara), sendo esta confeccionada e armazenada em geladeira, sendo feita a reposição para os animais sempre que necessária. Todos os animais tiveram livre acesso a água (*ad libitum*). O índice de severidade para o manuseio e administração de dietas é considerado como leve, já que os animais não são forçados a nenhuma intervenção além da dieta. A ingestão de alimentos e o peso corporal dos animais foram mensurados uma vez por semana.

COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	
Dieta Padrão	
Carboidrato	62,8%
Proteína	25,80%
Gordura	11,40%
Valor calórico	12,6 kJ/g
Dieta Hiperlipídica	
Carboidrato	25,60%
Proteína	16,40%
Gordura	58%
Valor calórico	23,4 kJ/g









Figura 6: Composição da dieta padrão de biotério com valor calórico de 12,6kJ/g e da dieta hiperlipídica (HFD) com valor calórico de 23,4kJ/g, confeccionada para o estudo.

4.7 Determinação de Peso dos Animais e Consumo de Ração

Para a determinação do ganho de peso semanal dos animais, os camundongos foram contidos em embalagens plásticas de 175x132 mm, com altura de 115 mm, e pesados individualmente em balança digital (BEL Engineering®, Milão, ITÁLIA) com precisão de $\pm 0,01$ g.

Para a determinação do consumo de ração, a ração das caixas foi pesada uma vez por semana, em balança digital (BEL Engineering®, Milão, ITÁLIA), com precisão de $\pm 0,01$ g. O consumo total da caixa foi analisado pelo peso de cada animal, para a avaliação do consumo semanal por peso do animal.

4.8 OGTT

A evolução das alterações da glicemia foi confirmada por meio de teste oral de tolerância à glicose (O-GTT). O índice de severidade para os testes de tolerância à glicose, que envolvem a manipulação, gavagem com solução de glicose e coleta de 5 amostras de sangue da cauda do animal (nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min após a gavagem) foi considerado moderado, pois envolveu repetidas intervenções no animal, apesar de quase indolores.

Para a realização deste teste, os animais foram mantidos em jejum de 8 horas. Foi preparada uma solução de glicose a 50% (m/v) em água, administrada na concentração de 10 g/kg de peso corpóreo, por gavagem de cerca de 500 μ L de solução, conforme o peso de cada animal. O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos antes da gavagem e da primeira coleta (tempo zero).

O sangue para a análise da glicemia nos tempos acima descritos foi coletado com o auxílio de um lancetador automático (tipo caneta) com grau de profundidade calibrável (Accu-Chek modelo MultiClix, Roche). Para tanto, amostras de cerca de 1 μ L de sangue da parte distal da cauda do animal foram coletadas. As medidas de glicemia foram feitas usando aparelho de leitura glicêmica capilar (glicosímetro) *On Call Plus*, *Acon Laboratories Inc.*

Para comparação dos resultados entre os grupos foi utilizado o cálculo da área sob a curva (AUC). Os valores e cálculos foram gerado pelo programa estatístico Graph

Pad Prism 5. Foram incluídas as áreas abaixo da linha de jejum (tempo zero) para o cálculo da AUC.

4.9 Coleta dos tecidos

A morte dos animais aconteceu 24 horas após o último dia de intervenção. O método utilizado para a morte foi a decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia. O método foi escolhido em função da necessidade da coleta do sangue para análises de parâmetros relacionados à resistência à insulina e perfil lipídico dos animais baseando-se no fato de ser um método rápido e eficaz, que induz a perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos.

Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais antes da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores, afetando fatores estudados (Febbraio *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005), a morte dos animais deve ser executada sem anestesia.

A sala onde ocorreu a decapitação foi distinta da outra onde ficaram os demais animais a serem submetidos à eutanásia. O ambiente possui exaustão e a sala é composta de mesa central para coleta de material e de bancada lateral com pia, sobre a qual se encontra a guilhotina. Entre a morte de um animal e outro, a guilhotina, a pia e todo o restante do material foi completamente higienizado com água, detergente e álcool, evitando-se assim, maior estresse para os animais.

Os tecidos muscular esqueléticos (gastrocnêmio e sóleo) e tecido hepático coletados dos animais imediatamente após a morte e congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a retirada, e em seguida, armazenados em freezer -80° C. Dado o momento da homogeneização para avaliação dos tecidos, estes foram homogeneizados em SDS 0,1% com inibidores de proteases (descrição completa na seção 4.13) para a seguinte avaliação por Western Blotting.

O sangue trocular foi obtido imediatamente após a decapitação em guilhotina, e coletado em microtubos contendo 10 µL de heparina sódica (*Heptar*® *Eurofarma*, 5000 UI/mL). O sangue heparinizado foi centrifugado a 850 x g por 10

minutos, a 4 °C, em centrífuga *Hettich Universal 320 R*, para que houvesse a separação do plasma para análises dos dados pertinentes a este projeto.

4.10 Determinação de triglicerídeos plasmáticos

A determinação dos triglicerídeos, ou triacilgliceróis, baseia-se na hidrólise dos mesmos pela lipoproteína lipase, o que promove a liberação de glicerol, que é fosforilado pela enzima glicerol cinase. O produto, glicerol-3-fosfato, é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol fosfato oxidase, formando peróxido de hidrogênio. Este reage com a 4-aminoantipirina e com o p-clorofenol, pela ação da enzima peroxidase, formando 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato e quinoneimina, que é o composto cromógeno que absorve luz no comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de quinoneimina formada é proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra analisada.

Para esta determinação foi utilizado o Kit comercial Bioclin Triglicérides Monoreagente®.

4.11 Determinação de colesterol total plasmático

A determinação da concentração do colesterol plasmático total se baseia na hidrólise dos ésteres de colesterol presentes nas lipoproteínas por esterases, o que promove a liberação de colesterol livre, que é oxidado pela enzima colesterol oxidase, liberando peróxido de hidrogênio. Este reage com a 4-aminoantipirina e com o p-clorofenol, pela ação da enzima peroxidase, formando 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato e quinoneimina, que é o composto cromógeno que absorve luz no comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de quinoneimina formada é proporcional à concentração de colesterol na amostra analisada.

Para esta determinação foi utilizado o Kit comercial Bioclin Colesterol Monoreagente®.

4.12 Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Após a obtenção cirúrgica, o fígado dos animais foi congelado em nitrogênio líquido com auxílio de um *freeze clamp*. O tecido foi processado por meio de homogeneização em KCl 1,15% à razão de 900 μ L para cada 100 mg de tecido (1:10), com homogeneizador de facas (UltraTurrax). Imediatamente após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e armazenados em freezer -80 °C.

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) é bastante utilizada para medir a lipoperoxidação (LPO), pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos desta, dentre eles o malondialdeído e outros aldeídos, formando bases de Schiff, que possuem coloração rosada e podem ser medidas espectrofotometricamente a 532 nm.

A técnica consistiu em aquecer, durante uma hora em banho-maria fervente, o material biológico a ser testado (sobrenadantes de fígado), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, ácido acético 20% a pH 3,5, butil-hidróxitolueno (BHT) 4,5 mmol/L em etanol, e ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente e centrifugada a 900 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, e a leitura da absorbância realizada a 532 nm em leitora de microplacas. Foi feita uma curva de calibração com malondialdeído, e os resultados foram expressos em nmols de TBA-RS por mg de proteína (Buege e Aust, 1978).

4.13 Expressão de proteínas pela Técnica de Western Blotting

Para determinação da expressão de proteínas por Western Blotting, parte dos tecidos hepático e musculares esqueléticos previamente extraídos, congelados com auxílio de freeze clamp em nitrogênio, foram homogeneizados em homogeneizador de facas em gelo em solução de SDS 0,1% cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona (TLCK) 20 μ mol/L, Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila (PMSF) 100 μ mol/L, leupeptina 2 μ g/mL, aprotinina 2 μ g/mL, ortovanadato de sódio 1 mmol/L, molibdato de sódio 1 mmol/L e β glicerofosfato 1 mmol/L . Em seguida, o conteúdo foi

centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante coletado.

A concentração de proteína foi determinada por Kit BCA (Thermo). As amostras serão então diluídas em tampão para eletroforese (50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/mL azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (30µg por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%, para separação durante 2:30 horas utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi utilizado como marcador de peso molecular 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, onde ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham), foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 2:30 horas. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi confirmada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%) e em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

Para determinar a expressão de HSP72, as membranas resultantes do processo descrito foram incubadas com anticorpo monoclonal anti HSP70 (Sigma H5147, produzido em camundongo, em diluição 1:1000) que reconhece a forma induzível de 72 kDa e sua forma constitutiva de 73kDa. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma A9044) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T. Para determinar a expressão de GAPDH, utilizado como normalizadores para as proteínas em estudo foi utilizado o anticorpo primário anti-GAPDH em diluição 1:1000 (Sigma G9545). Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma A0545) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 x por 10 minutos com tampão TBS-T. Após as lavagens, as membranas foram tratadas com os reagentes quimiluminescentes ácido p-coumárico (2 nmol) e luminol (0,01 nmol), na presença de peróxido de hidrogênio e reveladas no equipamento (Amersham Pharmacia

Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens Image Quant 350 com software Image Quant TL 7.0 para Windows. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica pelo uso do programa Image J (Frederich, Maryland, EUA), e os dados foram apresentados como unidades arbitrárias da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas da proteína normalizadora.

4.14 Análise estatística

O tratamento estatístico foi desenvolvido no programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e como os dados apresentavam distribuição normal, foram apresentados por procedimentos descritivos, em que a medida de tendência central utilizada foi a média e a medida de dispersão o desvio padrão (DP). A análise inferencial utilizada foi a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Student Newman Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5%.

5. RESULTADOS

Conforme apresentado na seção de materiais e métodos, a amostragem foi dividida em quatro grupos experimentais:

- 1) Animais machos submetidos a dieta padrão por 16 semanas (MP);
- 2) Animais machos submetidos à dieta hiperlipídica por 16 semanas (MHFD);
- 3) Animais fêmeas submetidos a dieta padrão por 16 semanas (FP);
- 4) Animais fêmeas submetidas a dieta hiperlipídica por 16 semanas (FHFD).

Os valores dos dados apresentados a seguir são a média de cada grupo \pm epm. Para cada parâmetro estudado há uma figura, para melhor visualização dos dados.

Durante as 16 semanas de tratamento dos animais foram realizados, semanalmente, o controle de consumo de ração e o controle de peso dos animais, conforme dados mostrados nas figuras 7 e 8. Ainda, a cada 4 semanas de tratamento, durante as 16 semanas, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (*Oral Glucose Tolerance Test*) OGTT. Após a morte dos animais foram dosados, no plasma, o conteúdo de triglicerídeos, colesterol e a glicose. Após a retirada dos tecidos de interesse, nos músculos e fígado, foi dosada a expressão da proteína HSP70 (e GAPDH como normalizador), e ainda no fígado foi dosado T-BARS.

5.1 Consumo de ração

O consumo de ração foi acompanhado semanalmente através da pesagem da ração, por caixa, e dividida pelo número de animais da caixa. O acompanhamento foi feito tanto nos animais em dieta hiperlipídica quanto nos animais em dieta padrão de biotério. No gráfico a seguir (figura 7) está representada a evolução do consumo de ração durante as 16 semanas, de cada grupo do estudo, conforme o consumo calórico em quilojoules (kJ) ingeridos por animal por dia. Trazem-se os dados em kJ para melhor comparar a ingestão calórica desses animais. Não houve diferença estatística no consumo de ração entre machos e fêmeas quanto à mesma dieta, e nem relacionando o mesmo sexo e diferentes dietas.

Consumo Alimentar

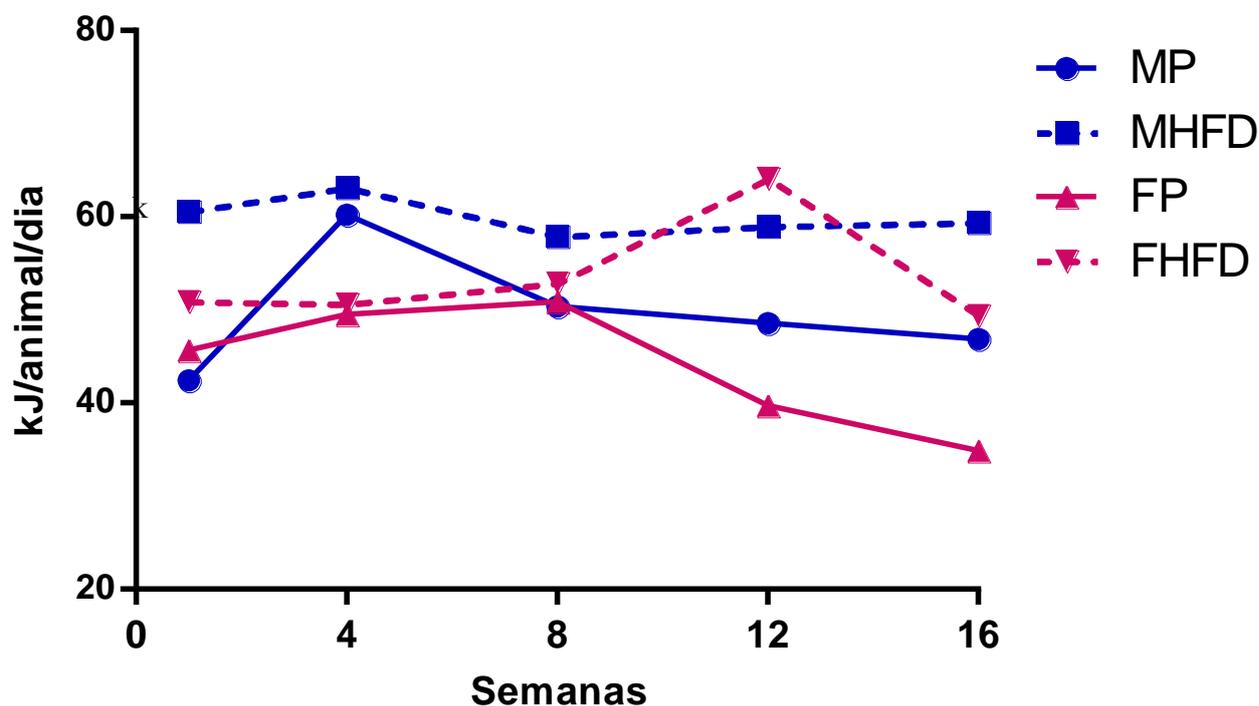


Figura 7: Consumo de ração dos animais durante o período de administração de dieta padrão e HFD. Dados expressos pela média de Quilojoules (kJ) consumidos diariamente por cada animal (kJ/animal/semana) dos grupos experimentais. Não houve diferença no consumo entre os grupos. ($p > 0,05$). N=10 por grupo.

5.2 Peso dos animais e peso da gordura abdominal

Para avaliar o efeito da dieta hiperlipídica sobre o peso corporal dos animais, foram realizadas medidas semanais, conforme representado nos gráficos a seguir (*Figura 8*, mostrando a evolução do peso dos machos, de ambas as dietas, conforme a semana; *Figura 9*, com a evolução de peso das fêmeas, também nas diferentes dietas e nas diferentes semanas; e *Figura 10*, comparando todos os grupos em relação a este parâmetro). Os resultados obtidos mostram que, em relação ao peso dos animais machos, houve aumento significativo de peso ao longo de 8, 12 e 16 semanas no grupo HFD (comparado com o grupo da mesma dieta). Ainda, quando avaliada apenas a dieta padrão, há aumento de peso da semana 4 para a semana 8. Quando comparados na mesma semana (dieta padrão vs. HFD), foram encontradas diferenças estatísticas em todas as semanas, conforme apresentado no gráfico.

Em relação as fêmeas, avaliando-se a mesma semana, e as diferenças entre as dietas (padrão vs. HFD), encontramos um aumento no peso dos animais da HFD, mas apenas nas semanas 8 e 16. Avaliando-se a mesma dieta e as diferenças em ganho de peso durante as semanas, há diferença na HFD da semana 4 para a semana 8 e da semana 8 para a semana 12, sendo que nos animais de dieta padrão há aumento significativo de peso apenas da semana 8 para a semana 12.

Comportamento do peso dos machos

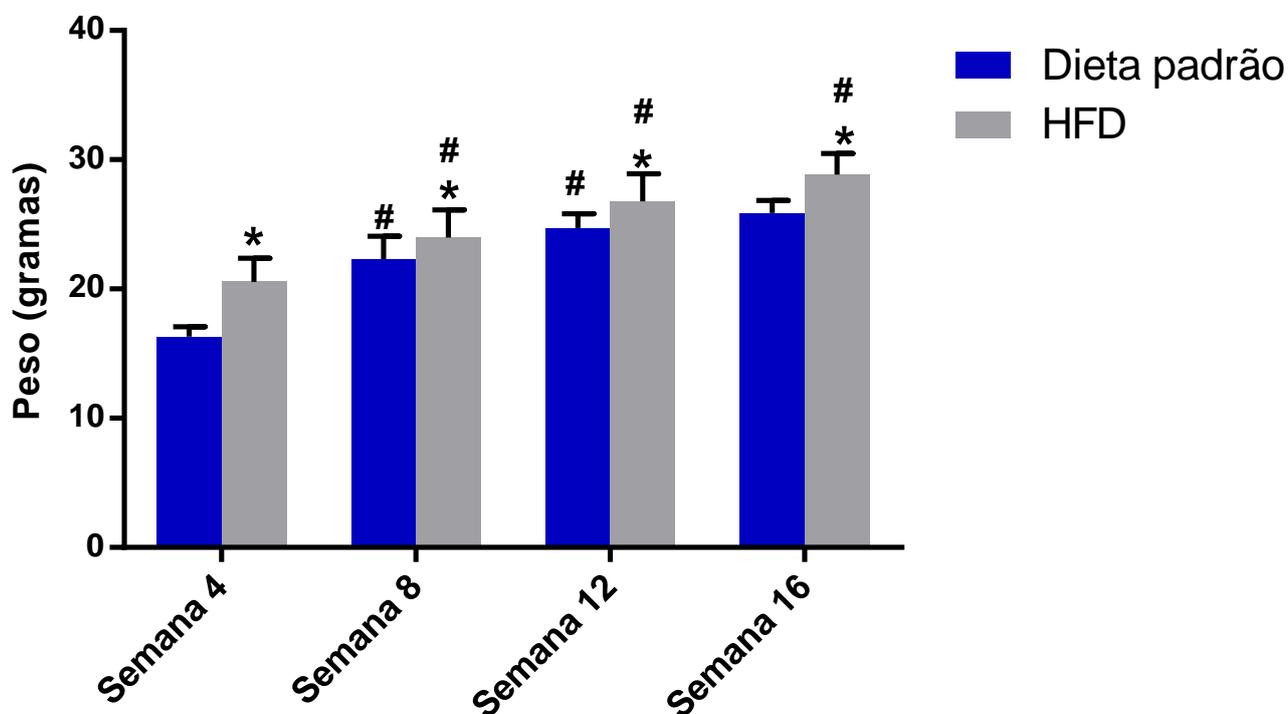


Figura 8 : Ganho de peso dos machos ao longo da intervenção. Dados expressos em média \pm epm. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês, # representa valores significativos em relação a mesma dieta na semana anterior representada ($P < 0,0001$). N=10 por grupo.

Comportamento do peso das fêmeas

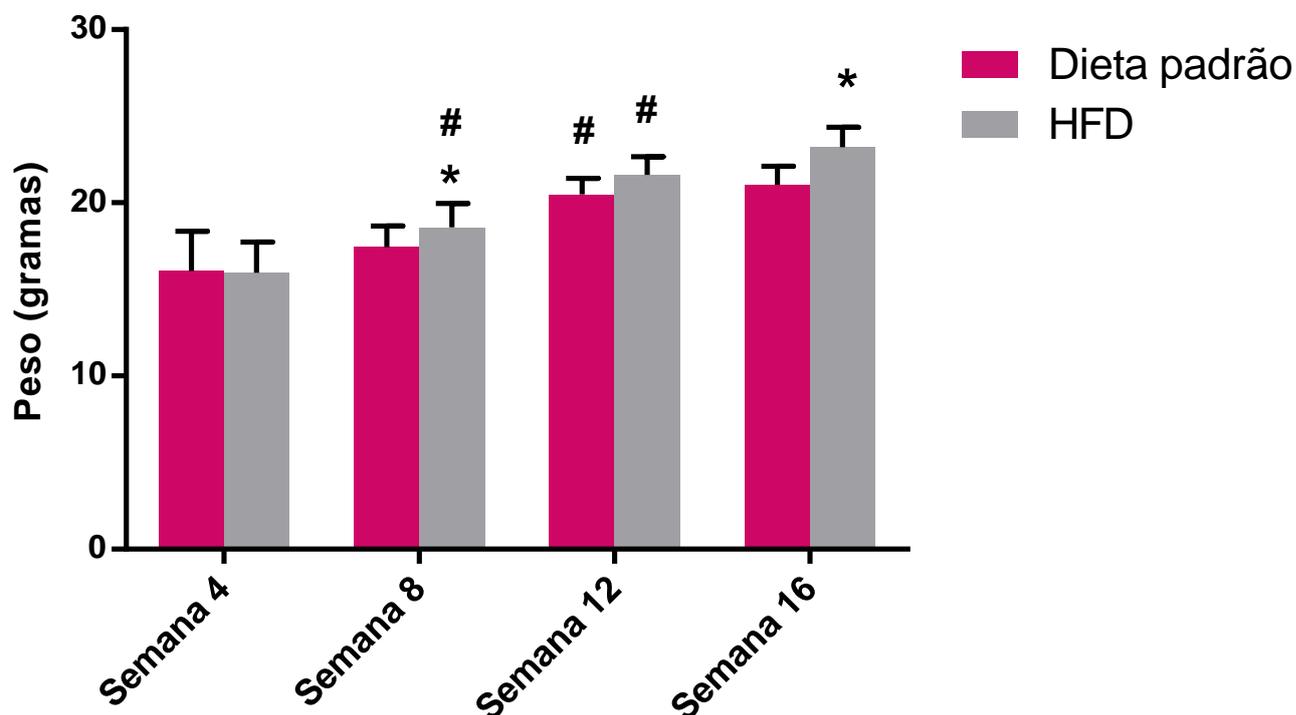


Figura 9: Ganho de peso das fêmeas ao longo da intervenção. Dados expressos em média \pm epm. * representa valores significativos nos grupos HFD em relação à dieta padrão em cada mês, # representa valores significativos em relação a mesma dieta na semana anterior representada. ($P < 0,0001$). N=10 por grupo.

Na figura 10, ao se comparar as diferenças na evolução de peso entre animais machos e fêmeas, encontra-se diferença estatisticamente significativa entre machos HFD e fêmeas HFD, em todas as semanas de dieta, sendo que os machos sempre apresentam valor aumentado de peso em relação às fêmeas. Já quando comparados machos e fêmeas da dieta padrão, observa-se diferença estatística apenas na décima segunda semana de dieta.

A figura 11 mostra a comparação do peso da gordura abdominal total dos animais em machos e fêmeas em dieta padrão e HFD. Observa-se diferença estatística nos machos e nas fêmeas entre os animais de dieta padrão e os animais de HFD sendo a dieta hiperlipídica eficaz na indução do aumento da gordura abdominal total nos animais.

Comparação do comportamento do peso

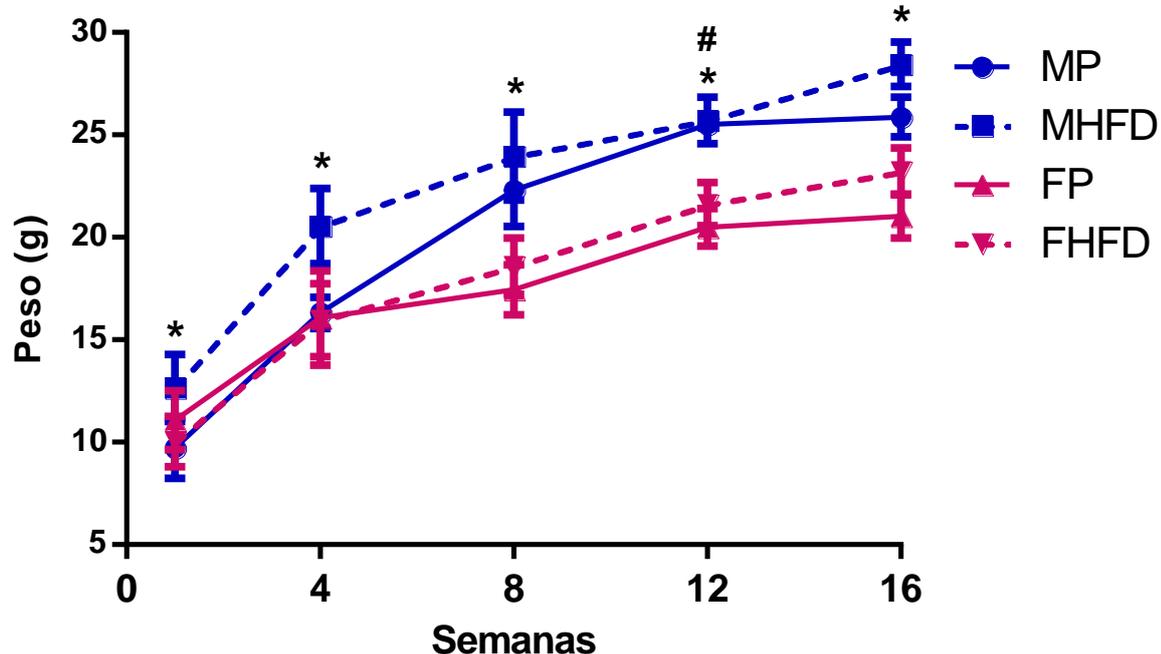


Figura 10: Comparação do ganho de peso entre animais machos e fêmeas ao longo da intervenção. Dados expressos em média de peso dos média \pm epm. * representa valores significativos nos grupos HFD de machos em relação às fêmeas. # representa valores significativos nos grupos de dieta padrão dos machos em relação as fêmeas. N=10 por grupo com $p < 0,05$.

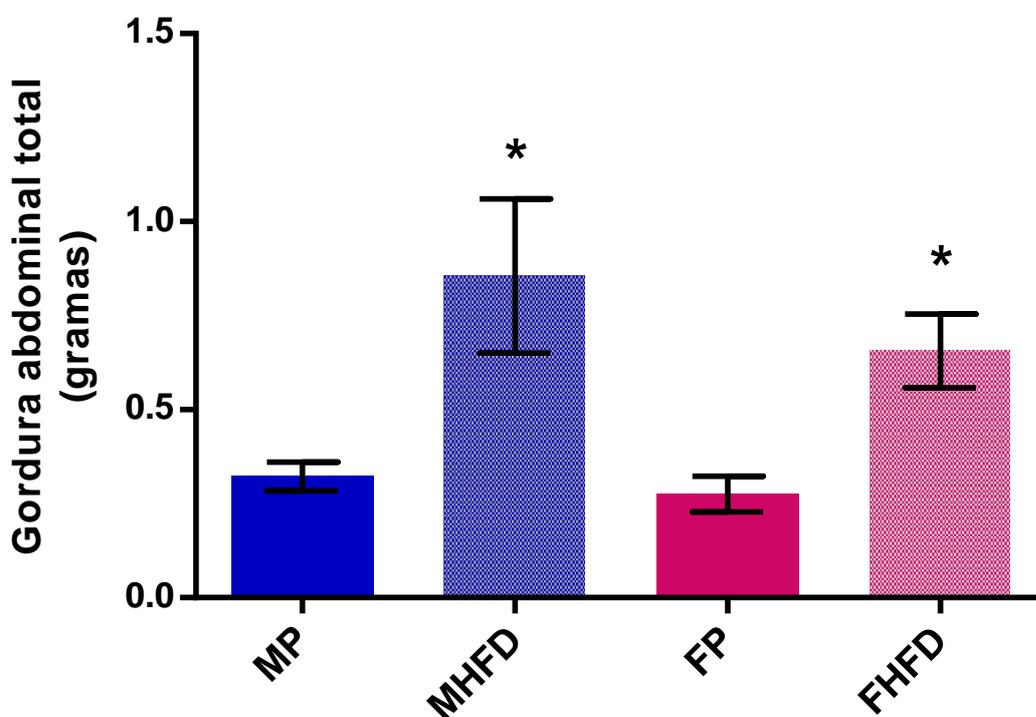


Figura 11: Comportamento do peso da gordura abdominal total. Dados expressos em média \pm epm. * representa valores significativos com $P < 0,0001$. N=10 por grupo.

5.3 O-GTT

Para avaliação dos efeitos da dieta hiperlipídica na resposta glicêmica, frente a uma sobrecarga de glicose administrada oralmente (medindo indiretamente a sensibilidade à insulina), foi realizado o O-GTT mensalmente, conforme descrito na metodologia. Os resultados do tempo zero (momento do desmame dos animais), em que foi realizado o primeiro O-GTT, mostram que não há diferenças entre os grupos de machos e de fêmeas (Figura 12 e 13).

Ao final da quarta, oitava e décima segunda semanas de tratamento dos animais, os resultados do O-GTT mostraram diferenças significativas somente entre os grupos dos machos em dieta padrão e dos machos alimentados com dieta hiperlipídica, conforme observado nas figuras 14 a 19.

Ao final da décima sexta semana, tanto os machos quanto fêmeas da dieta HFD, mostraram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles (Figura 20 e 21).

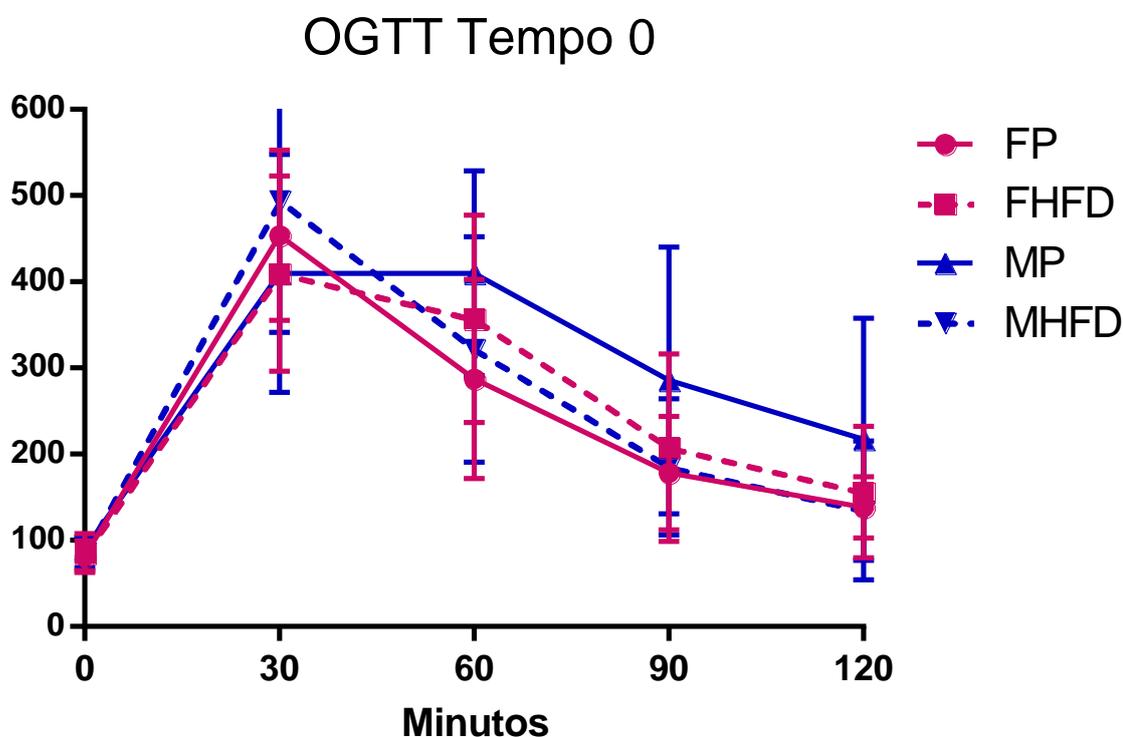


Figura 12: Comportamento da curva do OGTT dos animais antes do início da dieta imediatamente após o desmame. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. $P > 0,05$ com $n = 10$ por grupo.

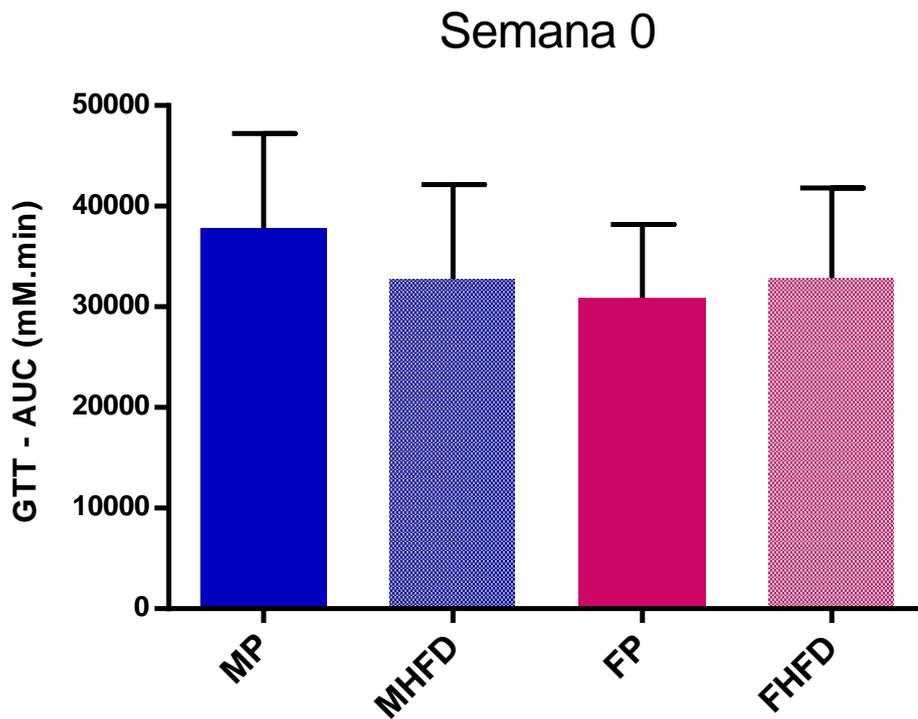


Figura 13: OGTT da área sobre a curva dos animais antes do início da dieta imediatamente após o desmame. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. $P > 0,05$ com $n = 10$ por grupo.

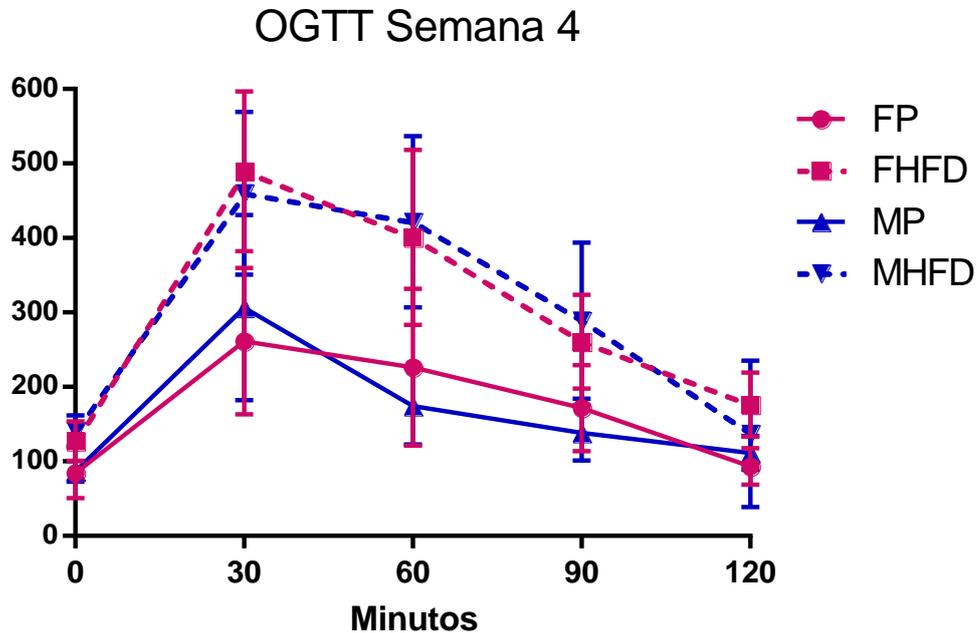


Figura 14: Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 4. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm e $n = 10$ por grupo.

4 semanas

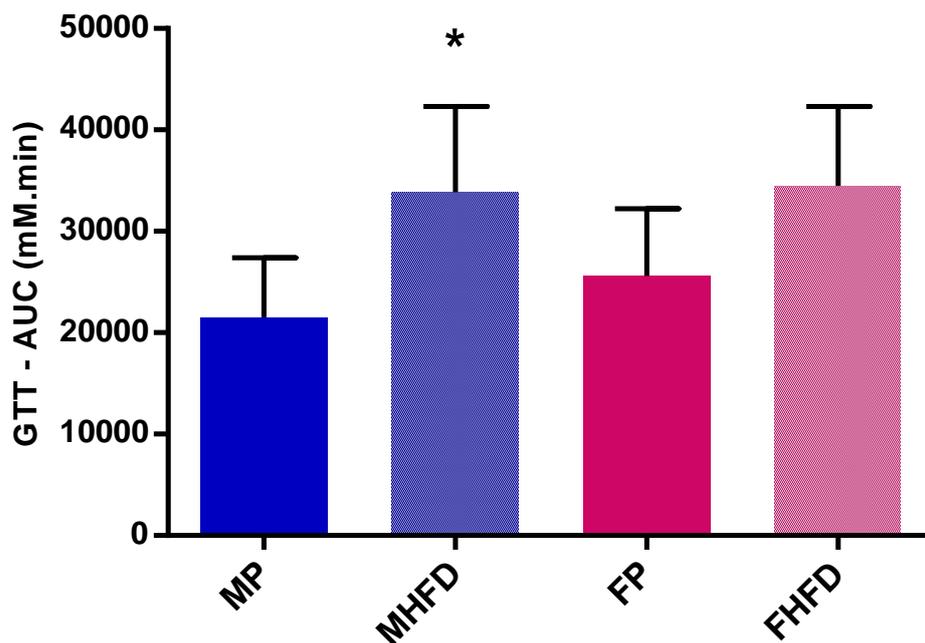


Figura 15: OGTT da área sobre a curva dos animais após 4 semanas de HFD ou dieta padrão. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. * representa significância de diferença entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta hiperlipídica com $p < 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

OGTT Semana 8

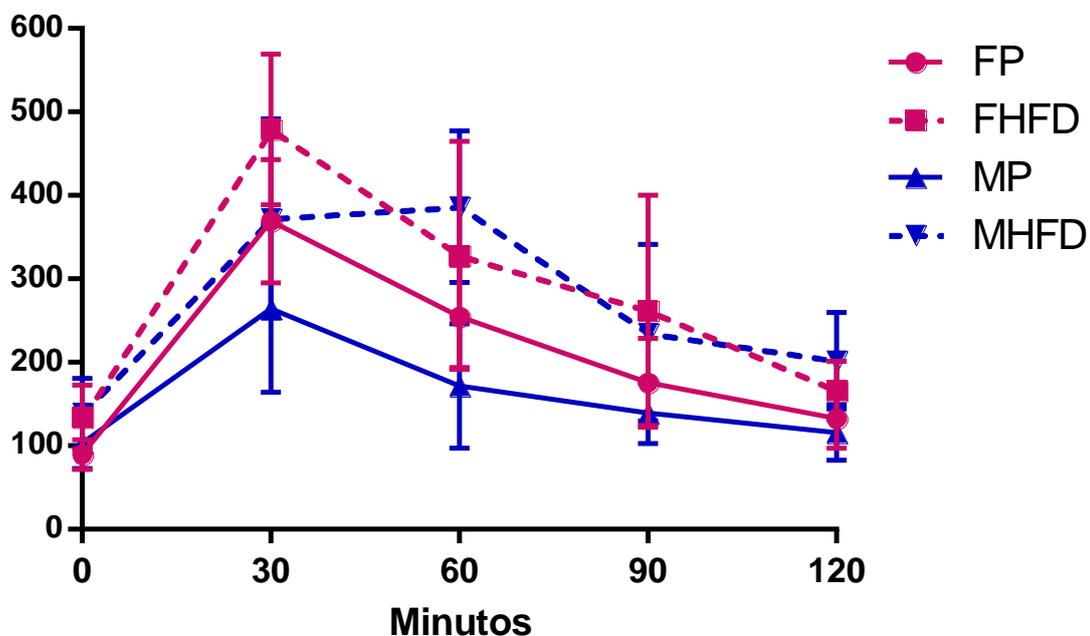


Figura 16: Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 8. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm e $n = 10$ por grupo.

8 semanas

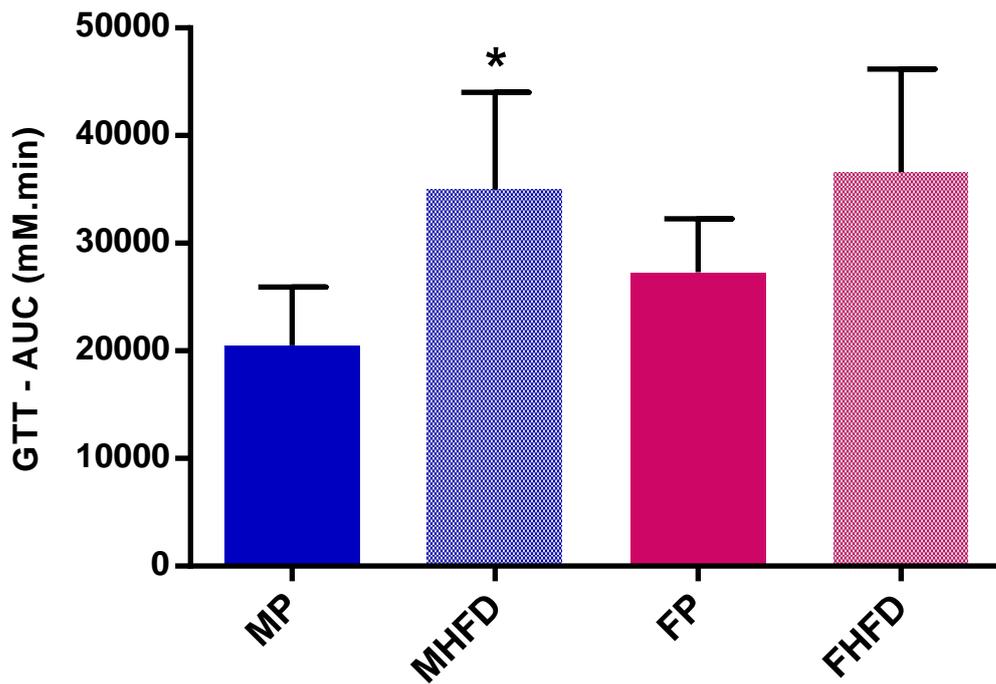


Figura 17: OGTT da área sobre a curva dos animais após 8 semanas de HFD ou dieta padrão. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. * representa significância de diferença entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta hiperlipídica com $p < 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

OGTT Semana 12

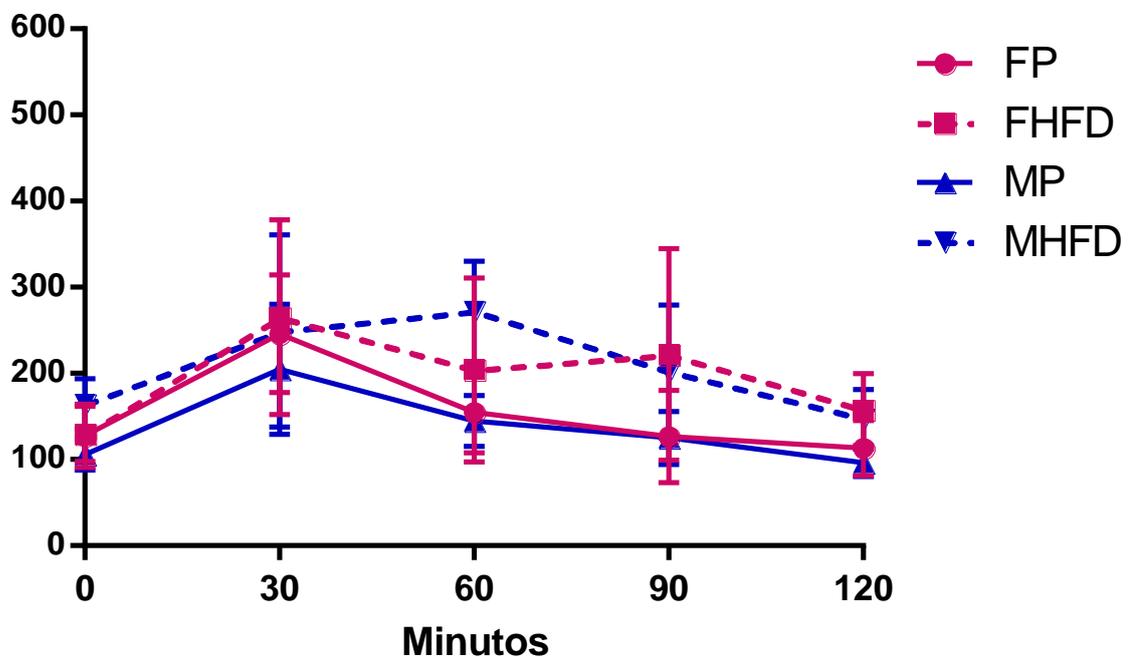


Figura 18: Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 12. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm e $n = 10$ por grupo.

12 semanas

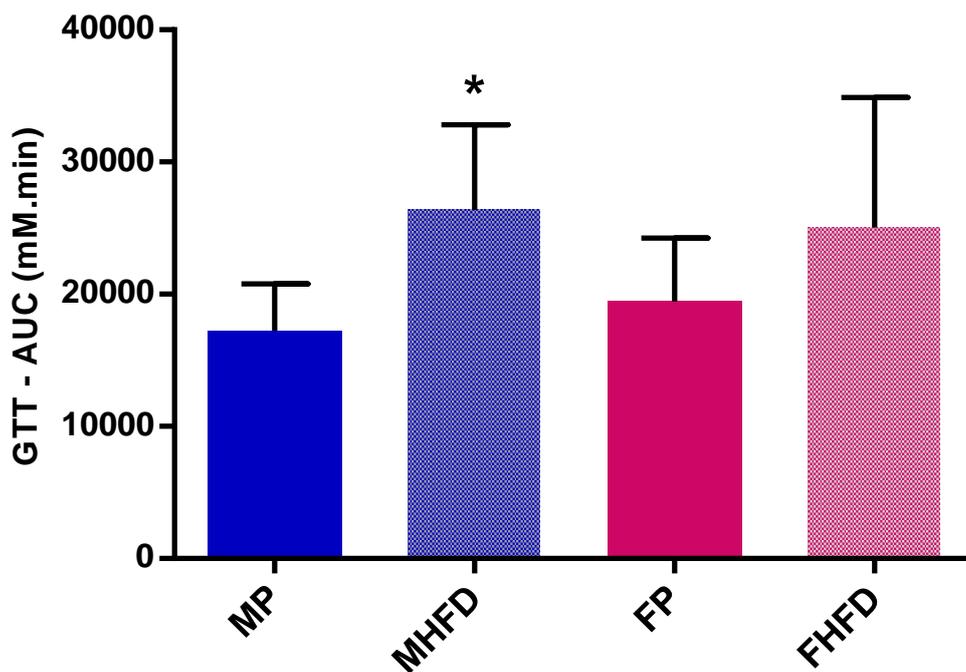


Figura 19: OGTT da área sobre a curva dos animais após 12 semanas de HFD ou dieta padrão. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. * representa significância de diferença entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta hiperlipídica com $p < 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

OGTT Semana 16

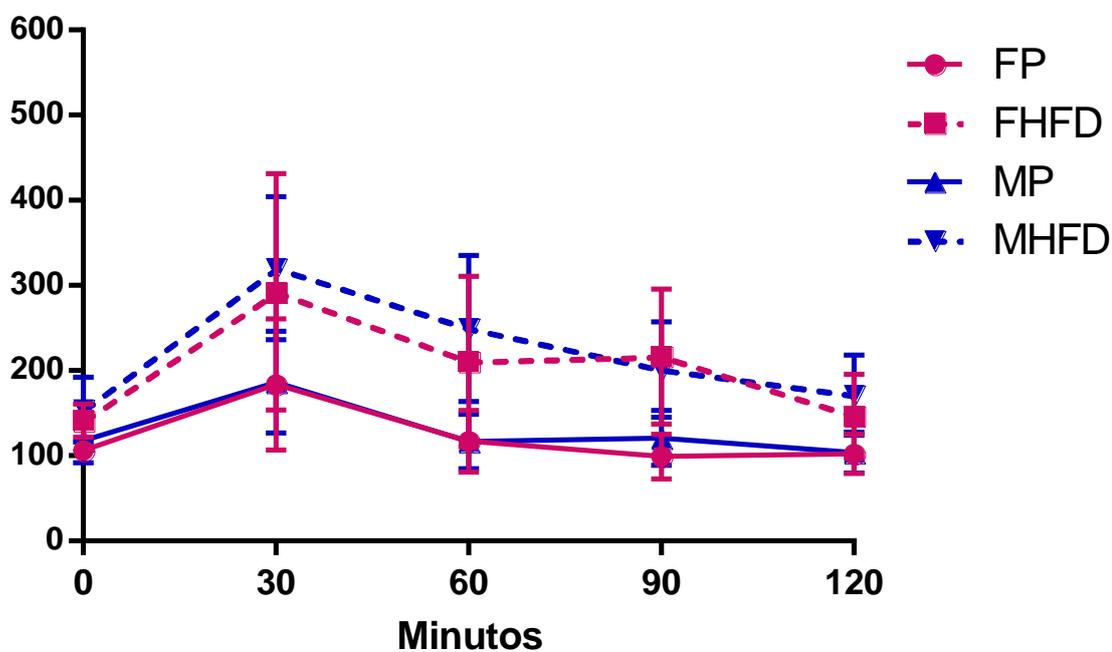


Figura 20: Comportamento da curva do OGTT dos animais na semana 16. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm e $n = 10$ por grupo.

16 semanas

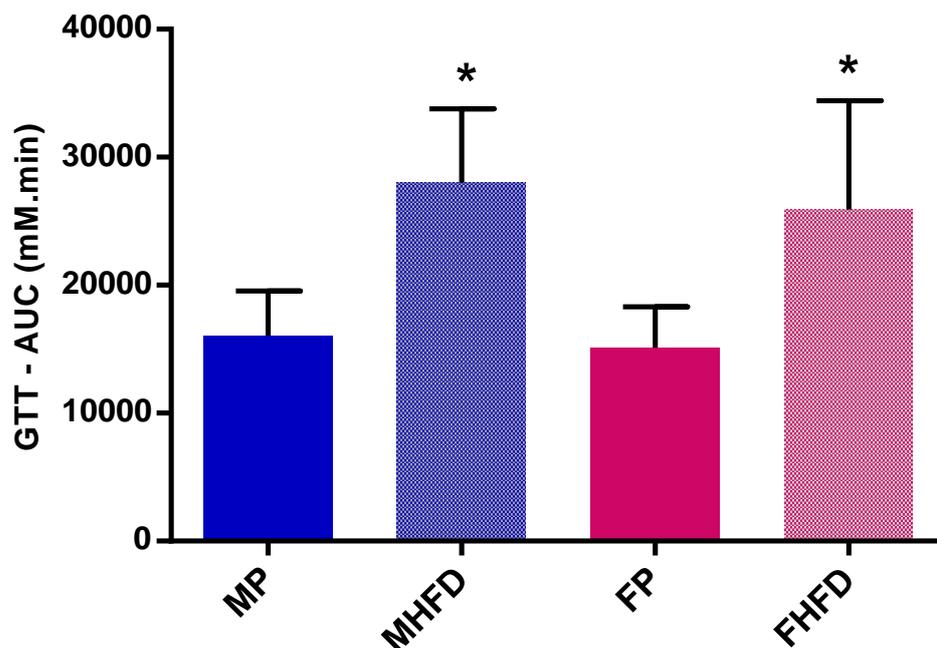


Figura 21: OGTT da área sobre a curva dos animais após 16 semanas de HFD ou dieta padrão. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. * representa significância de diferença entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta hiperlipídica com $p < 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

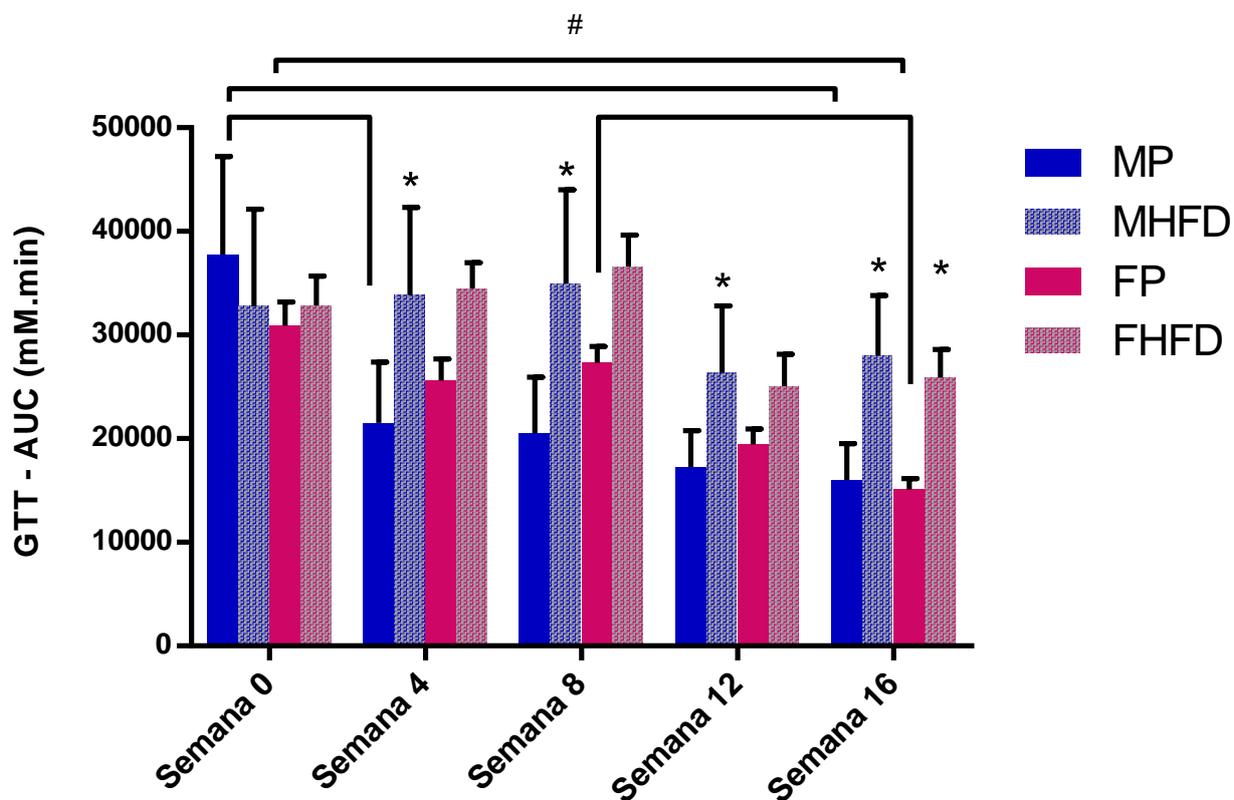


Figura 22: OGTT durante as 16 semanas de tratamento. As barras verticais correspondem aos valores das médias da área sob a curva do teste. Resultados expressos em média \pm epm. * representa significância de diferença entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta hiperlipídica e # a diferença entre a mesmo grupo em semanas diferentes com $p < 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

5.4 Triglicerídeos Plasmáticos

De acordo com os dados obtidos na mensuração de triglicerídeos plasmáticos dos animais, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao gênero do animal nem em relação à dieta aplicada, apesar da tendência de aumento no grupo MHFD. Conforme mostra o gráfico a seguir (Figura 23), os machos de dieta padrão mantiveram uma média de $108,9 \pm 39,3$ mg/dL de triglicerídeos, os machos em dieta hiperlipídica mantiveram $131,7 \pm 35$ mg/dL. Nas fêmeas, da mesma forma, não houve diferença significativa, sendo as fêmeas em dieta padrão com valores de $89,2 \pm 31,6$ mg/dL e as fêmeas da dieta hiperlipídica $91,2 \pm 18,4$ mg/dL.

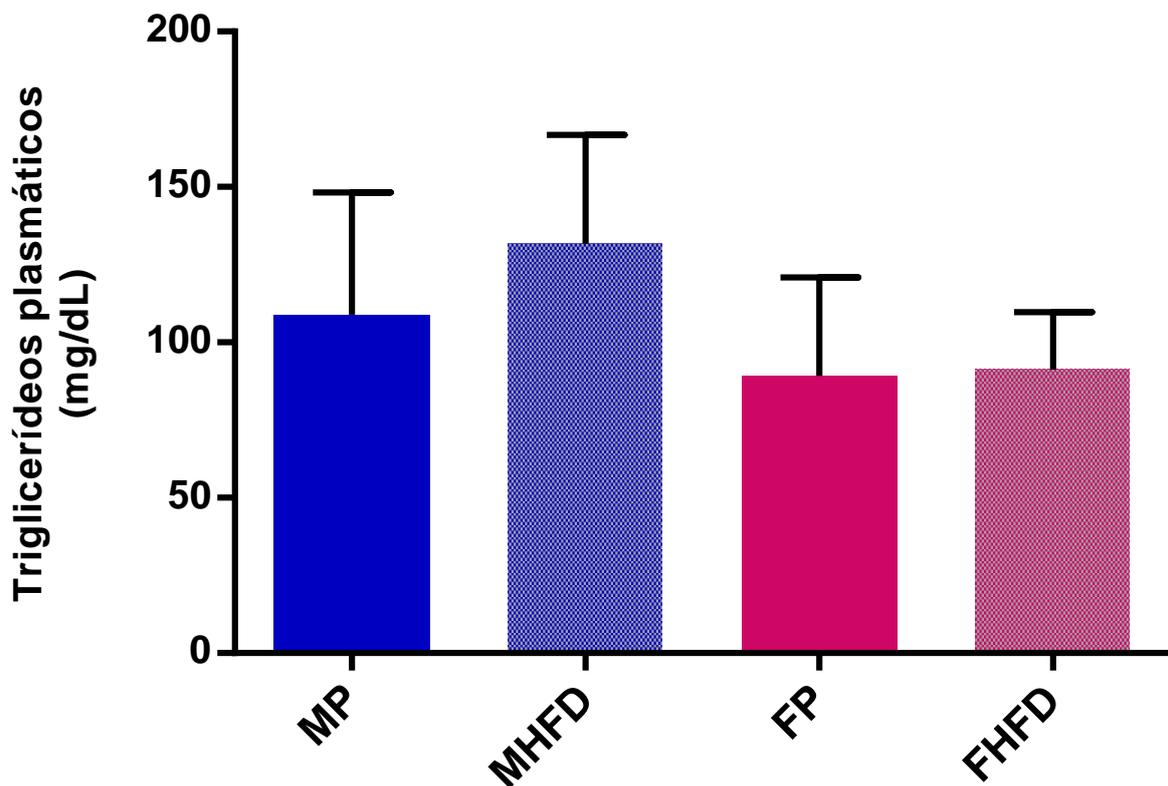


Figura 23: Triglicerídeos plasmáticos dos animais ao final das 16 semanas de tratamento. Resultados expressos em média \pm epm. $P > 0,05$ e $n = 10$ por grupo.

5.5 Colesterol Total Plasmático

Para o colesterol plasmático, não houve diferença estatisticamente significativa, para a mesma dieta, entre machos e fêmeas, porém, para ambos os sexos a dieta HFD resultou no aumento dos valores de colesterol plasmático. Machos da Dieta Hiperlipídica apresentaram aumento do colesterol ($166,6 \pm 25$ mg/dL) em relação aos machos da dieta padrão ($83,9 \pm 17,9$ mg/dL), da mesma forma que as Fêmeas da Dieta Hiperlipídica apresentaram aumento ($155,54 \pm 34,2$ mg/dL) em relação às fêmeas de dieta padrão ($84,4 \pm 17,9$ mg/dL) (figura 24).

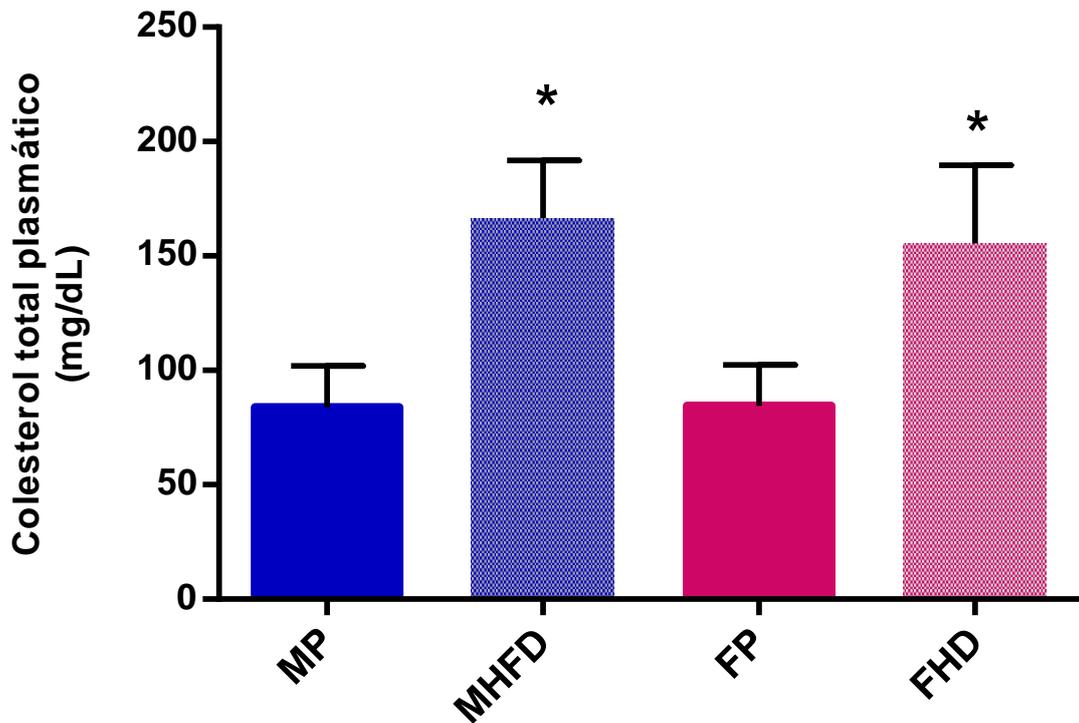


Figura 24: Colesterol Plasmático Total. Resultados expressos em média \pm epm, n= 5 por grupo. * representa valores significativos em relação à dieta padrão ($p < 0,0001$).

5.6 Glicemia

Quanto a avaliação da glicose de jejum, ao final das 16 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às diferentes dietas dos grupos dos machos, ou seja, houve aumento da glicemia de jejum nos animais machos submetidos à HFD ($169,8 \pm 7,4$ mg/dL) em relação aos animais machos sujeitos à dieta padrão ($157,8 \pm 4,5$ mg/dL), indicando, portanto, sinais de resistência à insulina induzidos pela dieta. Quando comparados os valores das diferentes dietas nas fêmeas, dieta padrão ($149,9 \pm 10,7$) com HFD ($153,5 \pm 11,8$), não houve diferença, conforme mostra a Figura 25.

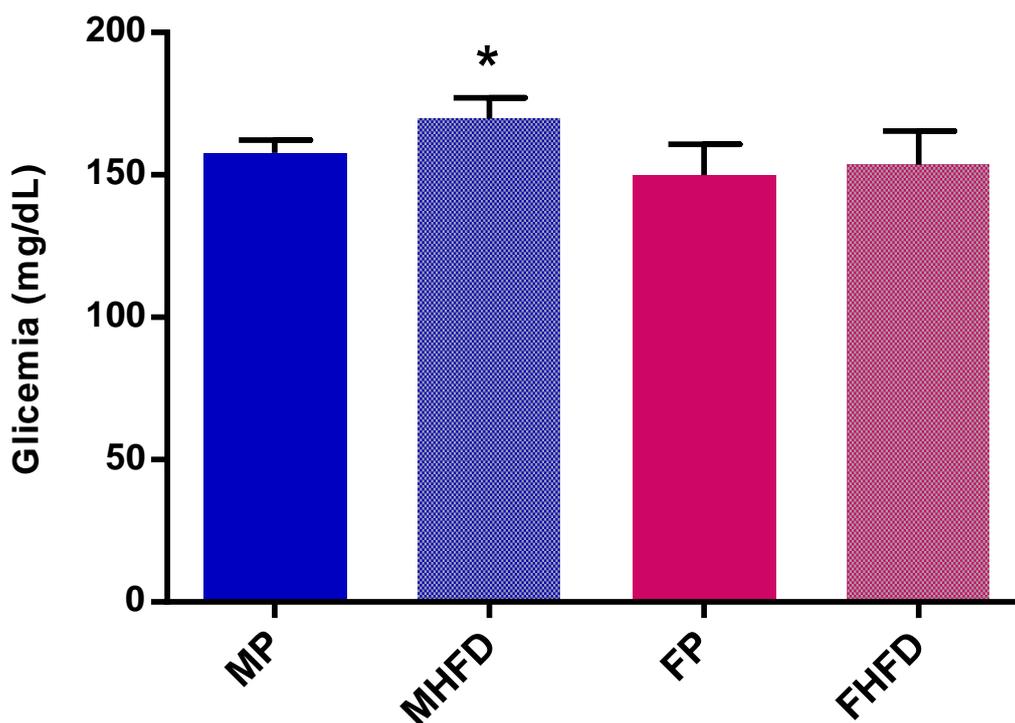


Figura 25: Glicemia de jejum ao final das 16 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm epm. $P < 0,05$ e $n = 8$ por grupo.

5.7 TBAR-S no fígado

A medida de TBAR-S, mostrada na figura 26, está apresentada em equivalentes de malondialdeído (MDA). Tais valores foram conseguidos através na análise no tecido hepático dos animais. Quando comparados os grupos tanto pela dieta quanto pelo sexo do animal não há diferença entre nenhum deles.

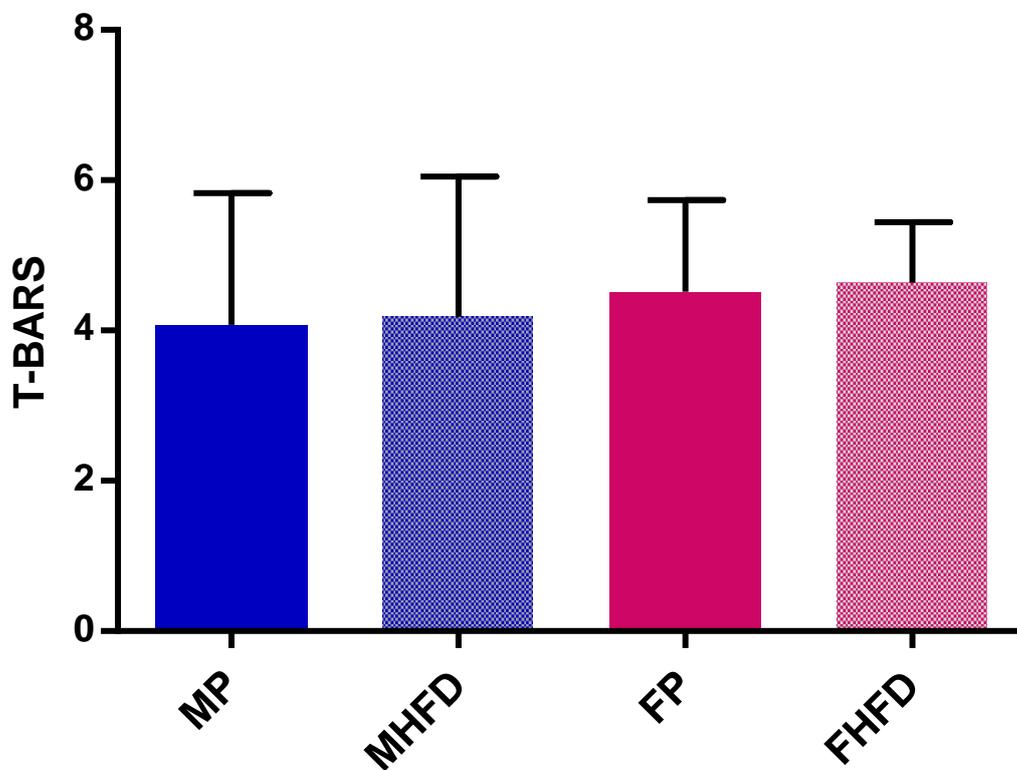


Figura 26: TBARS no fígado dos animais. Resultados em eq. de MDA e expressos em média \pm epm, n= 5-8 por grupo.

5.8 Expressão de HSP70 nos músculos gastrocnêmio e sóleo e tecido hepático

Em relação à expressão de HSP70 no músculo esquelético foi realizada a avaliação no gastrocnêmio (tecido com metabolismo mais glicolítico) e no músculo sóleo (tecido com metabolismo mais oxidativo) dos animais. Na avaliação do conteúdo de HSP70 no gastrocnêmio não se observou interferência da dieta sobre a expressão de HSP, apesar de nos machos se mostrar uma tendência a esse aumento. Apesar de não significativo (estatisticamente), o gastrocnêmio das fêmeas parece apresentar, em condições normais (grupo dieta padrão), uma menor expressão de HSP70. Além disso, as fêmeas mostram um valor significativamente menor, em relação aos machos, quando submetidos à HFD, conforme mostra a figura 27.

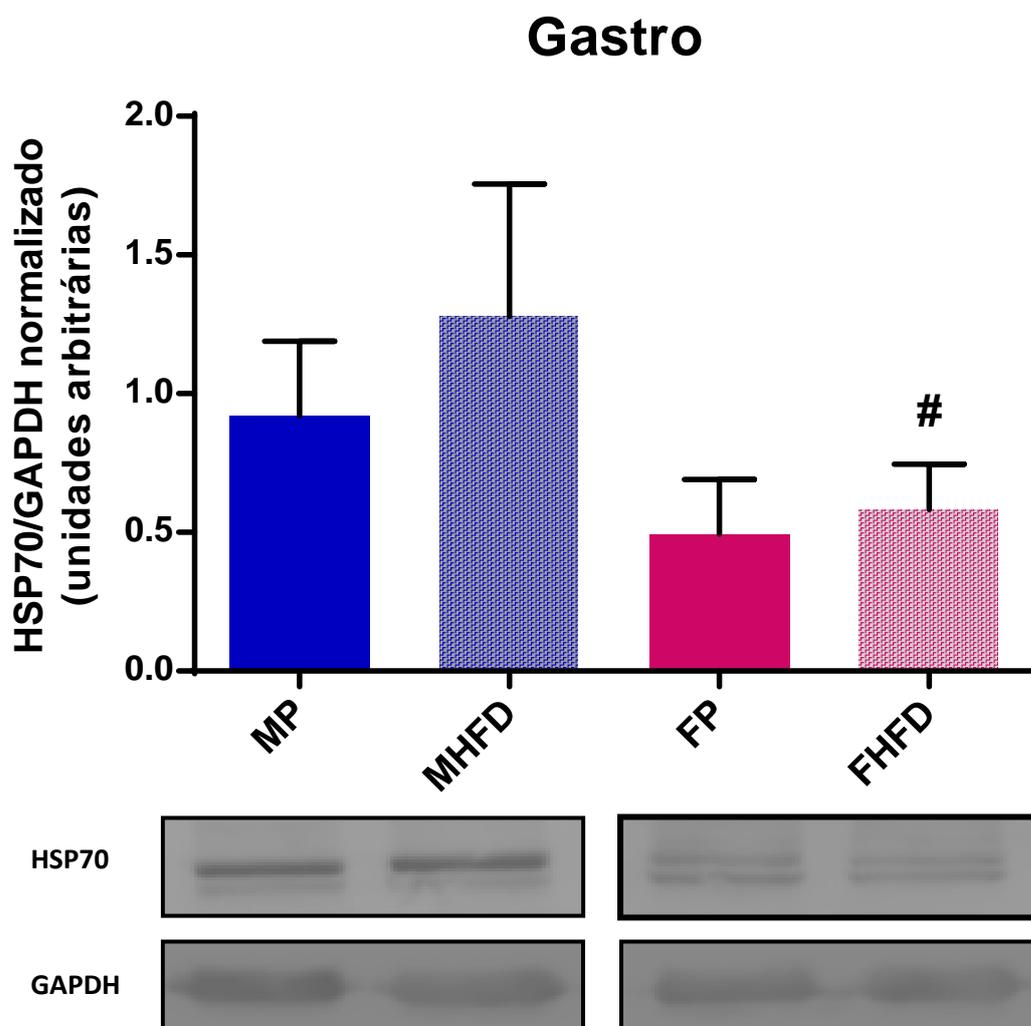


Figura 27: Imunodeteção de HSP70 no músculo gastrocnêmio dos animais normalizados por GAPDH. Resultados expressos em média \pm epm, n= 6 por grupo. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão.

Na avaliação do conteúdo da HSP70 no músculo sóleo, da mesma forma que no gastrocnêmio, as fêmeas mostram um valor significativamente menor do que os machos (submetidos à HFD). Similarmente a tendência observada no gastrocnêmio, há um aumento significativo do conteúdo de HSP70 nos animais machos submetidos a dieta hiperlipídica. Já nas fêmeas, esse estímulo ao aumento da HSP70 induzido pela dieta hiperlipídica, não ocorre, conforme mostra a figura 28.

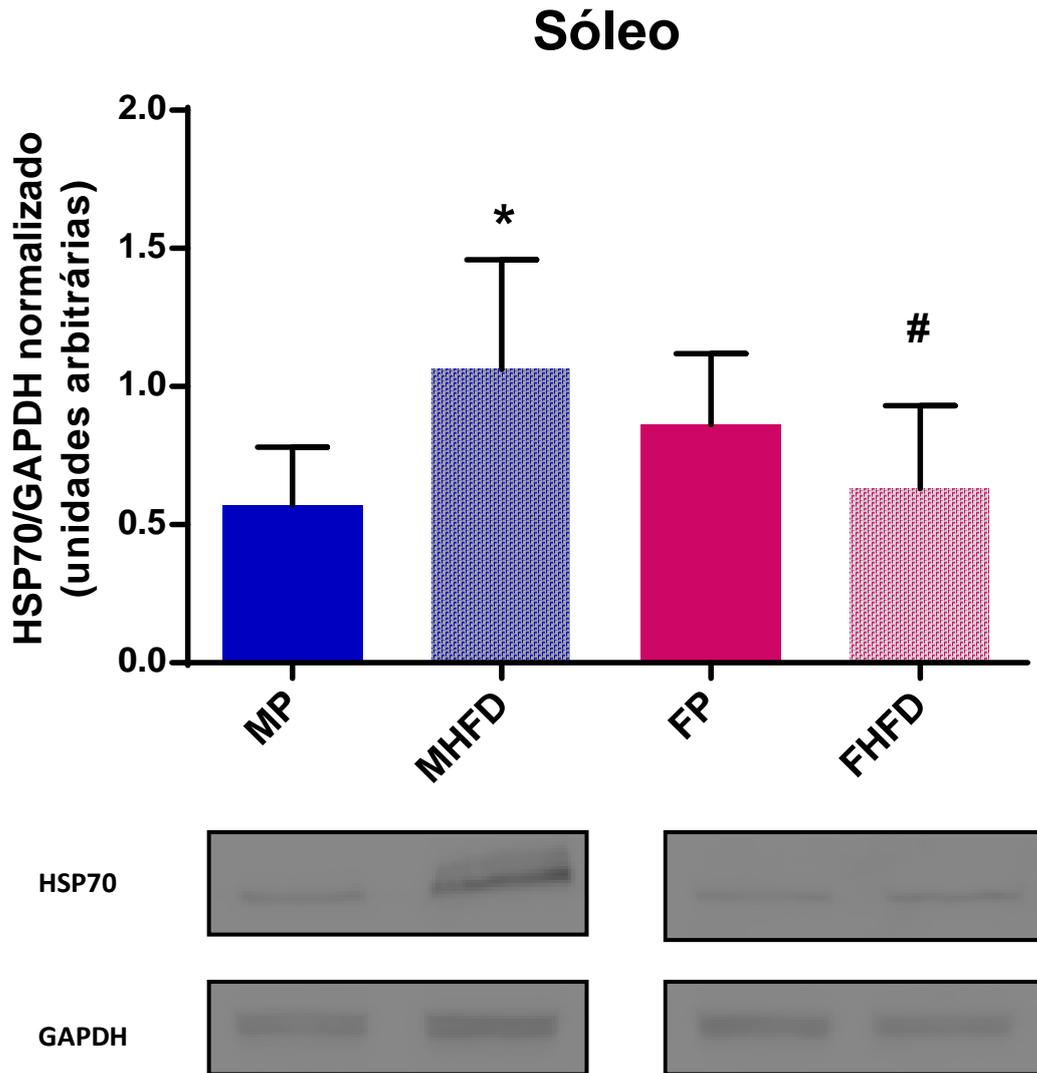


Figura 28: Imunodeteção de HSP70 no músculo sóleo dos animais normalizados por GAPDH. Resultados expressos em média \pm epm, n= 10-13 por grupo. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão, # representa valores significativos em relação à mesma dieta comparando machos e fêmeas.

Na avaliação do conteúdo da HSP70 no fígado, não foi observado efeito da dieta sobre um aumento da HSP70 quando comparadas as dietas e, da mesma forma, não foi encontrada diferença quando comparados machos com fêmeas, conforme mostra a figura 29.

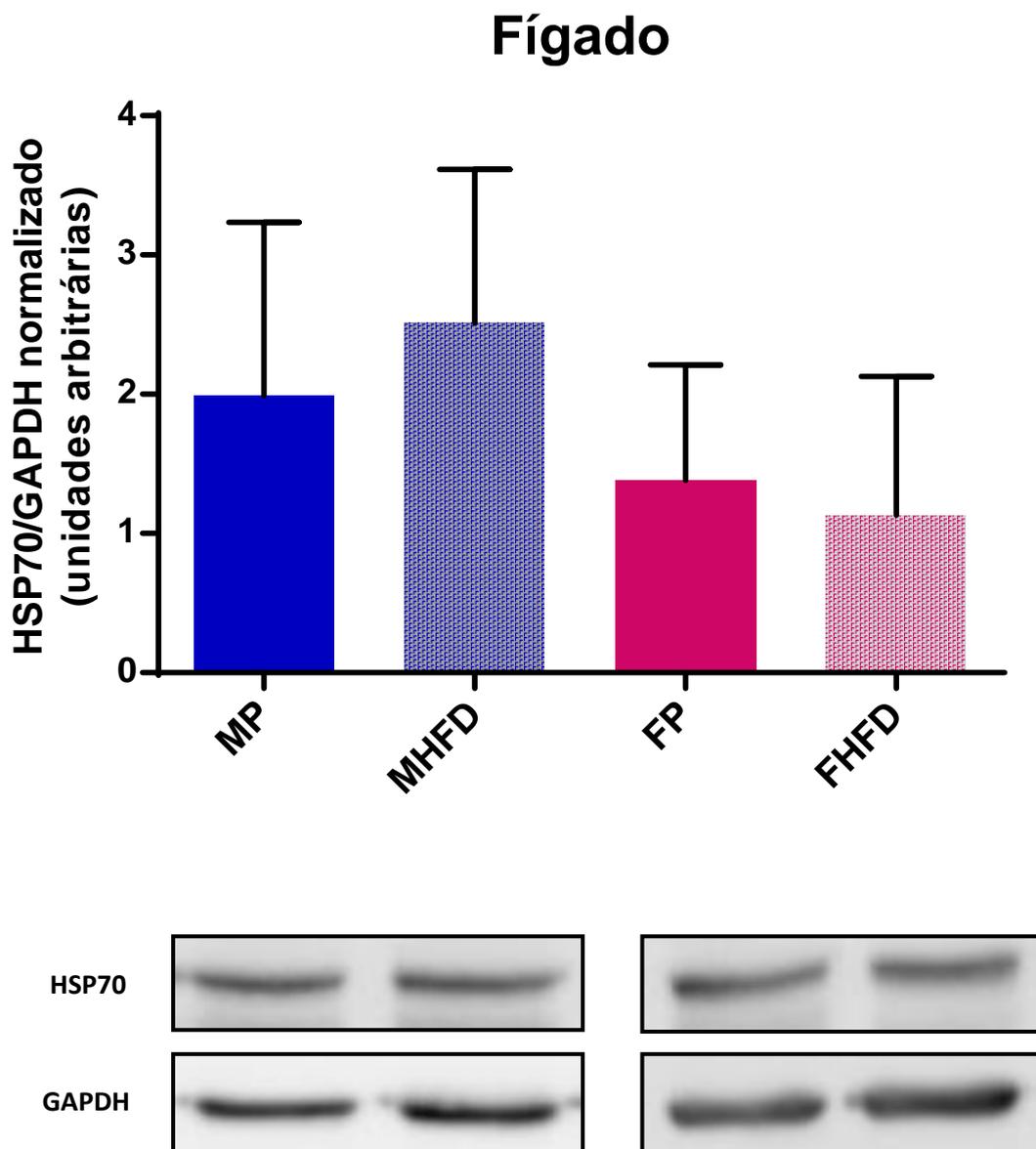


Figura 29: Imunodeteção de HSP70 no fígado dos animais normalizados por GAPDH. Resultados expressos em média \pm epm, n= 10-13 por grupo. * representa valores significativos em relação ao grupo que recebeu dieta padrão, # representa valores significativos em relação à mesma dieta comparando machos e fêmeas.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, comparamos as respostas metabólicas e moleculares de animais (machos e fêmeas) submetidos a uma dieta hiperlipídica. Confirmamos que existem diferenças importantes que, aparentemente, conferem às fêmeas uma proteção metabólica exclusiva. Por exemplo, o desenvolvimento da resistência à insulina, induzido pela HFD, ocorre muito antes em machos do que em fêmeas. Essas diferenças podem ser observadas tanto quando se compara o teste de tolerância oral à glicose quanto a glicemia de jejum. Nossa hipótese inicial, era de que a expressão mais elevada de HSP70, poderia estar conferindo uma melhor sensibilidade à insulina, e que esta poderia estar maior em fêmeas do que em machos. No entanto, nossos dados demonstraram que, ao contrário, fêmeas apresentam uma menor expressão em condições normais (dieta padrão) e respondem menos ao estresse metabólico induzido pela dieta hiperlipídica. Na discussão a seguir, apresentaremos diversas evidências, baseado em nossos resultados e de outros grupos, que sugere o papel protetor do estrogênio como principal mediador destas diferenças metabólicas. Ao fim, apresentaremos nossa principal hipótese, na forma de uma figura, que compara aspectos metabólicos, inflamatórios e moleculares, entre machos e fêmeas.

Inicialmente, em relação à dieta e ao desenvolvimento da obesidade nos grupos experimentais estudados, observa-se um aumento no ganho de peso em todos os animais submetidos à dieta HFD em relação à dieta padrão, o que já era esperado, tendo em vista que o consumo calórico em quilojoules (kJ) destes animais passa a ser muito maior do que em relação aos seus controles (animais em dieta padrão). Ainda pode-se observar um ganho maior do peso em animais machos quando comparados às fêmeas, nos grupos alimentados com HFD.

Uma importante característica da obesidade e do processo de desenvolvimento de resistência à insulina é a dislipidemia que se observa em animais submetidos à uma dieta hiperlipídica (Klop, 2013). Nessas condições, um aumento nos níveis de ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos, liberados pelo tecido adiposo em expansão, pode ser encontrado (Teng, 2014). Atualmente, sabe-se que diversos mediadores lipídios encontrados no plasma, em especial de forma crônica, podem promover a ativação de vias pró-inflamatórias através de vias de sinalização independentes e dependentes de receptores de membrana chamados de *toll-like receptors-4* (TLR-4), e os efetores a

jusante incluem moléculas pró-inflamatórias bem conhecidas, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (Teng, 2014 e Keane, 2017).

Nosso modelo de dieta confirmou a presença de dislipidemia nos animais através do aumento expressivo do colesterol plasmático total dos animais submetidos à HFD, porém sem haver (pelo menos até a décima sexta semana de dieta) um aumento detectável nos triglicerídeos plasmáticos. Apesar de não ter havido diferença no aumento do colesterol total entre machos e fêmeas, a mensuração deste composto foi realizada (por limitações logísticas) apenas ao final da décima sexta semana de dieta, não permitindo avaliar em qual momento a dislipidemia desses animais teve início. Diversos trabalhos vêm demonstrando a importância do 17β -estradiol (E2) no metabolismo lipídico. Camporez (2013) demonstrou, em fêmeas ovariectomizadas (OVX) e suplementadas com E2, que este hormônio tem um papel fundamental na regulação do perfil lipídico de camundongos, onde fêmeas OVX suplementadas com E2 parecem melhorar tanto o armazenamento quanto na utilização de TG em relação aos animais sem a reposição hormonal. Além disso, Stanimirovic (2016) verificou um aumento de FAT/CD36 (um importante transportador de ácidos graxos da membrana celular) no fígado de animais submetidos à dieta hiperlipídica e sugeriu que a presença elevada de E2 influenciou na translocação deste transportador para a membrana plasmática, favorecendo a captação de ácidos graxos da circulação para as células musculares e fígado. Além disso, considerando que o E2 também melhora a eficiência da oxidação lipídica e da função mitocondrial, através do aumento da UCP-1, Cidea, e PRDM16 (Camporez, 2013), este hormônio torna, não só o armazenamento dos lipídios no tecido adiposo mais eficaz, mas também aperfeiçoa a utilização desses (oxidação) pelas mitocôndrias, reduzindo o acúmulo de lipídeos potencialmente tóxicos (como a ceramida e o DAG) que podem sabidamente levar a resistência à insulina e disfunção celular. De fato, a importância do E2 no metabolismo celular (capacidade mitocondrial oxidativa) é facilmente observada em fêmeas OVX, onde o consumo de oxigênio (VO_2), produção de CO_2 e produção de calor caem abruptamente. A simples reposição hormonal (E2) em fêmeas OVX, restaura todos estes parâmetros.

Conforme o descrito na introdução deste trabalho, a obesidade tem como característica uma inflamação crônica de baixo grau (Krause et al, 2012) que através do aumento de mediadores inflamatórios e do desbalanço redox, é capaz de induzir a resistência à insulina nos tecidos periféricos (Hotamisligil, 1993). Apesar de não ter

sido possível a confirmação do aumento do estresse oxidativo nos animais HFD (T-BARS no fígado) ou da inflamação, a hipótese de que o estresse oxidativo esteja de fato ocorrendo juntamente com a inflamação, não pode ser descartada. De fato, a dislipidemia observada pelo aumento do colesterol nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, seguida pela lipotoxicidade causada da obesidade, são causas já confirmadas de desbalanço redox (Newsholme, 2012).

Avaliando-se o desenvolvimento da resistência à insulina nos animais machos em relação às fêmeas, observa-se, a partir dos resultados do OGTTs, uma resistência aumentada pela dieta em machos já a partir da quarta semana de HFD. Já nas fêmeas esse início de resistência foi observado apenas a partir da décima sexta semana de HFD. O fato de as fêmeas terem mostrado o início da resistência à insulina mais tardia do que os machos nos mostra que estas estão mais protegidas dos efeitos metabólicos da HFD. Esses resultados corroboram com outros estudos que mostram que o sexo feminino tem um efeito favorável sobre a sensibilidade à insulina, apesar de mulheres apresentarem normalmente maior adiposidade em relação aos homens (Garaulet, 2000). Outro estudo nos mostra que a sensibilidade à insulina é maior em mulheres na pré-menopausa em comparação com homens, quando pareados por idade. Além disso, doenças cardiovasculares relacionadas ao metabolismo e ao DMT2 são menos frequentes em mulheres (Donahue, 1997). Os estudos que investigam as diferenças de gênero no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina atribuem tais diferenças principalmente à liberação de hormônios sexuais, onde o E2 seria protetor do desenvolvimento da resistência à insulina (Geer 2009; Camporez, 2013; Mu, 2011 e Stice, 2011).

Diversos estudos, investigando estas diferenças, tanto em humanos como em animais, observaram que o E2 desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose e do metabolismo, conferindo uma proteção contra a hiperglicemia em modelos animais de diabetes, a partir da diminuição da produção hepática de glicose e do aumento do transporte de glicose no músculo (Louet, 2004; Moran, 2008; Geer, 2009 e Mu, 2011). Outros estudos mostram, inclusive, uma diminuição na incidência de DMT2 pela intervenção com estrogênio (Kanaya et al, 2003). De fato, estudos clínicos e experimentais revelaram que o E2 regula as funções celulares não apenas no sistema reprodutivo, mas também em outros sistemas, como o sistema nervoso e cardiovascular.

Os mecanismos pelos quais o estrogênio parece exercer proteção contra o desenvolvimento da resistência à insulina ainda não estão bem compreendidos, porém há vasta investigação a cerca do assunto na literatura e por meio do qual podemos explorar a ação deste hormônio em nossa discussão. O E2 parece ter ação em tecido muscular, adiposo e hepático favorecendo à sensibilidade à insulina, tanto pela sua via de ação clássica (via ligação com seu receptor intracelular), quanto pela sua via não-clássica (a partir de receptores na membrana celular). Inicialmente, em uma via dependente da ligação do E2 ao seu receptor intracelular, esse hormônio é capaz de influenciar a expressão da Caveolina-3, um tipo de proteína constituinte das cavéolas na membrana plasmática, que são invaginações da membrana celular que contém estruturas essenciais para o funcionamento da cascata de sinalização à insulina na célula, como a ativação do receptor de insulina (IR) e ativação/translocação/fusão do GLUT4 (Cohen, 2003). Tanto a estrutura da cavéola como o aumento da expressão da Caveolina 3 (tipo de caveolina mais expressa em músculo esquelético), estão associadas a uma sensibilidade à insulina melhorada. Tal efeito parece ser mediado pela ligação do E2 ao seu receptor (Ruiz, 2009; Cohen, 2003). As Caveolinas 3 facilitam a translocação do GLUT4 para as cavéolas de uma forma ainda não completamente elucidada. O aumento da expressão desta também está associado ao aumento da correta fosforilação do IR, em seus resíduos de tirosina, em resposta à presença de insulina (Ruiz, 2009). Assim o E2 parece ser protetivo contra os efeitos de uma dieta hiperlipídica sobre a resistência à insulina, por facilitar sua ativação e cascata de sinalização.

Além de sua influência na sinalização direta da insulina (estabilizando a sinalização deste hormônio), o E2 também tem papel indireto importante em sua via clássica de ação, ou seja, através de sua ligação com seu receptor. Nesta via, a facilitação da sinalização da insulina ocorre através do aumento da fosforilação da AKT pela via da PI3K, promovendo, o aumento da translocação de GLUT4 para a membrana a fim de induzir uma eficiente captação de glicose pelo músculo esquelético (Camper-Karby et al, 2001). Assim, de uma forma dependente da via clássica de ação do E2, esse hormônio permite a manutenção da resposta normal à insulina no tecido.

A obesidade (progressiva expansão do tecido adiposo), como indutora da inflamação crônica de baixo grau, apresenta-se por elevados níveis de ativação do NF- κ B, sendo esse um dos principais mediadores inflamatórios intracelulares. Diversos mecanismos antiinflamatórios funcionam a partir da inibição desse fator nuclear. A pAKT, por exemplo, é capaz de promover o bloqueio desse mediador inflamatório que

também pode ser, pelo menos em parte, promotor da resistência à insulina (Camper-Kirby, 2001). O NF- κ B é indutor da iNOS, enzima responsável por um aumento na produção excessiva de óxido nítrico (NO) em condições inflamatórias. A ativação de enzimas constitutivas (nNOS e eNOS) e a conseguinte produção de NO (níveis fisiológicos), é fundamental para diversos processos celulares normais (vasodilatação, captação de glicose, formação de memória, resposta imunológica, entre outras). No entanto, quando a produção é muito elevada, esse gás pode apresentar efeitos citotóxicos. O aumento exacerbado da produção de NO, via ativação da iNOS, também está diretamente associado à resistência à insulina, sendo que já foi reportado na literatura um aumento da produção de NO em animais submetidos à dieta hiperlipídica. (Stanimirovic, 2016). O NO, quando em excesso no meio intracelular, será responsável pela nitrosilação de resíduo de tirosina do IR (Charbonneau, 2010). Sendo assim, a pAKT será indutora direta da sensibilidade à insulina pela sua ação na translocação do GLUT4 para a membrana e ainda será anti-resistência à insulina por seu papel na inibição no NF- κ B e da produção excessiva de NO no meio intracelular. De fato, a produção de NO (medida pela concentração de nitratos e nitritos plasmáticos, tNOx) é muito maior em ratos machos submetidos a HFD do que em fêmeas, estas, inclusive, não aumentam de forma significativa o tNOx (Stanimirovic, 2016).

O presente estudo ainda traz mais um dado importante para a comprovação da resistência à insulina estabelecida nos machos de forma mais significativa do que nas fêmeas, os dados relacionados à glicose de jejum. No gráfico da figura 25 é possível ver aumento da glicose de jejum dos machos em HFD em comparação aos machos em dieta padrão, porém o mesmo não ocorre com as fêmeas. Novamente o papel do estrogênio no desenvolvimento à insulina pode ser a questão chave para explicar os dados obtidos.

Quanto aos efeitos da dieta hiperlipídica na expressão da HSP70 nos diferentes tecidos, observa-se (figuras 27 e 28) que a expressão de HSP70 em tecido muscular esquelético (especialmente o sóleo), aumenta nos animais machos submetidos à HFD, sem haver a mesma influência da dieta nas fêmeas. Não se observa, apesar da clara tendência, diferenças na expressão da HSP70 em gastrocnêmios, quando comparando machos e fêmeas de dieta padrão. No entanto, quando comparamos os gêneros, no tratamento com HFD, tem-se um aumento da expressão dessas proteínas nos machos em relação ao grupo de mesma dieta nas fêmeas, ou seja, a dieta HFD induziu, aparentemente, um aumento da HSP70 nos machos, mas não afetou a expressão nas fêmeas. No músculo sóleo, esta diferença fica ainda mais clara. Observa-se, nesse

tecido, uma influência direta da dieta HFD nos machos para o aumento da expressão da HSP70 em comparação aos machos de dieta padrão, diferença esta que também não é observada nas fêmeas. A diferença na resposta da HSP70 frente à dieta nos diferentes tipos de músculos já foi evidenciada previamente, porém utilizando o choque térmico como agente estressor (estresse agudo). Estudos indicam que os níveis basais de HSP70 diferem entre os tipos de fibras musculares com os músculos oxidativos de contração lenta, que apresentam maior expressão constitutiva de HSP70 do que os músculos glicolíticos de contração rápida. Em contraste, os músculos de contração rápida possuem maior capacidade de indução de HSP70 em resposta a estressores fisiológicos como o calor e o exercício (Gupte, 2008). Os nossos achados demonstraram que, com a influência da dieta hiperlipídica, os músculos de contração lenta (sóleo) mostram resposta significativa maior ao estresse, ao contrário do músculo de contração rápida (gastrocnêmio), que mostrou diferença apenas em relação ao gênero avaliado. Tal divergência dedica-se principalmente ao fato de os estudos anteriores terem feito uso de estresse agudo (choque térmico, com potencial anti-inflamatório) para a indução da expressão das HSPs, e, no caso deste estudo, utilizamos um tratamento de 16 semanas para a indução do estresse metabólico no organismo dos animais (com potencial pró-inflamatório).

Quanto às diferenças encontradas entre machos e fêmeas na expressão das HSP70, frente ao tratamento de 16 semanas de HFD ou frente à dieta padrão, outros estudos suportam nossos achados de uma resposta aumentada da expressão dessas proteínas em machos em relação às fêmeas. Gillum, em 2013, avalia células mononucleares do sangue periférico e mostra que homens e mulheres têm os mesmos valores de HSP72 em repouso, o que também foi observado em nossos experimentos, já que não houve diferença significativa entre machos e fêmeas de dieta padrão como podemos ver nas figuras 27, 28 e 29. Ainda, segundo o mesmo estudo, homens respondem ao exercício com um aumento significativamente maior do que o aumento de HSP72 observado nas mulheres, também corroborando nossos achados, conforme as figuras 27 e 28.

Conforme o descrito na introdução e ilustrado pela figura 1, Archer, em 2017, mostra um gráfico em que hipotetiza o comportamento da expressão de HSP70 ao longo do desenvolvimento do DMT2. Nesse gráfico, é possível perceber que a expressão de HSP70 tende a aumentar durante os estágios iniciais da resistência à insulina (como uma tentativa de restabelecer a sensibilidade e diminuir a inflamação de baixo grau). No

entanto, a partir do momento em que a resistência à insulina se estabelece (Diabetes), a expressão de HSP72 no músculo esquelético diminui, deixando a célula desprotegida e mais suscetível ao desenvolvimento da resistência à insulina, inflamação e doenças associadas. (Archer, 2017). Assim, como podemos observar nos machos, uma aumentada área sobre a curva do OGTT, já a partir da quarta semana de dieta, poderíamos sugerir, baseado na elevação da expressão de HSP70 encontrada, que nossos animais machos estariam na fase representada pela primeira janela de tempo sugerida por Archer em 2017, onde o diabetes ainda não estava estabelecido.

A expressão das HSP70 pode ser influenciada por diversos fatores no meio intracelular e extracelular. O E2, por exemplo, parece responsável, conforme evidencia Gillum em 2013, por uma maior estabilização da membrana plasmática, dessa forma evitando dano a membrana e diminuindo processos de formação de espécies reativas de O₂ no meio intracelular (Paroo, 2001), e assim, diminuindo a necessidade da ativação e formação de chaperonas moleculares como a HSP70. O estrogênio, por sua propriedade antioxidante, confere maior resistência ao estresse oxidativo em camundongos e aumenta a expressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Baba, 2005). Além disso, em condições de estresse oxidativo, constatou-se que o estrogênio protege a função e a sobrevivência das células β pancreáticas (Louret, 2004).

As vias inflamatórias, conforme supra descrito, também estarão inibidas tanto diretamente pela pAKT, como indiretamente pela diminuição da lipotoxicidade que a presença do E2 é capaz de efetivar. A inflamação também é indutora da expressão de HSP70 no meio intracelular (Karpe e Tikoo, 2014), justificando dessa forma, a diminuição da necessidade de expressão de HSP70 que encontramos nas fêmeas em relação aos machos em músculo esquelético. A via de expressão de HSP70 é dependente da produção de NO, ou seja, o aumento da produção de NO pode, também estar relacionada ao aumento da expressão de HSP70 (Krause, 2015) encontrado em nosso trabalho. Através de sua influência sobre a fosforilação da AKT, o E2 é capaz de inibir o NF- κ B e dessa forma inibir a iNOS, evitando assim, uma produção aumentada de NO e um consequente aumento da expressão da HSP70.

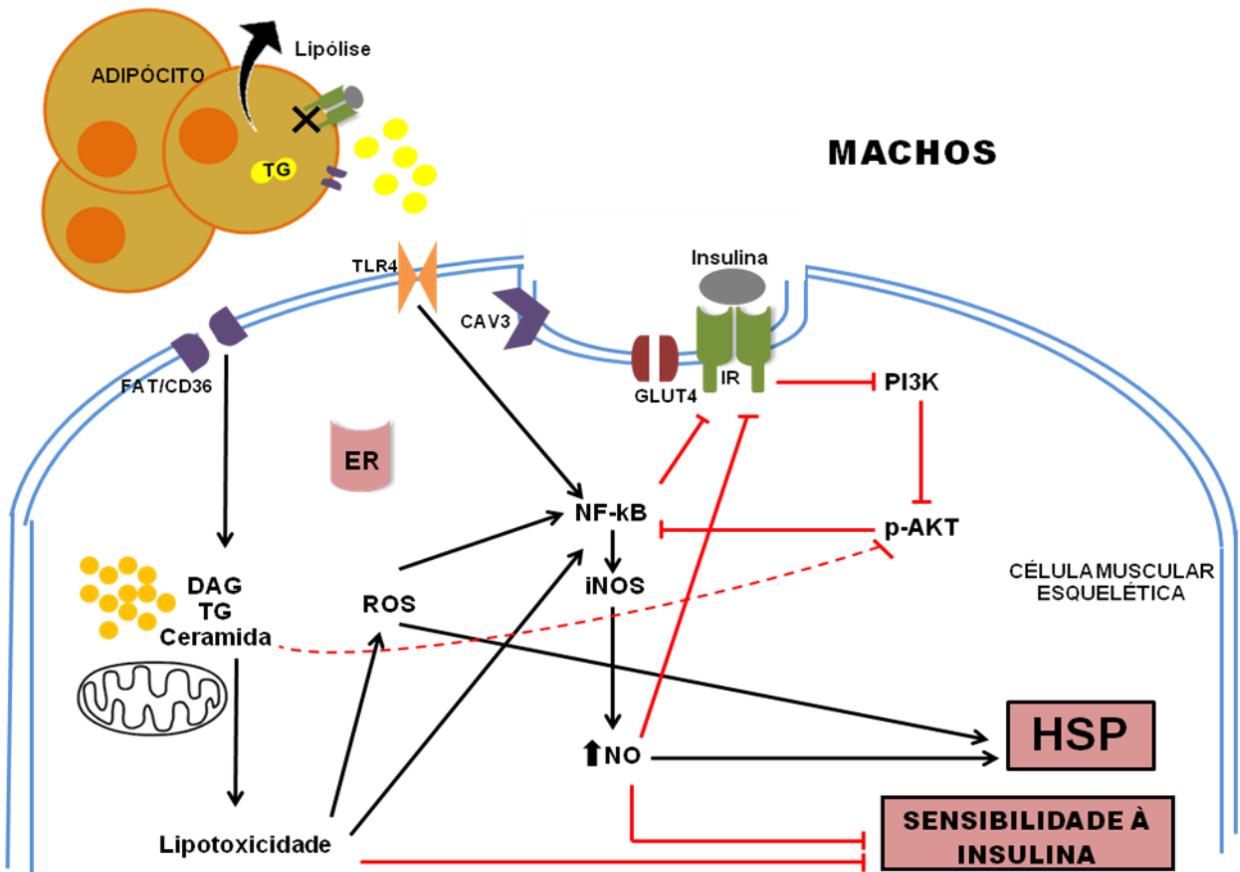
De fato, o E2 parece diretamente influenciar a expressão de HSP70 de maneira tecido-dependente (Voss, 2003). Nesse estudo, foi verificado que, em situação de repouso (sem estresse), a HSP72 (em cardiomiócitos), em fêmeas OVX com reposição hormonal de E2, está aumentada em relação aos machos e as fêmeas OVX sem

reposição. Porém quando o se avaliou o músculo sóleo, houve expressão aumentada em machos em comparação com fêmeas com reposição de E2. Ou seja, em músculo de contração lenta (sóleo), a HSP70 é aumentada em machos em relação às fêmeas, já em músculo de contração rápida (gastrocnêmio), não existe diferença significativa. No fígado, da mesma forma que em nosso estudo, o autor supracitado não encontrou diferença estatisticamente significativa em condições basais. (Voss, 2003)

Considerando os nossos resultados e dos estudos anteriores, as diferenças na expressão da HSP70, entre machos e fêmeas, frente a um estresse metabólico (HFD) ou em condições basais (dieta padrão), parece ser tecido-dependente e gênero-dependente. Como exemplo, podemos citar que a expressão de HSP70 em ratas OVX é estimulada pela reposição de E2, provendo a esses animais maior proteção contra estresse de hipóxia miocárdica (Stice, 2011). Em situações de exercício (estresse agudo), um estudo relatou que os níveis de HSP72 estavam aumentados nos corações de ratos machos após o exercício, mas não nas fêmeas. Após a ovariectomia, as fêmeas também tiveram um aumento na HSP72 cardíaca com o exercício, embora fosse menos acentuado (Paroo, 2001).

Em resumo, o aumento da expressão da HSP70 nos machos, parece ser uma consequência do desenvolvimento da resistência à insulina nesses animais, já que essa chaperona molecular tem uma importante função citoprotetora no meio intracelular. As fêmeas parecem ter sido poupadas tanto do desenvolvimento da resistência à insulina como do aumento da HSP70, aparentemente, pela função protetiva que o E2 exerce sobre a lipotoxicidade através da melhora do armazenamento e utilização de ácidos graxos, sobre a cascata de sinalização da insulina (através de seu efeito positivo sobre a expressão da Caveolina 3 no músculo esquelético e sobre a fosforilação da AKT) e ainda, sobre vias inflamatórias, através da inibição do NF- κ B e, conseqüentemente, da superprodução de NO, que prejudica a sensibilidade à insulina, conforme ilustrado nas imagens 24 e 25. Abaixo, demonstramos, graficamente, nossa hipótese, comparando machos e fêmeas, sobre aspectos metabólicos, inflamatórios e de sensibilidade à insulina. Nosso modelo foca especialmente no músculo esquelético, onde estudamos a expressão de HSP70.

(A)



(B)

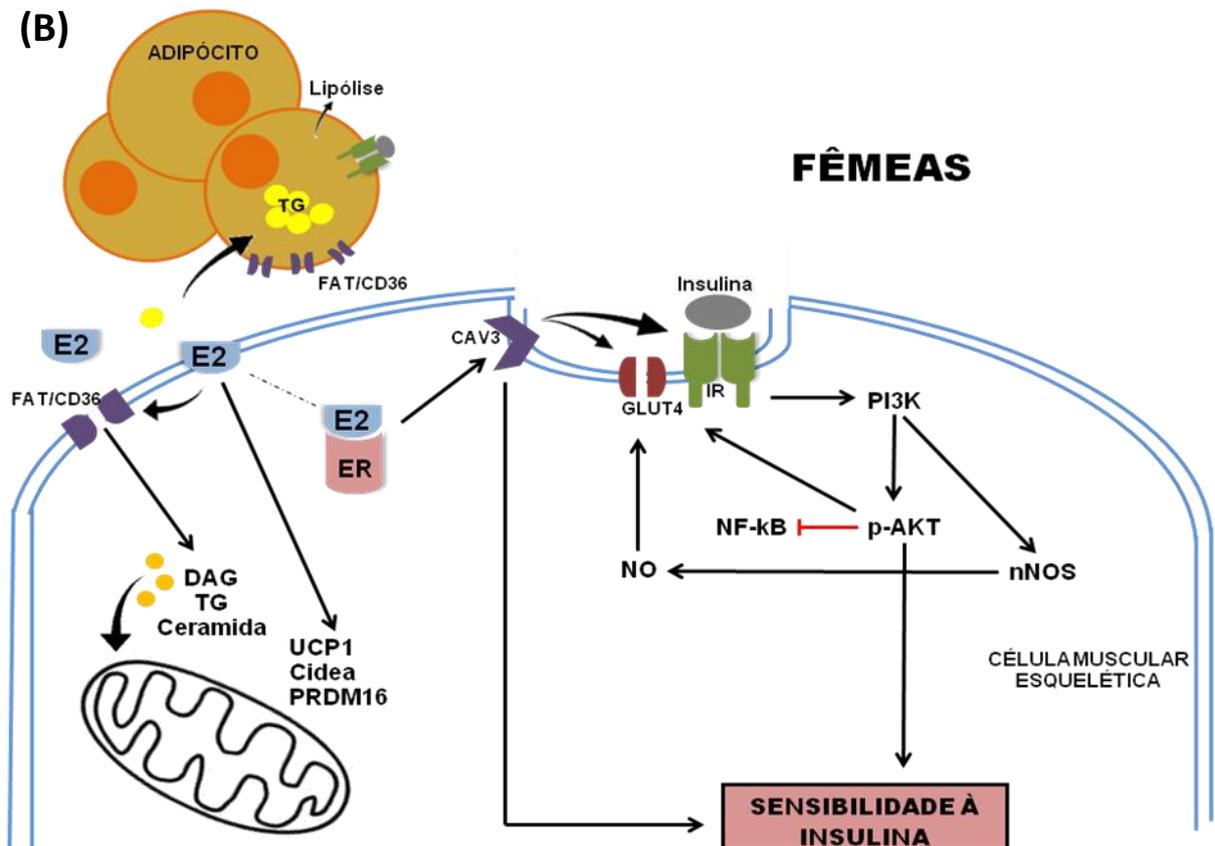


Figura 30: Mecanismo hipotético proposto para explicar as diferenças metabólicas e moleculares entre animais machos e fêmeas em resposta a uma dieta hiperlipídica. (A) Nos adipócitos, pela intervenção da HFD há aumento da lipólise e consequente aumento da liberação de ácidos graxos na circulação. Esses compostos irão ser captados pelo músculo esquelético pelo aumento da translocação de FAT/CD36 para a membrana muscular esquelética. O aumento do acúmulo de TG, DAG e Ceramida, sem o aumento da utilização destes compostos por uma mitocôndria mais eficiente, irá causar lipotoxicidade na célula muscular sendo esta responsável pela produção de ROS no meio intracelular. Ainda os FFA circulantes terão efeito sobre receptores TLR4 na membrana muscular promovendo aumento da sinalização para vias pró-inflamatórias como o aumento do NF- κ B. O estresse oxidativo causado pela lipotoxicidade promove também sinalização para a ativação do NF- κ B promovendo uma ação conjunta favorecendo vias pró-inflamatórias. O NF- κ B será responsável por um aumento excessivo da produção do NO, ou seja, um aumento além do fisiológico, através de sua ação ativadora sobre a iNOS, que juntamente com as ROS serão capazes de promover a ativação e expressão de HSP ao mesmo tempo em que induzir a resistência à insulina pelo bloqueio de elementos da cascata de sinalização à insulina. Esse bloqueio nas vias de sinalização da insulina (PI3K / AKT) retira do cenário agentes de bloqueio do NF- κ B. Esse processo resulta em um feedback negativo em que o aumento das vias inflamatórias promove inibição da sensibilidade à insulina que por sua vez é responsável pela ativação de mais agentes pró-inflamatórios. (B) Através da sua via clássica de ação, ou seja, da ligação do E ao ser receptor, esse hormônio será responsável, em uma de suas frentes de ação, pelo aumento da expressão da caveolina 3, que por sua vez, é responsável pela formação das cavéolas na membrana (invaginação na membrana celular). Essas estruturas são uma importante área de localização e ação do IR e do GLUT4. A caveolina 3 é capaz de promover o aumento da translocação para a membrana tanto do IR quanto do GLUT4 e por consequência promove o aumento da sensibilidade à insulina e da captação da glicose. Um correto desenvolvimento da via de sinalização da insulina resulta em um aumento da fosforilação da AKT, composto que será responsável pelo bloqueio de fatores pró-inflamatórios como o NF- κ B. Ainda, pela via de sinalização da insulina a PI3K promove ativação da nNOS que por sua ação sobre a produção de NO em níveis normais será também responsável pela manutenção da sensibilidade à insulina. No tecido adiposo e no músculo esquelético e ainda no fígado (não representado na figura), através de sua via não clássica de ação, o E2 será capaz de aumentar a expressão de FAT/CD36 na membrana desses tecidos promovendo eficiência no armazenamento de lipídeos e a retirada de TG da circulação. Ao mesmo tempo, no músculo, o E2 será responsável pelo aumento da expressão de enzimas mitocondriais capazes de promover melhor utilização energética inibindo possíveis efeitos da lipotoxicidade no meio intracelular sendo este efeito também independente de sua ligação com o ER.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nossa principal conclusão é de que as fêmeas parecem estar mais protegidas do que os machos dos efeitos metabólicos de uma dieta hiperlipídica quanto à sensibilidade à insulina, e tal proteção não necessariamente depende da expressão da HSP70 no músculo esquelético. Conforme diversos outros estudos já citados neste trabalho, essa proteção pode estar atrelada a maior presença de E2 nas fêmeas do que nos machos. Dessa forma, reunindo as informações da bibliografia já existente citada na discussão, e avaliando junto com esta os resultados preliminares apresentados neste estudo, observa-se que há grande diferença no processo de desenvolvimento de resistência à insulina entre animais machos e fêmeas e a fase desse processo pode determinar as mudanças na expressão de HSP70 (observado em 16 semanas de HFD como em nosso trabalho), ou a

seguinte diminuição da expressão (conforme descrito por Archer, 2017) sendo que neste momento estará estabelecida a DMT2.

Apesar de sugestivo, esse trabalho inicial apresenta diversas limitações que incluem a ausência da dosagem de proteínas chave na sinalização como a pAKT, o IR, o IRS1, ainda proteínas importantes presentes no processo inflamatório como o NF- κ B, proteínas envolvidas na HSR (HSP70, HSF-1 e SIRT1) além das NOS (iNOS, nNOS e eNOS) que estão sendo avaliadas em nosso laboratório. Além disso, pretendemos dosar as concentrações plasmáticas e teciduais de E2, óxido nítrico, glicerol (como índice indireto de lipólise), concentração de ácidos graxos livres e níveis de DAG e ceramida nos tecidos musculares. Cabe ressaltar que, em função da pouca quantidade de material disponível (em especial de plasma) nos 15 animais destinados a cada grupo, a dosagem de E2 não foi possível, apesar de ser bem aceita a presença aumentada deste hormônio em fêmeas em relação aos machos.

Como perspectivas para continuidade deste trabalho, pretendemos realizar a dosagem dos compostos supracitados nos tecidos metabólicos chave: músculo, tecido adiposo e fígado. Posterior ao esclarecimento do comportamento dessas proteínas, haverá a necessidade de confirmação da participação do E2 nesta via por meio de animais bloqueados para produção de E2 (OVX) para a dosagem de HSP70 e a comparação dessa expressão com o desenvolvimento da resistência à insulina.

REFERÊNCIAS

- ARAKI E, LIPES M.A, PATTI ME et al. **Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene.** Nature vol.372, 1994, no.6502, pp.186–190.
- ARCHER A E, SCHULZE A T V and GEIGER P C. **Exercise, heat shock proteins and insulin resistance.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018; Jan 19;373.
- AKERFELT M, MORIMOTO RI, and SISTONEN L. **Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010; vol. 11, no. 8, pp. 545– 555.
- BABA T, SHIMIZU T, SUZUKI Y, et al. **Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice.** J Biol Chem 2005; 280:16417– 16426.
- BOCK, Patrícia. **Efeito da suplementação de Glutamina e Dipeptídeo L-alanil-L-glutamina sobre a expressão da (HSP70) e a sinalização da insulina em camundongos tratados com dieta hiperlipídica.** Tese de doutorado. Disponível em Lume Repositório Digital – UFRGS, 2015.
- BOMFIM, R., L. FORNY-GERMANO, L. B. SATHLER et al. **An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer’s disease-associated A β oligomers.** The Journal of Clinical Investigation, vol.122, 2012, no.4, pp.1339–1353.
- BROOME CS, KAYANI AC, PALOMERO J, DILLMANN WH, MESTRIL R, JACKSON MJ, MCARDLE A. **Effect of lifelong over expression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after non damaging contractile activity.** FASEB J, 2006 ;20:1549–1551.
- BROWN, E. T. et al. **Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice.** Vis Neurosci, 2005; v. 22, n. 5, p. 615-8.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods Enzymol, v. 52, 1978, p. 302-10.
- CAMPER-KIRBY D, WELCH S, WALKER A, SHIRAIISHI I, SETCHELL K D R, SCHAEFER E, KAJSTURA J, ANVERSA P, SUSSMAN M A. **Myocardial Akt Activation and Gender Increased Nuclear Activity in Females Versus Males.** Circ Res. 2001;88:1020-1027.
- CAMPOREZ J P G, JORNAYVAZ F R, LEE H Y, KANDA S, GUIGNI B A, KAHN M, SAMUEL V T, CARVALHO C R O, PETERSEN K F, JURCZAK M J, and SHULMAN G I. **Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat DietInduced Hepatic and Muscle Insulin Resistance.** Endocrinology, March 2013; 154(3):1021–1028.
- CHARBONNEAU A, MARETTE A. **Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins.** Diabetes. 2010 Apr;59(4):861-71.
- CHEN X, ZHANG J, HAN J, DAI H, KONG X, XU L, XIA Q, ZHANG M, and ZHANG J. **A Sexual Dimorphism Influences Bicyclol-Induced Hepatic Heat Shock Factor 1 Activation and Hepatoprotection.** Mol Pharmacol, July 2015; 88:38–47.
- CHUNG, J., NGUYEN, A. K., HENSTRIDGE, D. C., HOLMES, A. G., CHAN, M. H., MESA, J. L., LANCASTER, G. I., SOUTHGATE, R. J., BRUCE, C. R., DUFFY, S. J. et al. **HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008; 105, 1739–1744.

- CIOCCA DR, OESTERREICH S, CHAMNESS GC, MCGUIRE WL, AND FUQUA SAW. **Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review.** J Natl Cancer Inst, 1993; 85: 1558–1570.
- COCCIA M, ROSSI A, RICCIOA A, TROTTA E, and SANTORO M G. **Human NF- κ B repressing factor acts as a stressregulated switch for ribosomal RNA processing and nucleolar homeostasis surveillance .** PNAS, January 31, 2017; vol. 114, no. 5, 1045–1050.
- COHEN A W, COMBS T P, SCHERER P E, and MICHAEL P. LISANTI. **Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes.** Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1151–E1160, 2003.
- CORICA, Francesco, BIANCHI, Giampaolo, CORSONELLO, Andrea, MAZZELLA , Natalia, LATTANZIO , Fabrizia, MARCHESINI, Giulio. **Obesity in the Context of Aging: Quality of Life Considerations.** PharmacoEconomics July, 2015, Volume 33, pp 655–672.
- DAI R, FREJTAG W, HE B, ZHANG Y, and MIVECHI NF. **c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity.** Journal of Biological Chemistry vol.275; 2000, no.24, pp.18210–18218.
- DE FRONZO RA. **Glucose intolerance and aging.** Diabetes Care, 1981; 4:493–501.
- DEGENS, H. **The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting.** Scand. J. Med. Sci. Sports, 2010; 20, 28–38
- DONAHUE RP, BEAN JA, DONAHUE RA, GOLDBERG RB, PRINEAS RJ. **Insulin response in a triethnic population: effects of sex, ethnic origin, and body fat.** Miami Community Health Study. Diabetes Care. 1997; 20 (11):1670-1676.
- EHSES JA, MEIER DT, WUEEST S et al. **Toll-like receptor 2 deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet.** Diabetologia, 2010; vol.53,no. 8,pp.1795–1806.
- FEBBRAIO, M. A. et al. **Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans.** Cell Stress Chaperones, 2004; v. 9, n. 4, p. 390-6.
- FONTAINE KR, BAROFSKY I. **Obesity and health-related quality of life.** Obes Rev. 2001; 2(3):173–82.
- FOTI D, CHIEFARI E, FEDELE M et al. **Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice.** Nature Medicine, vol.11, no.7, pp.765–773, 2005.
- GARAULET M, PEREX-LLAMAS F, FUENTE T, et al. **Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: Relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones.** Eur J Endocrinol 2000; 143:657–666.
- GEER E B, and SHEN W. **Gender Differences in Insulin Resistance, Body Composition, and Energy Balance.** Gend Med . 2009; 6: 60–75.
- GILLUM T, KUENNEN M, GOURLEY C, DOKLADNY K, SCHNEIDER S, MOSELEY P. **Sex Differences in Heat Shock Protein 72 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells to Acute Exercise in the Heat.** Int J Endocrinol Metab. 2013; 11(4):e87392
- GÓMEZ-RUIZ A, DE MIGUEL C, CAMPIÓN J, MARTÍNEZ JA, MILAGRO FI. **Time-dependent regulation of muscle caveolin activation and insulin signalling in response to high-fat diet.** FEBS Lett. 2009 Oct 6;583(19):3259-64.

- GUPTE AA, BOMHOFF GL, GEIGER PC. **Age-related differences in skeletal muscle insulin signaling: the role of stress kinases and heat shock proteins.** J Appl Physiol, 2008; 105:839–848.
- GUPTE A A, BOMHOFF G L, SWERDLOW R H, and GEIGER P C. **Heat Treatment Improves Glucose Tolerance and Prevents Skeletal Muscle Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fat Diet.** Diabetes, 2009; 58:567–578.
- HENRIKSEN, E. J. DIAMOND-STANIC, M. K. MARCHIONNE, E. M. MARCHIONNE. **Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes.** Free Radical Biology & Medicine, vol. 51, no. 5, pp. 993–999, 2011.
- HENSTRIDGE DC, WHITHAM M, FEBRAIO MA. **Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock protein in obesity and type 2 diabetes.** Mol Metab 2014; 3:781-793.
- HOLMANG A, SVEDBERG J, JENNISCHE E, BJORNTORP P. **Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats.** Am J Physiol 1990; 259:E555–E560.
- HOOPER PL, BALOGH G, RIVAS E et al. **The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes.** Cell Stress Chaperones 2014; 19: 447-464.
- HOOPER PL. **Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus.** N Engl J Med, 1999; 341:924–925.
- HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, and SPIEGELMAN BM. **IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity induced insulin resistance.** Science, vol. 271, no. 5249, pp. 665–668, 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S. SHARGIL, N. S. and SPIEGELMAN, B. M. SPIEGELMAN. **Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance.** Science, vol. 259, no. 5091, pp. 87–91, 1993.
- JOHNSON AR, MILNER JJ, MAKOWSKI L. **The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity.** Immunol Rev 2012; 249: 218 – 238.
- KAMPINGA HH, HENNING RH, VANGELDER IC, and BRUNDEL BJM. **Heat shock proteins and atrial fibrillation.** Cell Stress and Chaperones, 2007, vol. 12, no. 2, pp. 97–100.
- KANAYA AM, HERRINGTON D, VITTINGHOFF E et al. **Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** Ann Intern Med, 2003; 138(1):1–9.
- KARYN L. HAMILTON C, S. GUPTA A, A. A. KNOWLTON. **Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF κ B signaling.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2004; 577–584.
- KREBS CJ, JARVIS ED, AND PFAFF DW. **The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC73) gene is enhanced by ovarian hormones in the ventromedial hypothalamus.** Proc Natl Acad Sci USA, 1999; 96: 1686–1691.
- KEANE KN, CALTON EK, CARLESSI R, HART PH AND NEWSHOLME P. **The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes.** European Journal of Clinical Nutrition; 2017, 71, 904–912.
- KEANE KN, CRUZAT VF, CARLESSI R, DE BITTENCOURT PIH, NEWSHOLME P. **Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and β cell dysfunction.** Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 15.

- KLINE MP, MORIMOTO RI. **Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation.** Mol Cell Biol. 1997; 17:2107–15.
- Boudewijn Klop, Jan Willem F. Elte and Manuel Castro Cabeza. **Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets.** Nutrients 2013, 5, 1218-1240.
- KRAUSE, M., BITTENCOURT, A., HOME M DE BITTENCOURT, P. I., MCCLENAGHAN, N. H., FLATT, P. R., MURPHY, C. AND NEWSHOLME, P . **Physiologic concentrations of IL-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release and redox status in a clonal pancreatic β -cell line and mouse islets.** J. Endocrinol. 2012; 214, 301–31.
- KRAUSE, Mauricio, HECK, Thiago Gomes, BITTENCOURT, Aline, Sofia Pizzato, SCOMAZZON, NEWSHOLME, Philip, CURI, Rui and BITTENCOURT JR, Paulo Ivo Homem. **The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes, the Effect of Exercise, and the Implications for Clinical Management.** Volume 2015, 12 pages. Mediators Inflamm. 2015;2015:249205.
- KRAUSE MS, MCCLENAGHAN NH, FLATT PR, DE BITTENCOURT PIH, MURPHY C, and NEWSHOLME P. **L-Arginine is essential for pancreatic β -cell functional integrity, metabolism and defense from inflammatory challenge.** Journal of Endocrinology, 2011; vol.211, no.1, pp.87–97.
- KRAUSE M, KEANE K, RODRIGUES-KRAUSE J, et al. **Elevated levels of extracellular and heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic beta-cell dysfunction and death in vitro.** Clin Sci (Lond) 2014; 126:739– 752.
- KRAUSE MS, and RODRIGUES-KRAUSE JDC. **Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment.** Medical Hypotheses, 2011, vol.76, no.2, pp.286–290.
- KRAUSE M, LUDWIG MS, HECK TG, TAKAHASHI HK. **Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2015 Jul;18(4):374-80.
- KUBOTA, N. TOBE, K.TERAUCHI, Y. et al. **Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia.** Diabetes, vol.49, no.11, pp.1880–1889, 2000.
- KURUCZ I, MORVA A, VAAG A, ERIKSSON KF, HUANG X, GROOP L, KORANYI L. **Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance.** Diabetes, 2002; 51:1102–1109.
- LI H, SUN X, LESAGE G et al. **beta-Arrestin 2 regulates Toll like receptor 4-mediated apoptotic signalling through glycogen synthase kinase-3beta.** Immunology, 2010; vol. 130, no. 4, pp. 556– 563.
- LIU TF, BROWN CM, EL GAZZAR M, MCPHAIL L, MILLET P, RAO A et al. **Fueling the flame: bioenergy couples metabolism and inflammation.** J Leukoc Biol 2012; 92: 499–507.
- LOUET JF, LEMAY C, MAUVAIS–JARVIS F. **Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models.** Curr Atheroscler Rep 2004; 6:180–185.
- MORAN A, JACOBS DR JR, STEINBERGER J, et al. **Changes in insulin resistance and cardiovascular risk during adolescence: Establishment of differential risk in males and females.** Circulation 2008; 117:2361–2368.

- MORIMOTO S, FERNANDEZ-MEJIA C, ROMERO-NAVARRO G, et al. **Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat.** *Endocrinology* 2001; 142:1442–1447.
- MORTON JP, MACLAREN DP, CABLE NT, BONGERS T, GRIFFITHS RD, CAMPBELL IT, EVANS L, KAYANI A, MCARDLE A, DRUST B. **Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise.** *J Appl Physiol*, 2006; 101:176–182.
- MU P, TAN Z, CUI Y, LIU H, XU X, HUANG Q, ZENG L, WANG T. **17 β -Estradiol attenuates diet-induced insulin resistance and glucose intolerance through up-regulation of caveolin-3.** *Ir J Med Sci*, 2011; 180:221–227.
- NEWSHOLME P, CRUZAT VF, KEANE KN, CARLESSI R, DE BITTENCOURT PI JR **Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes.** *Biochem J*. 2016; Dec 15;473(24):4527–4550.
- NEWSHOLME P, MORGAN D, REBELATO E et al. **Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell.** *Diabetologia*, 2009; vol. 52, no. 12, pp.2489–2498.
- NEWSHOLME P, REBELATO E, ABDULKADER F, KRAUSE MS, CARPINELLI A and CURI R. **Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cellfunction: a critical role for amino acids.** *Journal of Endocrinology*, vol. 214, 2012 no. 1, pp.11–20.
- NEWSHOLME, P., HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., O'HAGAN, C., DE VITO, G., MURPHY, C. AND KRAUSE, M. S. **Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide.** *Clin. Sci.* 2009; 118, 341–349
- NEWSHOLME, P. CRUZAT, V. ARFUSO, F. and KEANE, K.. **Nutrient regulation of insulin secretion and action.** *The Journal of Endocrinology*, 2014, vol.221, no.3, pp. R105–R120.
- NJEMINI, R., FORTI, L. N., METS, T., VAN ROIE, E., COUDYZER, W., BEYER, I., BAUTMANS, I. **Sex difference in the heat shock response to high external load resistance training in older humans.** *Experimental Gerontology*, 2017; 93, 46–53.
- OISHI Y, TANIGUCHI K, MATSUMOTO H, ISHIHARA A, OHIRA Y, ROY RR. **Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature.** *J Appl Physiol*, 2002; 92:1097–1103.
- PARK HS, LEE JS, HUH SH, SEO JS, CHOI EJ. **Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of cJun N -terminal kinase.** *EMBO J*. 2001; 20:446–56.
- PAROO Z, HAIST JV, KARMAZYN M, AND NOBLE EG. **Exercise improves post ischemic cardiac function in males but not females.** *Circ Res*, 2002; 90: 911–917.
- PAROO Z, ELIZABETH S. DIPCHAND, and NOBLE E G. **Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle.** *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C245–C251, 2002.
- PATTEN R D and KARAS R H. **Estrogen Replacement and Cardiomyocyte Protection.** *TCM* Vol. 16, No. 3, 2006.
- RODRIGUES-KRAUSE J, KRAUSE M, O'HAGAN C, et al. **Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?** *Cell Stress Chaperones* 2012; 17:293–302.
- SAINI. V. **Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus.** *World Journal of Diabetes*, vol.1, no.3, pp. 68–75, 2010.

- SINGH IS, HE JR, CALDERWOOD S, and HASDAY JD. **A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor.** The Journal of Biological Chemistry, 2002; vol. 277, no.7, pp.4981–4988.
- SONG XM, RYDER JW, KAWANO Y, CHIBALIN AV, KROOK A, ZIERATH JR. **Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction.** Am J Physiol, 1999; 277: R1690–R1696.
- STANIMIROVIC J, OBRADOVIC M, JOVANOVIC A, SUDAR-MILOVANOVIC E, ZAFIROVIC S, PITT SJ, STEWART AJ, ISENOVIC ER. **A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats.** Nitric Oxide. 2016 Apr 1;54:51-9.
- STICE J P, CHEN L, KIM S, JUNG J S, TRAN A L, LIU T T, and KNOWLTON A A. **17 β -Estradiol, Aging, Inflammation, and the Stress Response in the Female Heart.** Endocrinology, April 2011, 152(4):1589–159
- STUART CA, HOWELL ME, CARTWRIGHT BM et al. **Insulin resistance and muscle insulin receptor substrate-1 serine hyperphosphorylation.** Physiological Reports, 2014; vol.2, no.12.
- STUNKARD AJ, WADDEN TA. **Psychological aspects of severe obesity.** Am J Clin Nutr ; 1992, 55(2 Suppl):524S–32S.
- TALBOT, K., H.-Y. WANG, H. KAZI et al. **Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline.** JournalofClinicalInvestigation,vol.122,no.4,pp.1316– 1338,2012.
- TANIGUCHI, C. M.EMANUELLI, B. and KAHN, C. R. **Criticalnodes in signalling pathways: insights into insulin action.** Nature Reviews Molecular Cell Biology,vol.7,no.2,pp.85–96,2006.
- TATEYA, S. KIM, F. and TAMORI, Y. **Recent advances in obesityinduced inflammation and insulin resistance.** Frontiers in Endocrinology, vol.4, article93, 2013.
- TENG K-T, CHANG C-Y, CHANG LF, NESARETNAM K. **Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence.** Nutr J 2014; 13: 12.
- TRAYHURN P. **Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity.** Physiol Rev 2013; 93:1 –21
- TUPLING AR, BOMBARDIER E, STEWART RD, VIGNA C, AQUI AE. **Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise.** J Appl Physiol, 2007; 103:2105–2111.
- VERDILE, Giuseppe, KEANE, Kevin N, CRUZAT, Vinicius F, MEDIC, Sandra, SABALE, Miheer, ROWLES, Joanne, WIJESEKARA , Nadeeja, MARTINS, Ralph N., FRASER ,Paul E, and NEWSHOLM, Philip.**Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease.** Mediators of Inflammation Volume 2015, 17 pages.
- VOSS M R, STALLONE J N, MIN LI, CORNELUSSEN R N M, KNUEFERMANN P and KNOWLTON A A. **Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen.** Am J Physiol Heart Circ Physiol , 2003; 285: H687–H692.
- XIONG, J., LIAN, Z., ZHOU, X., YOU, J., & LIN, Y. **Investigation of gender difference in human response to temperature step changes.** Physiology & Behavior, 2015; 151, 426–440.

- XIAO X, ZUO X, DAVIS ET AL A A. **HSF1 is required for extra embryonic development, post natal growth and protection during inflammatory responses in mice.** The EMBO Journal, 1999; vol. 18, no.21, pp.5943–5952.
- WADDEN, Thomas A. and PHELAN, Suzanne. **Assessment of Quality of Life in Obese Individuals.** Obesity Research Vol. 10, 2002, Suppl. 1 November.
- WHITE, Ursula A. and TCHOUKALOVA, Yourka D. **Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function.** Biochim Biophys Acta. March 2014; 1842(3): 377–392.
- WHITE, M. F. SHOELSON, S. E. KEUTMANN, H. and KAHN, C. R. KAHN. **A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor.** Journal of Biological Chemistry, vol.263, no.6, pp.2969–2980, 1988.
- WHITE, M. F. **Insulin signaling in health and disease.** Science, vol.302, no.5651, pp.1710–1711, 2003.
- WEIR, G.C. AND BONNER-WEIR, S. **Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 2013; 1281, 92–105.
- YANG X, DALE EC, DIAZ J, AND SHYAMALA G. **Estrogen dependent expression of heat shock transcription factor: implications for uterine synthesis of heat shock proteins.** J Steroid Biochem Mol Biol, 1995; 52: 415–419.
- ZHANG, Y.R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD, and J. M. FRIEDMAN. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** Nature, vol.372, 1994, no.6505, pp.425–432.