

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

HELENA TREVISAN SCHROEDER

**Acompanhamento Temporal da Composição Corporal,
Sensibilidade à Insulina e Inflamação de Baixo Grau em
Camundongos C57BL/6J e os Efeitos do Tratamento Hipertérmico**

Porto Alegre

2020

HELENA TREVISAN SCHROEDER

**Acompanhamento Temporal da Composição Corporal,
Sensibilidade à Insulina e Inflamação de Baixo Grau em
Camundongos C57BL/6J e os Efeitos do Tratamento Hipertérmico**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior.

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos enaltecendo todos os funcionários do ICBS/UFRGS por todo apoio propiciado para o desenvolvimento do meu trabalho. Também gostaria de deixar um agradecimento especial à instituição (UFRGS), e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Aos membros que formaram a banca examinadora deste trabalho: muito obrigada pela sua disponibilidade. Bem como sou grata ao PPG Fisiologia UFRGS pelo curso de que tive a oportunidade de fazer parte.

Tenho muito a agradecer ao meu professor orientador Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. (carinhosamente chamado de “*Prof*”) pelo apoio, paciência, confiança, preocupação e empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa. O *Prof* é, além de um pesquisador brilhante, uma pessoa muito generosa capaz de carregar uma enorme carga de conhecimento que compartilha com grande prazer. Impossível trocar meia dúzia de palavras com ele e não sair com uma grata descoberta. Sou muito honrada por ser sua aluna. Sem deixar de lado o agradecimento à Dona Míriam, por todo carinho que ela dedica a todos nós.

Gostaria de deixar o meu profundo agradecimento a uma pessoa muito especial, Maria Inês Lavina Rodrigues que tanto me incentivou durante todos os nossos anos de convívio, se tornando uma das minhas amigas mais caras. Uma pessoa que além de auxiliar em todas as etapas do meu trabalho, também é responsável pela manutenção da ordem em nosso laboratório, sem a qual NADA seria possível e nosso grupo não seria tão unido como é. Em verdade, a Inesinha é a cola que nos mantém juntos. Aprendi muito com ela tecnicamente, sim, mas talvez mais ainda sobre como cuidar do outro e como ter atenção nos detalhes que ninguém valoriza, mas que são fundamentais. Obrigada de *coração* por todo o cuidado.

À minha Mãe e a meu pai, que apesar de todos as dificuldades, cada um, à sua maneira, me ajudaram em cada etapa que levou a esta realização. Carrego um pouco de cada um deles, tornando-me “eu” e sou grata a isso. Preciso agradecer, também, às pessoas que meus pais trouxeram a minha vida atualmente, que fazem

parte da nossa família e com quem sei que posso contar. *Sale* e *Bailas* obrigada por existirem.

Não tenho palavras para expressar a minha gratidão ao meu namorado, grande companheiro, nem consigo explicar a capacidade que ele possui de deixar tudo mais leve e de me acalmar. Em momentos de *aparente* dificuldade saber que posso contar com ele me deixam mais convicta. Espero que ele entenda, realmente, a intensidade do meu: “obrigada!”. Acho que sim, pois ele também é um homem de poucas palavras. E não posso deixar de estender meus agradecimentos a Dona Marlene e a Ana, pessoas maravilhosas que me receberam tão bem em suas vidas. Obrigada por tudo.

No decorrer do mestrado ganhei dois presentes. O primeiro foi conviver mais com minha pimplha (Marcela) que me deu a oportunidade de passar algum conhecimento que outros me ensinaram antes, e de quebra, a rir muito. Marcelinha, muito obrigada por toda a ajuda que me destes. O segundo foi conhecer um amigo brilhante, não só por todo seu conhecimento e inteligência em vários níveis, mas por ser uma pessoa cheia de luz e única, que faz a diferença no ambiente que ocupa. Jorginho, obrigada pelo coleguismo e oportunidade de evoluir compartilhando o prisma diferenciado que possui.

Agradeço ao Professor Mauricio Krause, pela honra de poder compartilhar da sua experiência e me proporcionar tantas oportunidades científicas, pelas quais sou muito grata.

Aos meus amigos de trabalho e parceiros de pesquisa, por toda a ajuda, apoio e conhecimento durante todo período da minha formação acadêmica, permitindo sempre que fosse uma jornada alegre, em especial a Dona Ritinha, Cinthia Schöler, Patrícia Bock, Victor Borges, Everton Cristian e Cristiane Souza.

FINANCIAMENTO: Este estudo foi financiado em parte com recursos públicos provenientes do CNPq e da CAPES.

Resumo

A resposta inflamatória é uma reação altamente conservada e necessária para a manutenção da homeostase dos organismos. No decorrer de uma resposta inflamatória, tem-se a produção de uma proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), *chaperona* intracelular com papel citoprotetor e anti-inflamatório, visando à resolução da inflamação. Doenças metabólicas associadas à inflamação crônica de baixo grau, como obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2, apresentam resistência à insulina aliada a uma resposta ineficiente na produção desta HSP70, impedindo a resolução fisiológica da inflamação e contribuindo para o estresse metabólico sistêmico do organismo. Métodos hipertérmicos vêm sendo mostrados como possíveis ferramentas tanto no tratamento destas patologias, como de avaliação da capacidade de produção da HSP70. Abordando estes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a evolução temporal da inflamação crônica em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD), realizando intervenção com tratamento térmico. Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, alimentados com HFD ou com dieta padrão de laboratório (NC) após desmame, mantidos em tratamento por 10 semanas, 14 semanas, 18 semanas ou 22 semanas, sendo que nos últimos dois grupos foi realizado o tratamento hipertérmico nas últimas quatro ou oito semanas. Os resultados demonstraram que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram, nos diferentes tempos, significativo aumento de peso corpóreo e peso de tecido adiposo visceral quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$), indicando a efetividade do tratamento com a dieta hiperlipídica. Porém os animais HFD tratados mais de 10 semanas de tratamento não demonstraram diferença em relação aos animais NC, de mesmo tempo, nas análises de senescência e conteúdo do tecido adiposo visceral, glicemia, insulinemia e HOMA IR. Esse quadro foi parcialmente revertido, com diminuição do tecido adiposo visceral, da senescência, da insulinemia e do HOMA IR nos animais submetidos a 8 sessões de choque térmico semanais, mas não quando realizadas apenas 4 sessões.

PALAVRAS-CHAVE: HSP70; Dieta Hiperlipídica; Tratamento térmico; Resistência à Insulina.

Abstract

The inflammatory response is a highly conserved reaction necessary for the maintenance of homeostasis of organisms. In the course of an inflammatory response there is the production of a heat shock protein (HSP70), which is an intracellular chaperone with cytoprotective and anti-inflammatory role, aimed at resolving inflammation. Metabolic pathologies associated with low-grade chronic inflammation, such as obesity and type 2 *diabetes* mellitus, are characterized by the presence of insulin resistance combined with an inefficient response in the production of HSP70, which prevents the physiological resolution of inflammation and contributes to the systemic metabolic stress of the body. Hyperthermic methods have been shown as possible tools for both the treatment of these conditions and the evaluation of HSP70 production capacity. Addressing these aspects, the present study aimed to evaluate the evolution of chronic inflammation in mice with obesity induced by hyperlipidic diet (HFD) at different times, performing intervention with heat treatment. Male C57BL/6J mice treated with HFD or standard laboratory diet after weaning, kept on treatment for 10 weeks, 14 weeks, 18 weeks or 22 weeks, were used. Heat treatment was introduced during the last two four or eight weeks. The results showed that the animals submitted to the high fat diet presented, at different times, a significant increase in body weight and visceral adipose tissue weight when compared to their respective controls ($p < 0.05$), indicating the effectiveness of the treatment with the high fat diet. However, HFD animals treated more than 10 weeks of treatment showed no difference in relation to NC animals at the same time in the analysis of senescence and visceral adipose tissue content, glycemia, insulinemia and IR HOMA. This condition was partially reversed, with decreased visceral adipose tissue, senescence, insulinemia and IR HOMA in animals submitted to 8 weekly sessions of thermal shock, but not when only 4 sessions were performed.

PALAVRAS-CHAVE: HSP70; High Fat Diet; Heat Treatment; Insulin Resistance.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fluxograma do tratamento estatístico dado aos dados..... | 27 |
| Figura 2: Ambiente interno da caixa moradia dos animais..... | 28 |
| Figura 3: Apresentação das rações empregadas em cada dieta. | 29 |
| Figura 4: Desenho experimental da Parte I..... | 29 |
| Figura 5: Representação esquemática das formas geométricas formadas pela área sob a curva..... | 31 |
| Figura 6: Representação esquemática das formas geométricas formadas pela área sob a curva invertida. | 32 |
| Figura 7: Representação da medida do comprimento naso-anal dos animais..... | 33 |
| Figura 8: Ganho de peso dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento..... | 38 |
| Figura 9: Consumo alimentar dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento | 39 |
| Figura 10: Eficiência Metabólica dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento | 40 |
| Figura 11: Peso corpóreo dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 41 |
| Figura 12: Índice de Lee dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 42 |
| Figura 13: Glicemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 43 |
| Figura 14: Insulinemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas.... | 44 |
| Figura 15: HOMA IR dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 45 |
| Figura 16: HOMA BETA dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 46 |
| Figura 17: Curva de tolerância oral à glicose realizada em animais mantidos sob dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 18: Área incremental sob a curva do OGTT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 47 |
| Figura 19: Curva de tolerância intraperitoneal à insulina realizada em animais mantidos sob dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) | 49 |
| Figura 20: Área incremental sob a curva invertida do IPITT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. | 50 |
| Figura 21: Imagens representativas obtidas dos tecidos dos animais tratados com dieta padrão (NC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. | 51 |
| Figura 22: Dados de massa do tecido adiposo visceral de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 52 |
| Figura 23: Dados de massa do tecido hepático de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 53 |
| Figura 24: Dados de massa do músculo gastrocnêmio de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 54 |
| Figura 25: Dados de massa do tecido cardíaco de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 55 |
| Figura 26: Cortes histológicos de tecido hepático corado com HE de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 56 |
| Figura 27: Detecção macroscópica da atividade da enzima Beta-Galactosidase em tecido adiposo visceral. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas..... | 57 |
| Figura 28: Imunoconteúdo proteico do fígado de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) | 58 |
| Figura 29: Imunoconteúdo proteico do tecido adiposo de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) | 60 |

| | |
|---|----|
| Figura 30 - Imunoconteúdo proteico de HSP70 no músculo de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). | 61 |
| Figura 31: Avaliação da resposta da via de choque térmico em camundongos C57BL/6J..... | 62 |
| Figura 32: Desenho experimental parte II. | 70 |
| Figura 33: Modelo de choque térmico (HS)..... | 72 |
| Figura 34: Recuperação dos animais HS e espera dos animais SHAM..... | 72 |
| Figura 35: Ganho de peso dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) com tratamento térmico (HS) ou sem (SHAM) ao longo das semanas de tratamento..... | 73 |
| Figura 36: Peso corpóreos dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante: 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas nos grupos tratados com choque térmico (HS) ou não (SHAM). | 74 |
| Figura 37: Consumo alimentar dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) divididos nos grupos com e sem tratamento térmico (HS e SHAM, respectivamente) ao longo das semanas de tratamento térmico | 75 |
| Figura 38: Índice de Lee dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas nos grupos tratados com choque térmico (HS) ou não (SHAM)..... | 76 |
| Figura 39: Glicemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM).. | 77 |
| Figura 40: Insulinemia de Jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM)..... | 78 |
| Figura 41: HOMA IR dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM)..... | 79 |
| Figura 42: HOMA BETA dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM)..... | 80 |
| Figura 43: Curva de tolerância oral a glicose realizada em animais submetidos a terapia térmica (HS) ou não (SHAM)..... | 81 |

| | |
|---|----|
| Figura 44: Área incremental sob a curva do OGTT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 82 |
| Figura 45: Curva de tolerância intraperitoneal a insulina a realizada em animais submetidos a terapia térmica (HS) ou não (SHAM). | 83 |
| Figura 46: Área incremental sob a curva invertida do IPITT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 84 |
| Figura 47: Imagens representativas obtidas dos tecidos extraídos dos animais tratados com dieta padrão (NC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 85 |
| Figura 48: Dados de massa do tecido adiposo visceral de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 86 |
| Figura 49: Dados de massa do hepático de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 87 |
| Figura 50: Dados de massa do músculo gastrocnêmio de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 88 |
| Figura 51: Dados de massa do tecido cardíaco de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 89 |
| Figura 52: Detecção macroscópica da atividade da enzima Beta-Galactosidase em tecido adiposo visceral. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 90 |
| Figura 53: Imunoconteúdo proteico do fígado extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não. | 91 |
| Figura 54 - Imunoconteúdo proteico do tecido adiposo extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 55 - Imunoconteúdo proteico de HSP70 do tecido muscular extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não. | 97 |
| Figura 56: Avaliação da resposta da via de choque térmico em camundongos C57BL/6J. Sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C por 1 h e imunodeteção após mais 7 h para HSP70, normalizada pelo conteúdo de GAPDH. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). | 98 |
| Figura 57: Desenho experimental parte III. | 104 |
| Figura 58: Resposta ao desafio térmico de sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C em camundongos C57BL/6J fêmeas e machos mantidos em jejum por 10 h ou alimentados. | 106 |
| Figura 59: Resposta ao desafio térmico de sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C em camundongos C57BL/6J machos mantidos em jejum por 10 h. | 107 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK – Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
COX2 – Ciclo-oxigenase 2
DMT2 – *Diabetes mellitus* tipo 2
HFD – dieta hiperlipídica
HSF1 – Fator de transcrição de proteínas de choque térmico 1
HSP – Proteína de choque térmico
HSP70 – Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSR – Resposta de choque térmico
HuR – Proteína ligante de mRNA Antígeno Humano R (= ELAV-1)
IL – Interleucina
iNOS – Oxido nítrico sintase induzível
IR – Receptor de insulina
IRS1 – Substrato do receptor de insulina 1
JNK – Jun-c amino terminal cinase
NAFLD – Doença hepática gordurosa não alcoólica
NC – dieta padrão
NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B
PCR – Proteína C reativa
PGC1α – Coativador-1 alfa do receptor de proliferadores de peroxissomos gama
PGE2 – Prostaglandina tipo E 2
PPARγ – receptor de proliferadores de peroxissomos gama
RE – Retículo endoplasmático
RI – Resistência à insulina
SASP – Fenótipo de secreção associado à senescência
SIRT1 – Sirtuína 1
TLR – Receptor do tipo Toll
TNFα – Fator de necrose tumoral alfa
UPR – Resposta às proteínas desdobradas

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Visando o melhor entendimento dos resultados apresentados, esta dissertação está dividida em uma introdução que aborda os tópicos gerais que permeiam o desenvolvimento do presente trabalho (inflamação, obesidade, a via de choque térmico e o tratamento hipertérmico) e mais três partes: A primeira parte, que estuda o acompanhamento do desenvolvimento da obesidade, perfil de sensibilidade à insulina, expressão das proteínas da via de choque térmico e a capacidade de resposta ao choque térmico em camundongos C57BL/6J tratados com dietas padrão e hiperlipídica por 10, 14, 18 e 22 semanas; A segunda parte que testa a melhora dos parâmetros medidos na primeira parte frente à intervenção com tratamento térmico em animais mantidos por 18 e 22 semanas; E, finalmente, considerando os resultados do teste de capacidade de resposta ao choque térmico, por meio do desafio térmico em sangue total, a terceira parte trata do teste para uma adequação da técnica.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1. Inflamação | 17 |
| 1.2. Via de choque térmico | 17 |
| 1.3. Obesidade..... | 20 |
| 1.4. Choque térmico..... | 22 |
| 1.5. Avaliação da capacidade de resposta ao choque térmico..... | 23 |
| 2. PARTE I – ACOMPANHAMENTO TEMPORAL DA RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO CRÔNICA | 25 |
| 2.1. Objetivos..... | 25 |
| 2.1.1. Objetivo Geral | 25 |
| 2.1.2. Objetivos Específicos..... | 25 |
| 2.2. Métodos | 26 |
| 2.2.1. Local de Realização..... | 26 |
| 2.2.2. Considerações Éticas | 26 |
| 2.2.3. Estatística e Tamanho Amostral | 26 |
| 2.2.4. Animais utilizados..... | 27 |
| 2.2.5. Modelo de Obesidade..... | 28 |
| 2.2.6. Desenho Experimental | 29 |
| 2.2.7. Testes de Tolerância a Glicose e Insulina..... | 30 |
| 2.2.7.1. Teste Oral de Tolerância a Glicose (OGTT)..... | 30 |
| 2.2.7.2. Teste Intraperitoneal de Tolerância a Insulina (IPITT)..... | 31 |
| 2.2.8. Acompanhamento de Parâmetros Metabólicos | 32 |
| 2.2.8.1. Consumo Alimentar | 32 |
| 2.2.8.2. Eficiência Metabólica..... | 32 |
| 2.2.8.3. Índice de Lee | 33 |
| 2.2.9. Morte dos Animais..... | 33 |
| 2.2.10. Medidas Morfométricas | 34 |
| 2.2.11. Dosagens Bioquímicas de Glicose e Insulina de Jejum..... | 34 |
| 2.2.11.1. Glicose..... | 34 |
| 2.2.11.2. Insulina | 34 |
| 2.2.12. Índices de Resistência à Insulina..... | 35 |
| 2.2.12.1. HOMA IR..... | 35 |
| 2.2.12.2. HOMA BETA | 35 |
| 2.2.9. Análise Anatomopatológica | 35 |
| 2.2.9. Detecção de Senescência Proliferativa no tecido Adiposo..... | 35 |
| 2.2.9.1. Macroscópica..... | 36 |
| 2.2.9. Desafio Térmico..... | 36 |
| 2.2.10. Imunodetecção de Conteúdo Proteico..... | 36 |
| 2.3. Resultados..... | 38 |
| 2.3.1. Parâmetros Metabólicos..... | 38 |

| | | |
|------------|---|-------------------------------------|
| 2.3.1.1 | Ganho de peso | 38 |
| 2.3.1.2 | Consumo Alimentar | 38 |
| 2.3.1.3 | Ganho de peso | Error! Bookmark not defined. |
| 2.3.1.4 | Índice de Lee | 41 |
| 2.3.2 | Medidas Bioquímicas | 42 |
| 2.3.2.2 | Insulinemia | 43 |
| 2.3.3 | Índices de Resistência à Insulina | 44 |
| 2.3.3.1 | HOMA IR | 44 |
| 2.3.3.2 | HOMA BETA | 45 |
| 2.3.4 | Testes de tolerância a Glicose e Insulina | 46 |
| 2.3.4.1 | OGTT | 46 |
| 2.2.10.1 | IPITT | 48 |
| 2.3.5 | Medidas Morfométricas | 50 |
| 2.3.6 | Análise anatomopatológica | 56 |
| 2.3.7 | Detecção de senescência proliferativa em Tecido Adiposo | 57 |
| 2.3.8 | Imunoconteúdo Proteico | 57 |
| 2.3.9 | Desafio Térmico | 61 |
| 2.4 | Discussão | 63 |
| 3 | PARTE II – TRATAMENTO HIPERTÉRMICO DA OBESIDADE | 69 |
| 3.1 | Objetivos | 69 |
| 3.1.1 | Objetivos Gerais | 69 |
| 3.1.2 | Objetivos Específicos | 69 |
| 3.2 | Métodos | 70 |
| 3.2.1 | Desenho Experimental | 70 |
| 3.2.1 | Protocolo de Choque Térmico | 71 |
| 3.3 | Resultados | 73 |
| 3.3.1 | Parâmetros Metabólicos | 73 |
| 3.3.1.1 | Ganho de peso | 73 |
| 3.3.1.2 | Consumo Alimentar | 74 |
| 3.3.1.3 | Índice de Lee | 75 |
| 3.3.2 | Medidas Bioquímicas | 76 |
| 3.3.2.1 | Glicemia | 76 |
| 3.3.2.2 | Insulinemia | 77 |
| 3.3.3 | Índices de Resistência à Insulina | 78 |
| 3.3.3.1 | HOMA IR | 78 |
| 3.3.3.2 | HOMA BETA | 79 |
| 3.3.2 | Testes de tolerância a Glicose e Insulina | 80 |
| 3.3.2.1 | OGTT | 80 |
| 3.3.3.3 | IPITT | 82 |
| 3.3.4 | Medidas Morfométricas | 84 |
| 3.3.5 | Detecção de senescência proliferativa em Tecido Adiposo | 89 |
| 3.3.6 | Imunoconteúdo Proteico | 90 |
| 3.3.7 | Desafio Térmico | 98 |
| 3.4 | Discussão | 99 |

| | |
|---|------------|
| 4. PARTE III – PADRONIZAÇÃO DO DESAFIO TÉRMICO EM SANGUE TOTAL DE CAMUNDONGOS..... | 103 |
| 4.1 Objetivos..... | 103 |
| 4.1.1 Objetivos Gerais..... | 103 |
| 4.1.2 <i>Objetivos Específicos.....</i> | 103 |
| 4.2 Métodos | 104 |
| 4.2.1 <i>Animais utilizados.....</i> | 104 |
| 4.2.3 <i>Desafio Térmico Teste 1</i> | 105 |
| 4.2.4 <i>Desafio Térmico Teste 2</i> | 105 |
| 4.3 Resultados..... | 106 |
| 4.3.1 <i>Teste 1</i> | 106 |
| 4.3.2 <i>Teste 2</i> | 107 |
| 4.4 Discussão | 108 |
| 5. <i>Discussão Final</i> | 110 |
| 6. <i>Conclusões e Perspectivas</i> | 112 |
| 7. <i>Referências</i> | 113 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Inflamação*

A inflamação (do Latim *inflammatio*, ato de atear fogo) é um processo de proteção tecidual, no qual ocorre ativação celular e humoral em resposta a uma injúria estéril ou infecção no organismo. Essas respostas são, normalmente, agudas, em que as células do sistema imunológico inato são recrutadas em poucos minutos (neutrófilos) ou horas (monócitos) para o sítio da lesão. No princípio da ativação de uma inflamação, observa-se a produção de mediadores inflamatórios e compostos vasoativos, visando ao aumento da permeabilidade vascular, necessária para chegada e a ativação de outras células inflamatórias, o que culmina no reparo dos tecidos (NATHAN; DING, 2010). O disparo de uma rápida e eficiente resposta inflamatória é um evento evolutivamente muito bem conservado e a sua resolução é igualmente importante para a manutenção da homeostase corporal (TRACEY, 2007). E essa homeostase é essencial para a manutenção da saúde do organismo, pois uma resposta imune insuficiente ou excessiva sabidamente causa diversas doenças. No segundo caso, ocorre uma sinalização inflamatória excessiva e sem-fim, e isso pode acarretar o desenvolvimento de patologias, como artrite reumatoide, aterosclerose, câncer, obesidade e doenças neurodegenerativas (NATHAN; DING, 2010).

Todas as patologias acima descritas estão ligadas por um elo comum, o estado inflamatório crônico, ou seja, a não resolução da inflamação. Os mecanismos envolvidos no surgimento de doenças metabólicas crônicas de natureza inflamatória convergem para um estilo de vida que envolve a produção de alimentos em larga escala, com altas ingestões calóricas, como o consumo de grandes quantidades de carboidratos e lipídios, aliado ao baixo nível atividade física. Isso torna importante entender-se os processos envolvidos na “não resolução da inflamação” gerada por estes estímulos.

1.2. *Via de choque térmico*

No decorrer de uma resposta inflamatória, até a sua resolução, ocorre a ativação de fatores de transcrição nucleares da família κ B (NF κ B), cuja ativação

conduz o processo inflamatório durante sua fase inicial, simultaneamente promovendo sua resolução. No início da resposta inflamatória e sob o controle do NF κ B, enzimas induzíveis (incluindo a ciclo-oxigenase 2, ou COX-2) levam à síntese de prostaglandinas, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), responsável pela indução da febre. Como consequência desse aumento na temperatura central, observa-se o disparo da resposta de choque térmico (HSR, do inglês, *Heat Shock Response*), uma ativação transcricional altamente conservada durante a evolução e baseada na ativação do fator de transcrição de proteínas do choque térmico-1 (HSF1), o que depende da via da sirtuína 1 (SIRT-1) (SINGH; HASDAY, 2013). O impacto principal da ativação do HSF1 é a elevada produção das proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat Shock Protein*), cujo representante mais abundante é a proteína da família de 70 kDa (HSP70).

Várias serino/treoninoquinases, por outro lado, são ativadas por estímulos inflamatórios ou fatigantes e contribuem para a inibição da sinalização da insulina, o que inclui a ativação das proteínas cinases Jun-c amino terminal (JNKs). Estudos com indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica mostram ainda que o processo inflamatório que se inicia no tecido adiposo propaga-se para o fígado levando a uma redução na expressão de HSF1, HSP70 e aumento expressivo na atividade das JNKs tanto no fígado quanto no tecido adiposo (DI NASO; PORTO; FILLMANN; MAGGIONI *et al.*, 2015), o que perpetua a inflamação sistêmica (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014). A ativação de receptores do tipo toll (TLRs) no intestino de animais obesos como decorrência do desbalanço nutricional (modificação da microbiota intestinal) também dispara respostas inflamatórias sistêmicas que induzem resistência à insulina (CARICILLI; SAAD, 2013). Entretanto, estudos mostram que a HSP70 inibe a ação de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a inflamação e melhorando a sensibilidade do receptor de insulina (IR) (GEIGER; GUPTE, 2011; MARTÍNEZ DE TODA; DE LA FUENTE, 2015), sendo capaz de melhorar a interação da insulina com o IR no músculo esquelético por inibir ação da JNK (GEIGER; GUPTE, 2011; GUPTE; BOMHOFF; SWERDLOW; GEIGER, 2009). Na verdade, a presença intracelular da HSP70 está relacionada com preservação e melhora da sensibilidade à insulina tanto no músculo esquelético quanto no endotélio vascular (GEIGER; GUPTE, 2011; KARPE; TIKOO, 2014). Essa

associação torna-se mais evidente quando indivíduos com resistência à insulina (RI) e *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) possuem menor expressão de HSP70 no músculo esquelético (HENSTRIDGE; BRUCE; DREW; TORY *et al.*, 2014; RODRIGUES-KRAUSE; KRAUSE; O'HAGAN; DE VITO *et al.*, 2012).

A resposta de choque térmico é crítica para promover a resolução da inflamação impedindo que se torne crônica. Infelizmente, no entanto, parece que a resposta de choque térmico está severamente comprometida em tecidos metabólicos (tecido adiposo, fígado, músculo, pâncreas) durante a inflamação crônica (NEWSHOLME; HOMEM DE BITTENCOURT, 2016). A baixa atividade da via da resposta de choque térmico está aliada a resistência à insulina e ao agravamento do DMT2. Por outro lado, a expressão de HSP70, induzida farmacologicamente ou por transgenia, se mostrou protetora contra a resistência à insulina induzida pela obesidade em seres humanos e animais em modelos de obesidade (CALAPRE; GRAY; ZIMAN, 2013; CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008). Nesta mesma linha intervencionista, vários estudos têm mostrado que a administração oral de glutamina (um potencializador da ativação do HSF1 e, portanto, da síntese de HSP70 intracelular) pode melhorar muito a atividade de vias antioxidantes em tecidos metabólicos, como fígado, músculo e pâncreas (CRUZAT; PANTALEÃO; DONATO; DE BITTENCOURT *et al.*, 2014; LEITE; RAIZEL; HYPÓLITO; ROSA *et al.*, 2016; PETRY; CRUZAT; HECK; DE BITTENCOURT *et al.*, 2015; PETRY; CRUZAT; HECK; LEITE *et al.*, 2014), reduzindo a gliconeogênese hepática e estabilizando a glicemia *in vivo* (GAZOLA; GARCIA; CURI; PITHON-CURI *et al.*, 2007; OLIVEIRA-YAMASHITA; GARCIA; FELISBERTO-JUNIOR; CURI *et al.*, 2009). Por estas razões, abordagens farmacológicas (por exemplo, o BGP-15, atualmente em fase clínica III), bem como fisiológicas (tratamento hipertérmico por sauna ou imersão em água quente) são considerados como abordagens terapêuticas promissoras nas complicações relacionadas às obesidades e DMT2 (GOMBOS; CRUL; PIOTTO; GÜNGÖR *et al.*, 2011; HOOPER, 1999; HOOPER; BALOGH; RIVAS; KAVANAGH *et al.*, 2014; KRAUSE; LUDWIG; HECK; TAKAHASHI, 2015; MIRAGEM; HOMEM DE BITTENCOURT, 2017).

1.3. Obesidade

A incidência de doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, como a obesidade, DMT2, as doenças vasculares e doenças hepáticas não alcoólicas tem sido cada vez maior. Dados das projeções de 2018 da Organização Mundial da Saúde indicam que cerca de 2,3 bilhões de adultos estão com sobrepeso (39 % da população mundial), sendo que mais de 700 milhões de pessoas estão obesas no mundo (9 %).

Obesidade, resistência à insulina e DMT2 estão fortemente associados à inflamação crônica caracterizada pela produção anormal de citocinas pelo tecido adiposo visceral (HOMEM DE BITTENCOURT; NEWSHOLME, 2015; MIRAGEM; HOMEM DE BITTENCOURT, 2017; NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014). A resposta inflamatória que surge durante o desenvolvimento da obesidade depende do “estresse” celular provocado pelo acúmulo de lipídeos e excessivo aporte de outros nutrientes ao tecido adiposo, espalhando-se, para outros tecidos, como o muscular, fígado e vasos sanguíneos. Estudos de perfis transcricionais revelaram que os genes inflamatórios e de resposta ao estresse estão entre os mais abundantes conjuntos de genes regulados no tecido adiposo de animais obesos (SOUKAS; COHEN; SOCCI; FRIEDMAN, 2000; XU; BARNES; YANG; TAN *et al.*, 2003).

Sugere-se a interação entre genes reguladores do metabolismo e os do sistema imunológico, tais como: fator de necrose tumoral α (TNF α), leptina, adiponectina, resistina, as interleucinas 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 10 (IL-10) e proteína C reativa (PCR). Por exemplo, sabe-se que o TNF α ativa cascatas de transdução de sinais, incluindo algumas vias criticamente envolvidas na inibição da ação da insulina, como a ativação de JNKs na inflamação. O TNF α também é fortemente expresso no tecido adiposo e músculo esquelético de indivíduos obesos e, quando administrado na circulação, induz resistência à insulina (HOTAMISLIGIL; ARNER; CARO; ATKINSON *et al.*, 1995). A inibição da ação desta citocina em modelo de ratos obesos leva a um aumento na captação de glicose estimulada por insulina no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). O TNF α reduz a sinalização da insulina por induzir a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) no resíduo de serina 307 do músculo esquelético,

tecido adiposo e fígado, sendo que, no fígado, esta citocina age de forma dependente de JNK (HIROSUMI; TUNCMAN; CHANG; GÖRGÜN *et al.*, 2002; HOTAMISLIGIL; PERALDI; BUDAVARI; ELLIS *et al.*, 1996). Além disso, TNF α é um potencializador da atividade e expressão de diversas citocinas inflamatórias, gerando uma retroalimentação positiva para a inflamação.

À medida que o tecido adiposo é sobrecarregado com nutrientes, uma resposta inflamatória estabelece-se por conta do estresse de retículo endoplasmático (RE) e, conseqüente, à resposta a proteínas desdobradas (UPR, do inglês, *unfolded protein response*). A obesidade leva à sobrecarga do RE das células do tecido adiposo, o que é conhecido como estresse de RE, o que conduz à ativação de vias de sinalização inflamatórias, contribuindo, assim, para a resistência à insulina (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HOTAMISLIGIL, 2010; OZCAN; CAO; YILMAZ; LEE *et al.*, 2004). A associação entre obesidade e inflamação não resolvida centrada na contínua ativação do NF κ B é fator causal de agravamento da doença metabólica e tem, em sua essência, a UPR e é responsável pelo contínuo perfil secretor de citocinas (BIDEN; BOSLEM; CHU; SUE, 2014; CNOP; FOUFELLE; VELLOSO, 2012). Em todos estes casos, a inflamação de baixa grau decorrente do estresse de RE crônico é uma consequência da falência de resolução fisiológica da inflamação (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014; RIUS; LÓPEZ-VICARIO; GONZÁLEZ-PÉRIZ; MORÁN-SALVADOR *et al.*, 2012). Pois, como os estímulos inflamatórios não cessam de estimular o RE, uma alternativa à morte celular por apoptose é o estado de senescência proliferativa. No entanto, nessa situação, várias citocinas são ativadas (clivadas) e liberadas pelo adipócito sob estresse através da ativação do inflamassomo NLRP3 (do inglês, *NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3*), o que leva ao estado conhecido como fenótipo de secreção associado à senescência (SASP do inglês, *senescence-associated secretory phenotype*). A ativação desse inflamassomo leva à destruição da proteína ligante de mRNA (HuR, o antígeno humano R, também conhecido como ELAV-1) que, por sua vez, é indispensável para a expressão e estabilidade do mRNA mensageiro do HSF1 perpetuando, portanto, a inflamação que se dissemina por todo o organismo (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014).

1.4. Choque térmico

Como dito anteriormente, existem diferentes indutores da HSR. Entre eles, temos a variação da temperatura, tanto a hipertermia, quanto a hipotermia são fortes ativadores da via de choque térmico (LI; WERB, 1982; RADA; TONINO; ANSELM; STRAUSS, 2005). A essa variação da temperatura nos referimos como choque térmico.

O choque térmico por si só tem demonstrado inúmeros efeitos benéficos para o organismo por gerar redução na deposição de gordura, resistência à insulina e massa corpórea total (KRAUSE; LUDWIG; HECK; TAKAHASHI, 2015). Sendo que a primeira indicação de uso terapêutico do choque térmico foi relacionada a sua capacidade de reduzir a glicemia de humanos diabéticos submetidos a sessões de sauna (HOOPER, 1999).

Experimentos em camundongos, avaliando o efeito de uma sessão aguda de choque térmico, com elevação da temperatura corporal para 41,5 °C por 15 minutos verificaram um aumento transitório do HSP72 no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo durante 24 horas após a sessão (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008). Evidências sugerem o potencial da terapia térmica como uma modalidade de tratamento para doenças crônico-degenerativas relacionadas à obesidade (BRODMERKEL; TAYLOR, 2016). Além disso, o tratamento hipertérmico é especialmente promissor para pessoas com obesidade severa (grau III) às quais o acesso ao exercício físico é inicialmente dificultado. Inclusive, animais modelo de aterosclerose (camundongos nocaute para receptores de LDL alimentados com dieta hiperlipídica), submetidos a tratamento com 8 sessão de choque térmico (41,5 °C durante 15 min, uma vez por semana), mostraram diminuição na mortalidade e atenuação no quadro da doença vascular, aumentado o fluxo sanguíneo coronariano e revertendo o bloqueio da resposta de choque térmico característico da doença (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019).

Neste contexto suspeita-se que o tratamento térmico poderia ser capaz de reverter a senescência do tecido adiposo e, conseqüentemente, da resistência à insulina. O choque térmico poderia agir bloqueando a ativação do inflamassomo NLRP3 (LEVIN; WICKLIFFE; LEPPLA; MOAYERI, 2008) permitindo o restabelecimento de uma completa resposta de choque térmico via SIRT1 e proteína

cinase ativada por AMP (AMPK) o que, por sua vez, dispararia o processo de ativação do coativador-1 α do receptor- γ (PPAR γ) ativado por proliferadores de peroxissomos (PGC-1 α) levando à biogênese mitocondrial e aumento do metabolismo oxidativo celular (KITADA; KOYA, 2013). Ou seja, o tratamento térmico poderia ser capaz de reativar a resposta de choque térmico num mecanismo a montante (sobrejacente ou, como no inglês, *upstream*) à ativação do HSF1, por uma redução do complexo NLRP3 impedindo a destruição do HuR que, por sua vez, é responsável pela ativação da SIRT-1 e consequente manutenção da expressão de HSF1 e da resposta de choque térmico (HSR). Porém, essa possibilidade ainda não foi testada *in vivo*.

1.5. Avaliação da capacidade de resposta ao choque térmico

Uma vez que se espera que células de animais munidos de boa resposta anti-inflamatória baseada na HSR respondam a desafios térmicos expressando HSP70 fortemente, a relação da capacidade da HSR seria uma ferramenta capaz de avaliar o desenvolvimento e prognóstico de doenças inflamatórias crônicas. Alguns grupos de pesquisa já exploram estas observações em células, baseadas na intensidade da indução e liberação desta *chaperona* por células imunológicas humanas isoladas desafiadas termicamente comparadas às mesmas amostras incubadas a 37°C (controle) por igual tempo (DE LEMOS MULLER; DE MATOS; GRIGOLO; SCHROEDER *et al.*, 2019; DE LEMOS MULLER; RECH; BOTTON; SCHROEDER *et al.*, 2018; LANCASTER; FEBBRAIO, 2005; NJEMINI; ABEELE; DEMANET; LAMBERT *et al.*, 2002; RAO; WATSON; JONES, 1999).

Seria interessante a aplicação destas técnicas minimamente invasivas para os estudos utilizando modelos animais, tornando-os translacionais e possibilitando a correlação entre os achados nos tecido metabólicos (e.g. fígado, tecido adiposo, músculos) desses modelos e a evolução das doenças inflamatórias. No entanto, até o momento nenhum grupo apresentou dados utilizando este tipo de ferramenta para modelos animais, nem utilizando amostras de sangue total, uma técnica que permitiria uma fácil avaliação clínica da HSR.

PARTE I

2. **PARTE I – ACOMPANHAMENTO TEMPORAL DA RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo Geral

Caracterizar a evolução da senescência proliferativa no tecido adiposo branco visceral, da resistência à insulina e da inflamação crônica em modelo de obesidade em camundongos, submetidos a dieta hiperlipídica (HFD) ou não em diferentes tempos.

2.1.2. Objetivos Específicos

Acompanhar o desenvolvimento da obesidade por meio de medidas de peso, composição corporal, índice de Lee, consumo alimentar e eficiência metabólica;

Acompanhar o desenvolvimento da resistência à insulina e intolerância a glicose por meio de testes de curva glicêmica e índices de resistência;

Avaliar o efeito do desenvolvimento da obesidade na capacidade de resposta ao choque térmico em células do sangue periférico por meio do desafio térmico em sangue total;

Verificar o possível prejuízo da expressão das proteínas da via de choque térmico (HSP70, HSF1 e SIRT1) nos diferentes tempos;

Determinar o imunoconteúdo do inflamassomo NLRP3 no tecido adiposo.

2.2. Métodos

2.2.1. Local de Realização

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Localizado no campus central da UFRGS (Av. Sarmiento Leite nº 500, 2º andar, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS).

2.2.2. Considerações Éticas

Os procedimentos realizados no presente estudo estavam de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais, instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA de 20 de setembro de 2013.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, e encontra-se protocolado sob nº 23811 na Base de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.

2.2.3. Estatística e Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (20 ± 10 ng/mL para a principal variável crítica do estudo, a expressão de HSP70) (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008). Utilizando-se para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de $p < 0,05$ e o software de Dimensionamento Amostral DIMAM 1.0 para Windows da Editora Guanabara Koogan. O número de animais utilizados para a execução do projeto foi o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento, perfazendo um total de seis animais por grupo.

O programa estatístico utilizado para as análises foi GraphPad Prisma versão 6.0. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando paramétricos, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas

vias com análise de medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey. Se considerados não-paramétricos os dados foram tratados, realizando transformação para logaritmo em base dez, para apresentarem distribuição normal e receber as mesmas análises citadas acima (como mostrado na figura 1).

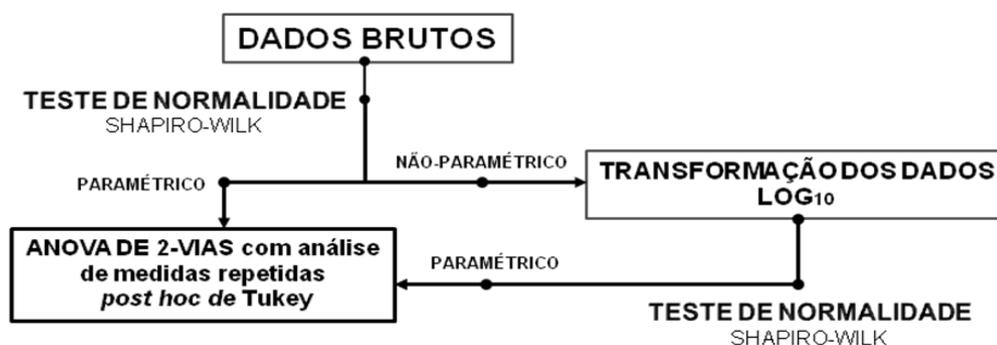


Figura 1: Fluxograma do tratamento estatístico dado aos dados.

2.2.4. Animais utilizados

Foram utilizados 48 camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6J separados logo após o desmame obtidos do Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Fisiologia, ICBS – UFRGS, mantido pelo Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel. Os animais permaneceram no mesmo biotério, em caixas de polipropileno (300 x 200 x 130 mm, totalizando uma área interna de 416 cm²) em ambiente enriquecido (como mostrado na figura 2). O biotério possuía um ciclo de claro (iluminação artificial) /escuro de 12 h, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar entre 50 e 60 %. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante todo período. Nessas condições, a temperatura dentro de seus respectivos ninhos (28 °C) foi mantida próxima da termoneutralidade para camundongos (MALONEY; FULLER; MITCHELL; GORDON *et al.*, 2014).



Figura 2: Ambiente interno da caixa moradia dos animais, evidenciado com as setas os itens utilizados como enriquecedores ambientais. 1 – Iglu, 2 – Touca descartável para ninho e 3 – Cano de PVC.

2.2.5. Modelo de Obesidade

A dieta HFD empregada foi a mesma descrita em (WINZELL; AHRÉN, 2004). Com base na quantidade de calorias ingeridas pelos animais, a dieta de elevado teor de gordura (HFD, do inglês, *High Fat Diet*) consistindo de 58% das calorias em termos de gordura oriunda de banha de porco, 25,6% de carboidrato e 16,4% de proteína (total 23,4 kJ / g). A dieta controle (NC, do inglês, *Normal Chow*) teve a composição de 11,4% de gordura, 62,8%, de carboidrato e 25,8% de proteína (total de 12,6 kJ / g) (BOCK; KRAUSE; SCHROEDER; HAHN *et al.*, 2016). A apresentação das duas rações está mostrada na figura 3.

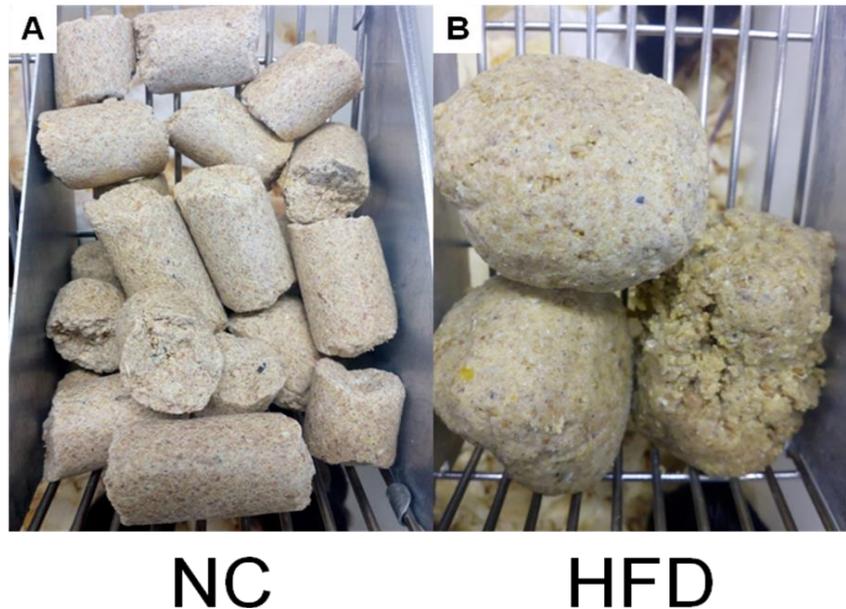


Figura 3: Apresentação das rações empregadas em cada dieta: A – ração padrão de animais de laboratório (NC, Normal Chow) e B – dieta hiperlipídica (HFD, High Fat Diet).

2.2.6. Desenho Experimental

Conforme apresentado na figura 4, os camundongos foram submetidos a dieta controle (NC) ou hiperlipídica (HFD) logo após o desmame e mantidos por dez (T10), quatorze (T14), dezoito (T18) ou vinte e duas (T22) semanas de tratamento. Esse protocolo equiparar-se-ia a indivíduos humanos consumindo a mesma dieta desde o desmame até trinta e cinco (T10), quarenta e seis (T14), cinquenta e seis (T18) e sessenta e sete (T22) anos de vida.

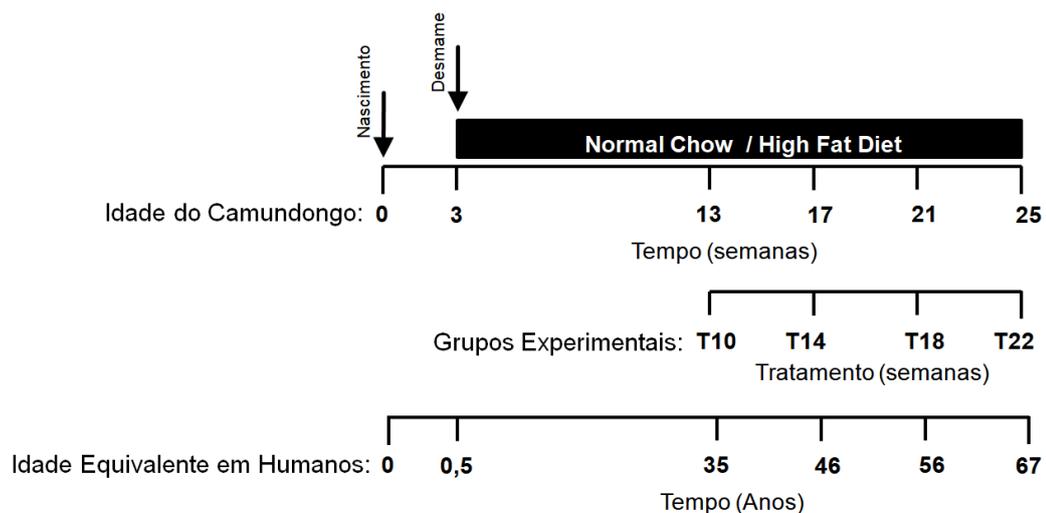


Figura 4: Desenho experimental da Parte I.

2.2.7. Testes de Tolerância a Glicose e Insulina

O teste oral de tolerância à glicose (OGTT) e teste intraperitoneal de intolerância a insulina (IPITT) foram realizadas na semana anterior à data da morte dos animais de cada grupo. Cada teste foi realizado com no mínimo 48 h de diferença entre eles. Ficando os animais em jejum, no período diurno, 6 h antes de cada teste. As medições de glicemia foram realizadas por punção caudal, utilizando 1 μ L (um microlitro) de sangue para verificação no glicosímetro Accu-Chek (Roche).

2.2.7.1. Teste Oral de Tolerância a Glicose (OGTT)

Para a realização do teste de OGTT foi preparada uma solução de glicose 50 % (m/v) em água potável, administrada na concentração 1 g/kg, por gavagem. Para a obtenção da curva glicêmica, o valor da glicemia em jejum (6 horas) foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (tempo zero) e nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. Para o cálculo da área incremental sob a curva (AUC), usada como um coadjuvante para a análise do teste de tolerância, possibilitando a comparação entre os grupos, utilizou-se o método de quadratura do trapézio (WOLEVER, 2006). Assim a área sob a curva foi calculada pela lei de formação da integral de uma função no plano cartesiano, excluindo-se do cálculo as áreas abaixo da linha de jejum, inclusive quando qualquer ponto for menor que a glicemia inicial, conforme demonstrado no exemplo B da figura 5, neste caso usa-se para do tem semelhança de triângulos.

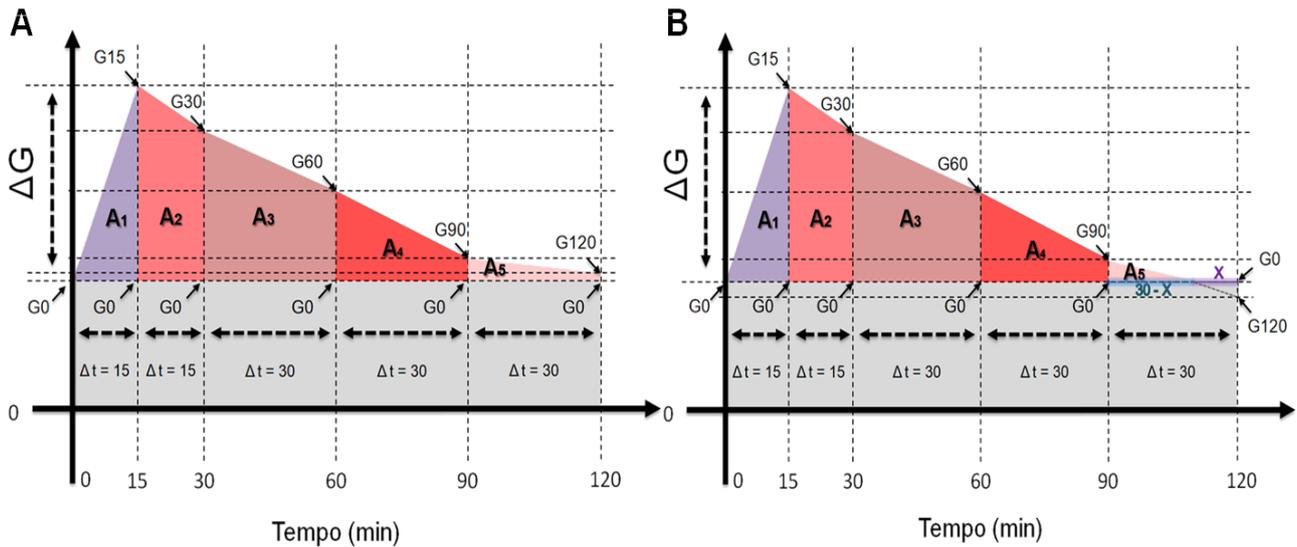


Figura 5: Representação esquemática das formas geométricas formadas pela área sob a curva. A – Representação de uma curva em que todos os valores medidos foram maiores que o valor inicial (G_0). B – Representação de uma curva em que o valor final seja mais baixo que o inicial (G_0).

2.2.7.2. Teste Intraperitoneal de Tolerância a Insulina (IPITT)

Os testes de tolerância à insulina foram realizados com animais mantidos em jejum de 6 horas. Foi utilizada Insulina Humalog Regular – Lilly 100 UI/mL, preparada em PBS (NaCl (136,8 mM), KCl (2,7 mM), KH_2PO_4 (0,9 mM), Na_2HPO_4 (6,4 mM)) 1UI/mL, e aplicada na concentração de 1,5 UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal.

O valor da glicemia em jejum foi mensurado após os animais permanecerem no laboratório por no mínimo 30 minutos (tempo zero) e novamente nos tempos 15, 30 e 45 minutos após a injeção de insulina.

O cálculo da área incremental sob a curva invertida (iAUC), usado na comparação entre os grupos, foi gerado pelo método de quadratura do trapézio (WOLEVER, 2006), calculada geometricamente por meio da aplicação da regra trapezoidal, demonstrado esquematicamente na Figura 6.

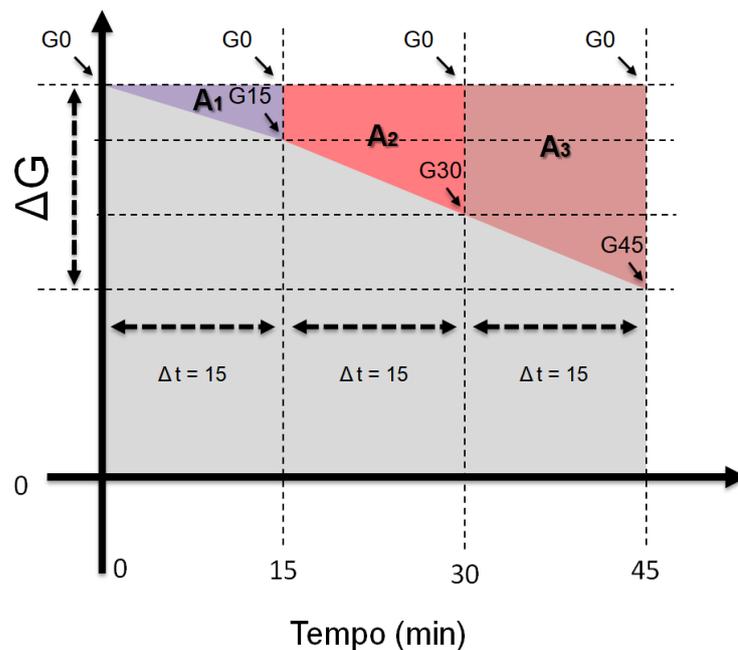


Figura 6: Representação esquemática das formas geométricas formadas pela área sob a curva invertida.

2.2.8. Acompanhamento de Parâmetros Metabólicos

Os animais semanalmente foram pesados, medidos e o consumo alimentar da dieta foi acompanhado. Esses dados compuseram informações de ganho de massa ao longo do tratamento, consumo alimentar, taxa metabólica basal, eficiência metabólica e Índice de Lee.

2.2.8.1. Consumo Alimentar

O consumo alimentar total da caixa foi medido semanalmente em gramas e dividido pelo número de animais residentes na respectiva caixa, que variou de 2 a 4 animais por caixa. Após, este valor foi transformado em kJ, pela multiplicação do valor em gramas por 12,6 (para a dieta padrão) ou 23,4 (para dieta hiperlipídica), correspondendo a equivalência energética (em kJ) por grama de cada dieta. Ainda, estes valores foram normalizados pelo peso de cada animal em gramas e expressos por dia.

2.2.8.2. Eficiência Metabólica

A eficiência metabólica foi medida pela divisão do consumo alimentar (mostrado acima) a cada duas semanas pelo delta (variação) do peso em gramas de

cada animal no mesmo período de tempo. Esta medida caracteriza a capacidade de utilização do organismo do que é consumido sem que haja a conversão em peso corpóreo (WINZELL; AHRÉN, 2004).

2.2.8.3. Índice de Lee

Este índice refere-se a medida da raiz cúbica do peso em gramas, dividido pelo comprimento naso-anal em milímetros de cada animal (LEE, 1929). A realização da medida do comprimento é ilustrada na figura 7.



Figura 7: Representação da medida do comprimento naso-anal dos animais.

2.2.9 Morte dos Animais

Os animais foram mortos após 12 h de jejum por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos, para posterior realização das análises. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos, considerando a necessidade de realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação, pois os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005), sendo que, alterações glicêmicas interferem no principal parâmetro medido, a HSP70 (CHUNG et al., 2008). Os animais foram

decapitados em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro.

Após a morte, os animais foram dissecados para coleta dos tecidos e para o descarte, foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C), destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Fisiologia Celular - FisCel da UFRGS. Seguindo o cronograma semanal da instituição, este material biológico foi encaminhado ao serviço de coleta por empresa licitada pela UFRGS, para então, ter destinação final dos resíduos (autoclavagem e aterro sanitário).

2.2.10 Medidas Morfométricas

Foram realizadas as pesagens das seguintes estruturas internas: coração, fígado, músculo gastocnêmio e tecido adiposo branco visceral e seus dados foram expressos em mg / g massa total do animal.

2.2.11 Dosagens Bioquímicas de Glicose e Insulina de Jejum

As análises bioquímicas de glicemia e insulinemia de jejum foram realizadas nas amostras de sangue coletadas na ocasião da eutanásia dos animais em tubos heparinizados. O plasma foi obtido após a centrifugação do sangue total por 15 min à 3.500 x g sob refrigeração (4 °C). E foram avaliadas por testes bioquímicos enzimáticos colorimétricos em leitora de ELISA, segundo protocolo e recomendações do fabricante.

2.2.11.1 Glicose

As medidas de glicose plasmática de jejum foram realizadas a partir de teste colorimétrico de marca LabTest sob o número de catálogo: 133.

2.2.11.2 Insulina

A análise do conteúdo plasmático de insulina foi realizado pelo teste desenvolvido pela empresa CAYMAN sob o número de catálogo: 26619.

2.2.12 Índices de Resistência à Insulina

Os índices de resistência à insulina foram calculados a partir do uso das medidas plasmáticas em jejum de 12 h de glicose e insulina, medidas referidas acima.

2.2.12.1 HOMA IR

Este índice diz respeito à resistência periférica a insulina e foi descrito (MATTHEWS; HOSKER; RUDENSKI; TURNER, 1985). Sendo seu valor obtido a partir da multiplicação da glicemia de jejum (em mM) pela insulina ($\mu\text{U/mL}$) dividido por 22,5.

2.2.12.2 HOMA BETA

O HOMA BETA é uma medida de funcionalidade da célula beta pancreática, e mede a capacidade de secreção de insulina por estas células. Também descrita por (MATTHEWS; HOSKER; RUDENSKI; TURNER, 1985), consiste na multiplicação da insulina de jejum por 20 e posterior divisão pela glicemia de jejum (mM) já subtraída por 3,5.

2.2.9 Análise Anatomopatológica

Fixação por imersão em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 4 h à temperatura ambiente para posterior desidratação (concentrações crescentes de álcool), clarificação com xilol e inclusão em parafina como descrito em (MACDOUGALD, 2014).

2.2.9 Detecção de Senescência Proliferativa no tecido Adiposo

Os testes de senescência tecidual e celular foram executados por meio da técnica genérica da atividade da enzima β -galactosidase citossólica em pH 6 (DIMRI; LEE; BASILE; ACOSTA *et al.*, 1995; MINAMINO; ORIMO; SHIMIZU; KUNIEDA *et al.*, 2009), conforme adaptação sugerida em (MINAMINO; ORIMO; SHIMIZU; KUNIEDA *et al.*, 2009).

As análises de intensidade de cor foram realizadas posteriormente com o uso do software Image-J versão 1.47 (National Institutes of Health, USA).

2.2.9.1 Macroscópica

Logo após a realização da incubação dos tecidos eles foram retirados e fotografados para análise macroscópica referente a intensidade de coloração.

2.2.9 Desafio Térmico

Parte do sangue coletado no momento da eutanásia dos animais foi separado para o teste do desafio térmico. O heparinizado foi dispersado em meio de cultura RPMI 1640 (1:10, v/v) para incubação por 1 h a 42 °C (choque térmico) e 7 h adicionais a 37 °C (para permitir a HSR). Os controles foram mantidos a 37 °C por todo o período (8 h). Após as incubações, as amostras foram centrifugadas e tratadas com tampão de hemólise para posterior preparo para técnica de eletroforese SDS-PAGE e imunodeteção das proteínas HSP72 (Hspa1a), HSP73 (Hspa8) e GAPDH (normalizador) como descrito abaixo.

2.2.10 Imunodeteção de Conteúdo Proteico

Para determinação da expressão de proteínas por Western Blotting, parte do tecido adiposo visceral, fígado, músculos sóleo e gastrocnêmio foram extraídos e coletados em tubo de ensaio contendo SDS 0,1 % (5 mL/g de tecido) e a adição um coquetel de inibidores de protease (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 100 µM, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK) 20 µM, Aprotinina 2 µg/mL e Leupeptina 2 µg/mL) e fosfatase (Ortovanadato de sódio 1mM, Molibdato de sódio 1 mM, β-glicerofosfato 1 mM) para serem homogeneizados em homogeneizador de facas Ultra 80. No caso do *pellet* de células do sangue total, o tampão de lise escolhido foi o RIPA Buffer (SIGMA ALDERICH, R0278) para serem homogeneizadas no sonicador. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 16.000g por 1 minuto a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo as amostras 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. Quantidades iguais de proteína (~40 µg por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% ou 15 % para separação durante 2 horas utilizando corrente elétrica constante a 100 V. O sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA,

USA) foi preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. E foi utilizado como marcador de peso molecular 5 μ L 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 100 V constantes por 2 h. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima teve confirmação pela coloração das membranas de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3 %, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3 %), sendo 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 e HSP73 foi utilizado anticorpo monoclonal anti HSP70 (Sigma H5147) que reconhece tanto a forma induzível de 72 kDa quanto a forma constitutiva de 73 kDa.; para determinar a expressão de HSF1 foi utilizado anticorpo anti-HSF1 (Sigma SAB4501448); a relação de senescência proliferativa celular com o status imunoinflamatório das células em estudo foi avaliada pelo teste da fragmentação da caspase-1 (anticorpo primário Santa Cruz, sc56036), em células e tecidos NLRP3-positivos (Sigma, SAB2501362) e SIRT1 (Sigma SAB2501994); como segundo anticorpo anti-IgG de camundongo foi utilizado um conjugado com peroxidase HRP (Sigma A9044); como segundo anticorpo anti-IgG de coelho foi utilizado um conjugado com peroxidase HRP produzido em cabra (Sigma A0545); a análise do conteúdo celular de GAPDH foi utilizada como normalizador, obtido por incubação com anticorpo anti-GAPDH conjugada contendo peroxidase (Sigma G9295) em diluições de 1:1000.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1 foto/10 s) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

2.3 Resultados

2.3.1 Parâmetros Metabólicos

2.3.1.1 Ganho de peso

Os animais HFD ganharam mais peso durante as semanas de acompanhamento. Todos os animais tiveram aumento de peso nas dez primeiras semanas, sendo prolongado este ganho de peso até 12^a semana nos animais tratados com dieta hiperlipídica. A partir da 6^a semana, o peso dos animais do grupo HFD já era maior que os mantidos em dieta padrão, como mostrado na figura 8.

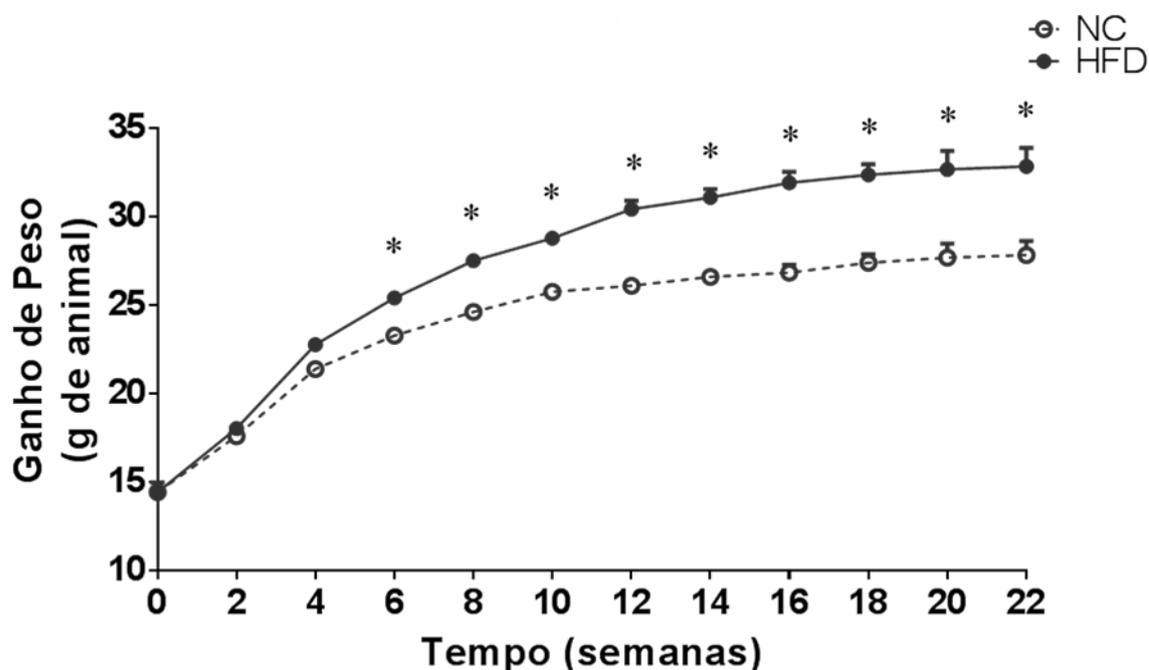


Figura 8: Ganho de peso dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias post hoc Tukey. * $p < 0,05$ da comparação entre as dietas.

2.3.1.2 Consumo Alimentar

Os animais mantiveram os mesmos níveis de ingestão calórica durante o tempo de projeto, independente da dieta administrada. O consumo alimentar medido semanalmente (a partir do desmame) até fim do tempo de observação de cada grupo não demonstrou diferença entre os animais tratados com as dietas: padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) e nem ao longo do tempo deste tratamento como

mostrado na figura 9. Os valores médios dos animais oscilaram entre 2,0 e 4,0 kJ por dia por grama de animal.

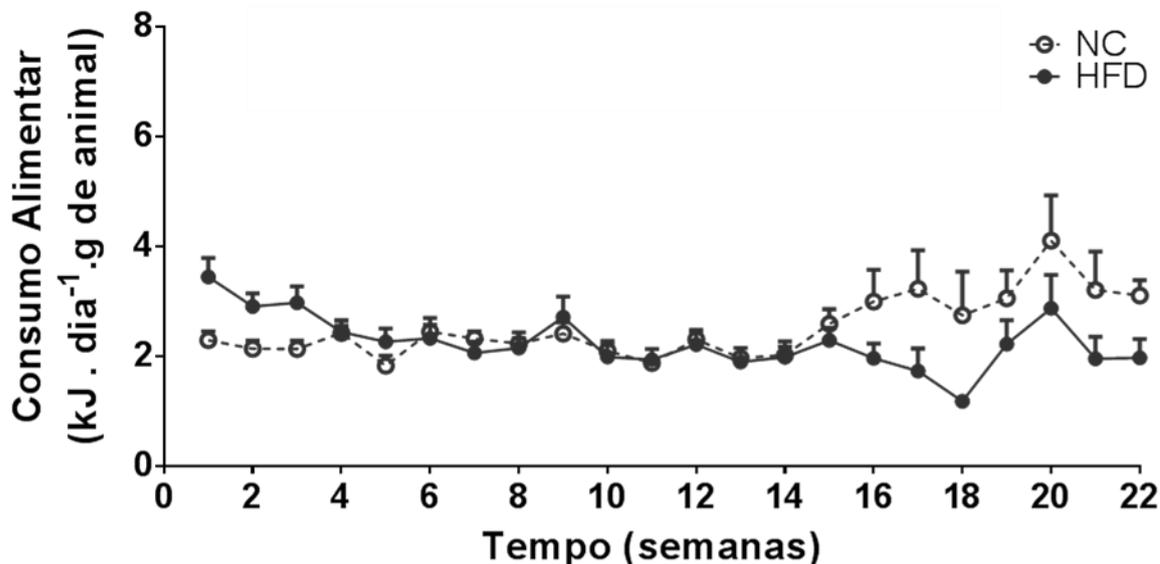


Figura 9: Consumo alimentar dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento em kJ por dia normalizado pelo peso de cada animal. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias *post hoc* Tukey.

2.3.1.2 Eficiência Metabólica

Quando consideramos a eficiência metabólica, ou seja, o quanto o organismo utilizou da energia consumida sem que houvesse a sua conversão em gordura, houve um aumento paralelo com as duas dietas a partir da 12ª semana, ocorrendo – de maneira inesperada – diferença entre elas apenas na 16ª semana quando os animais tratados com dieta padrão apresentaram um aumento médio de aproximadamente duas vezes na eficiência metabólica apresentada, conforme expresso na figura 10.

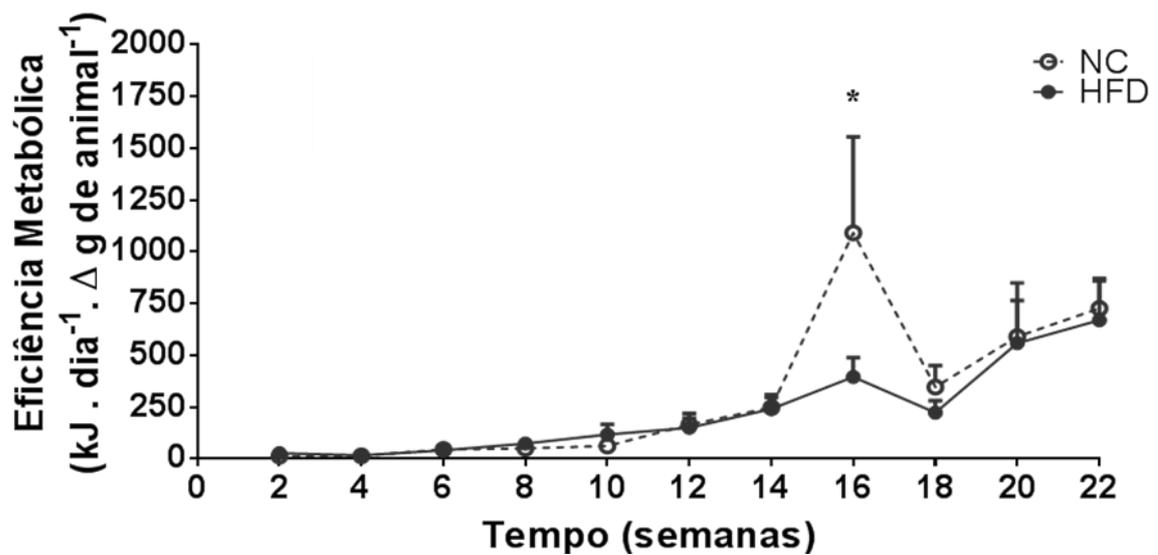


Figura 10: Eficiência Metabólica dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) ao longo das semanas de tratamento em kJ / dia / pela variação do peso de cada animal. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias post hoc Tukey. * $p < 0,001$.

2.3.1.3 Pesos iniciais e finais

Em relação aos pesos finais e iniciais dos animais tratados com NC e HFD por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) ou 22 (T22) semanas, os animais partiram do mesmo valor médio de peso inicial, próximo de 10 g (conforme figura 11-A) e finalizaram o tempo de acompanhamento, peso final (figura 11-B), com os animais HFD apresentando maior peso corpóreo nos grupos T14, T18 e T22 quando comparados ao NC de mesmo tempo, aproximadamente 5 g a mais. Sendo que os animais T18 e T22 HFD, também apresentaram maior peso que os animais de mesma dieta do T10.

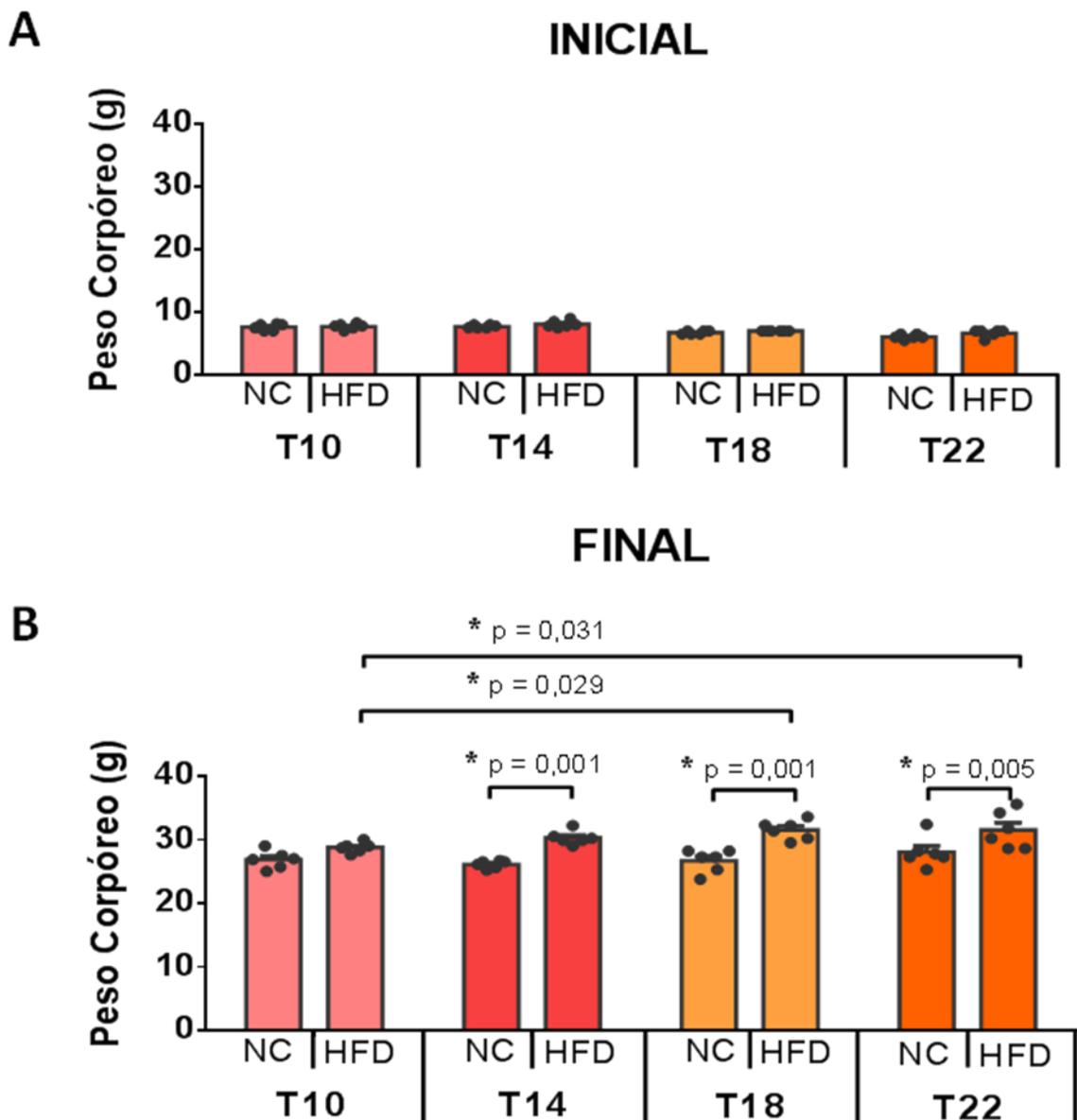


Figura 11: Peso corpóreo dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A: valores iniciais obtidos no desmame; B: valores finais obtidos na véspera da eutanásia dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças indicadas no gráfico.

2.3.1.4 Índice de Lee

Diferentemente do esperado, tendo em vista o resultado de ganho de peso, os valores dos índices de Lee iniciais (A) e finais (B) dos animais não mostraram diferença entre as dietas, nem entre os diferentes tempos de acompanhamento (dados apresentados na figura 12).

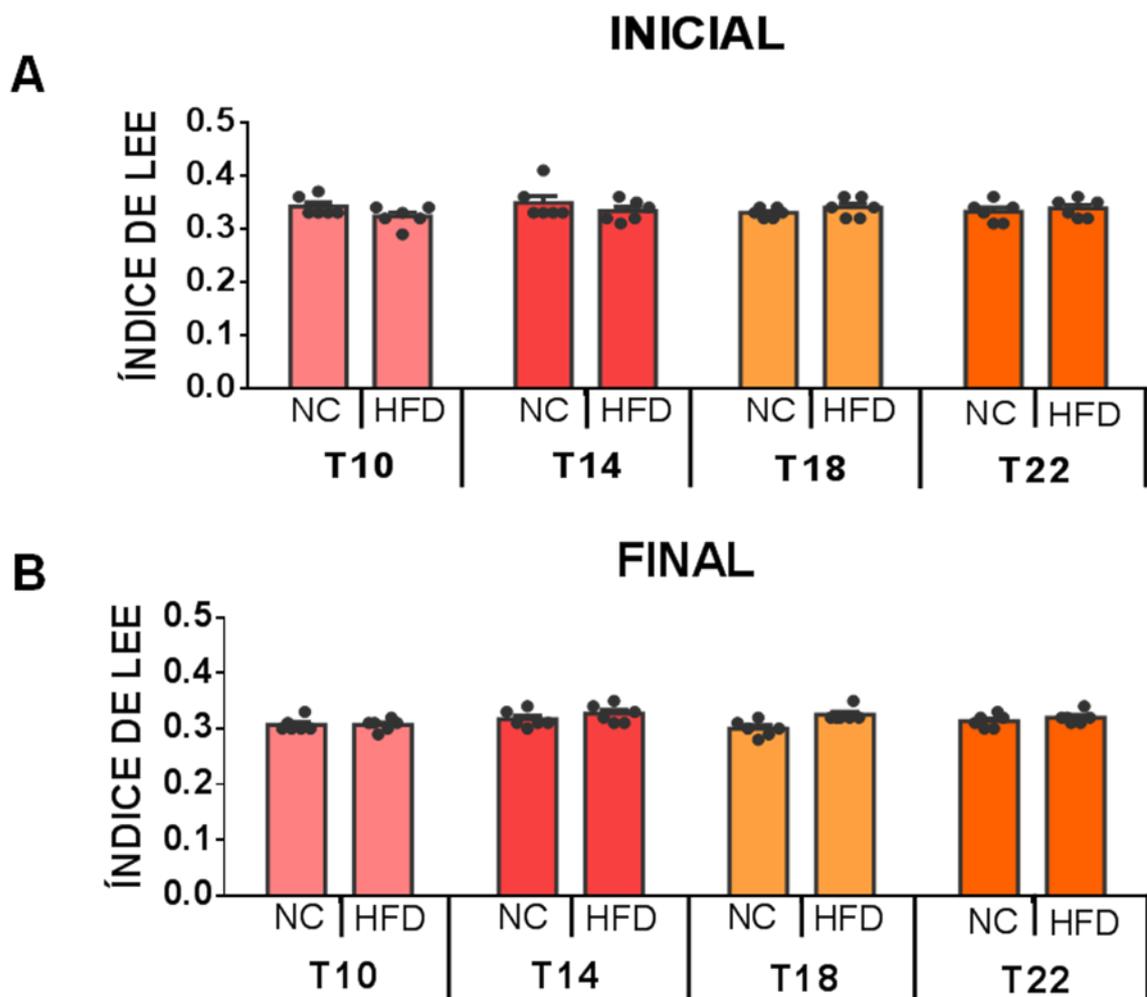


Figura 12: Índice de Lee dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A: valores iniciais obtidos no desmame; B: valores finais obtidos na véspera da eutanásia dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.2 **Medidas Bioquímicas**

2.3.2.1 *Glicemia*

Os valores glicêmicos de jejum dos animais HFD foram maiores (aumento médio de aproximadamente 1,5 vezes) que seus controles tratados por igual tempo, até a 14^a semana de acompanhamento quando, então, não mais se observou diferença entre os grupos (figura 13).

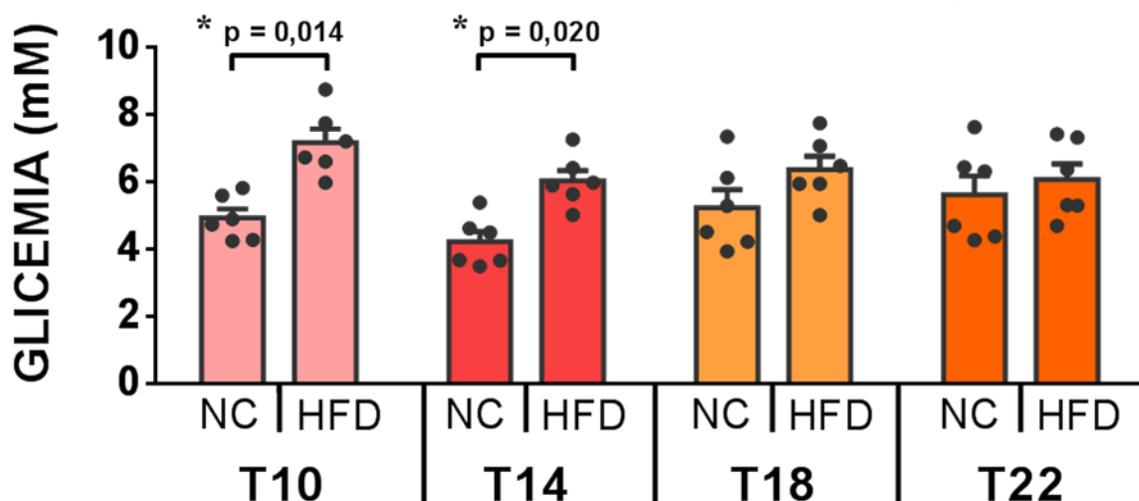


Figura 13: Glicemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre NC e HFD. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.2.2 Insulinemia

As medidas de insulina plasmática de jejum dos animais (apresentadas na figura 14) apresentaram diferenças do efeito da dieta apenas entre os animais tratados por até 10 semanas, com aumento nos animais HFD. Nos demais, não foi observada diferença entre seus respectivos controles (NC), devido, talvez, ao próprio aumento destes valores nos grupos NC tratados por 14 e 22 semanas em relação aos animais T10 de mesma dieta, mostrando um efeito do tempo mesmo nos animais mantidos com dieta padrão.

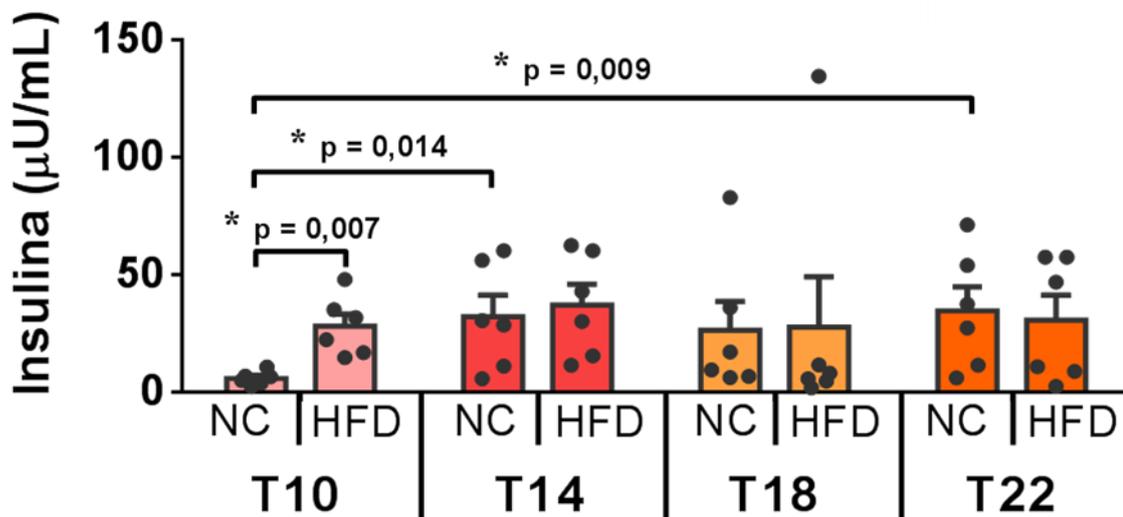


Figura 14: Insulinemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre dieta e tempo, conforme indicado no gráfico. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.3 Índices de Resistência à Insulina

2.3.3.1 HOMA IR

Os dados do índice HOMA referente à resistência à insulina (IR) são mostrados na figura 15 e mostram diferença no tratamento dietético no grupo T10, com aumento de cerca de duas vezes nos animais HFD em relação aos NC. Também houve um aumento semelhante desse índice nos animais tratados com dieta padrão por 22 semanas em comparação aos animais de mesma dieta tratados apenas por 10 semanas, indicando uma piora do índice nos animais também tratados em dieta padrão dependente do tempo do acompanhamento do animal.

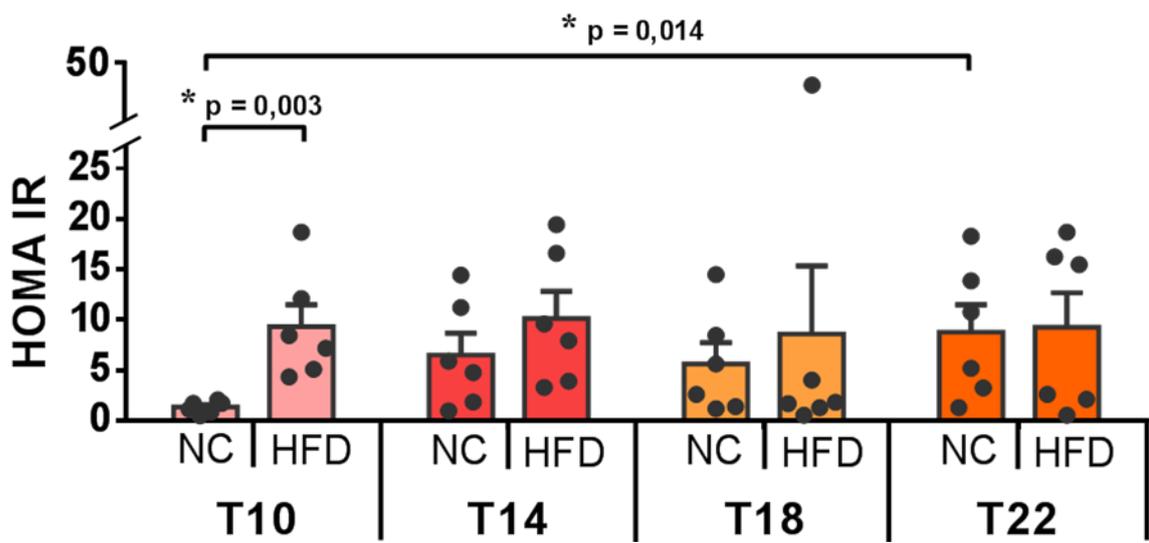


Figura 15: HOMA IR dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre dieta e tempo, conforme indicado no gráfico. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.3.2 HOMA BETA

O índice HOMA relacionado à função das células beta-pancreáticas, embora alguns valores obtidos nos grupos T14, T18 e T22 terem sido muito altos, não apresentou diferenças nas comparações nem entre dieta, nem tempo de tratamento dos animais acompanhados (dados apresentados na figura 16).

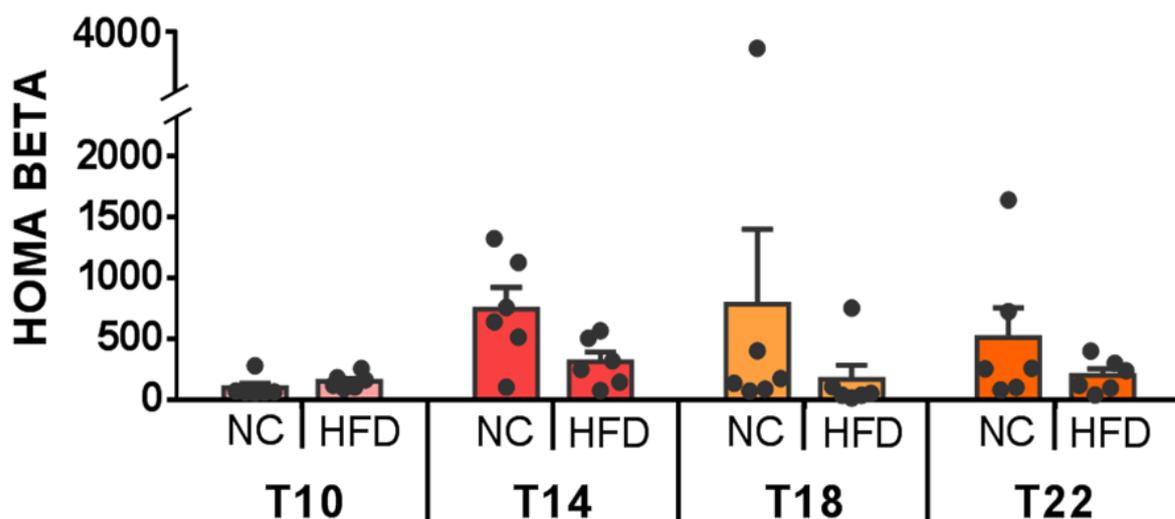


Figura 16: HOMA BETA dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.4 Testes de tolerância a Glicose e Insulina

2.3.4.1 OGTT

O teste de tolerância oral a glicose demonstrou diferenças entre as dietas apenas na curva do grupo tratado por até 10 semanas (T10), nos pontos de 90 e 120 minutos, nos quais a glicemia dos camundongos HFD foi mais elevada, demonstrando um retardo no retorno da glicemia ao nível basal (figura 17-A). Não foi observada diferença entre as dietas nos grupos tratados por mais tempo (figura 17-B, C e D), bem como na área incremental sob as curvas calculadas para os diferentes tempos (figura 17).

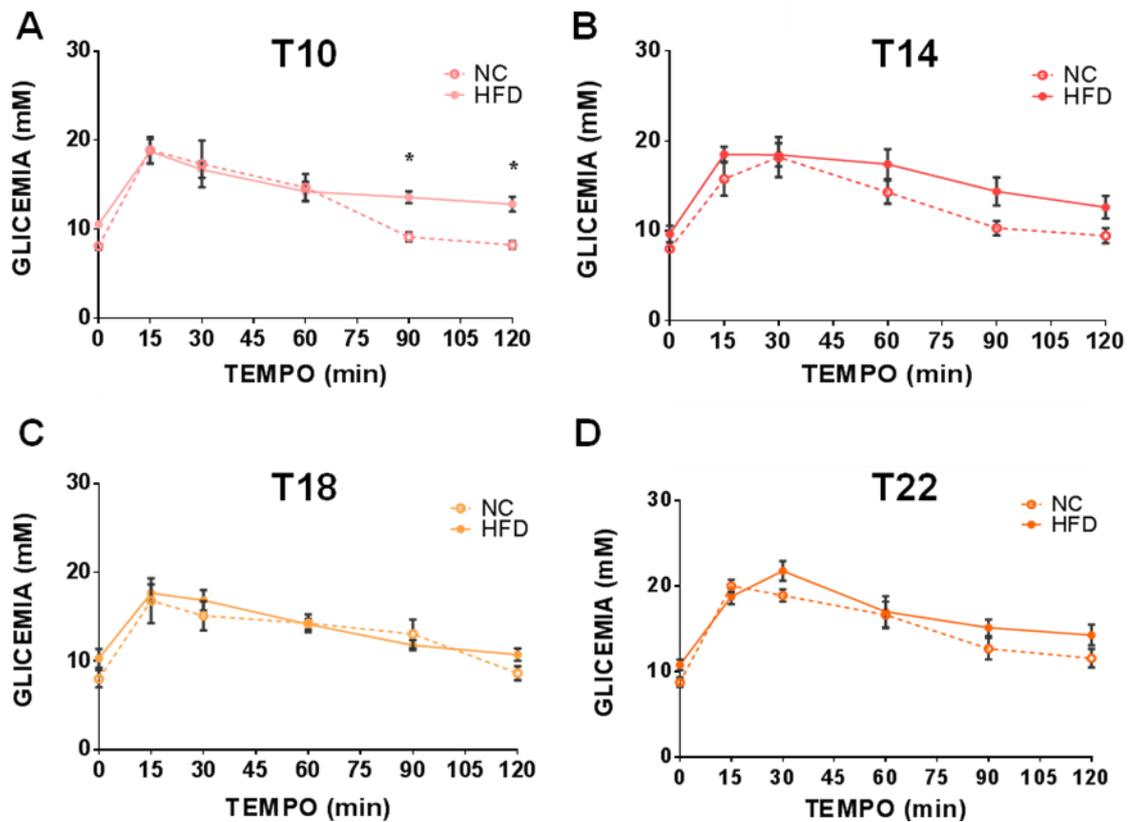


Figura 17: Curva de tolerância oral à glicose realizada em animais mantidos sob dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). A: grupo tratado por 10 semanas (T10); B: grupo tratado por 14 semanas (T14); C: grupo tratado por 18 semanas (T18); D: grupo tratado por 22 semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre NC e HFD. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

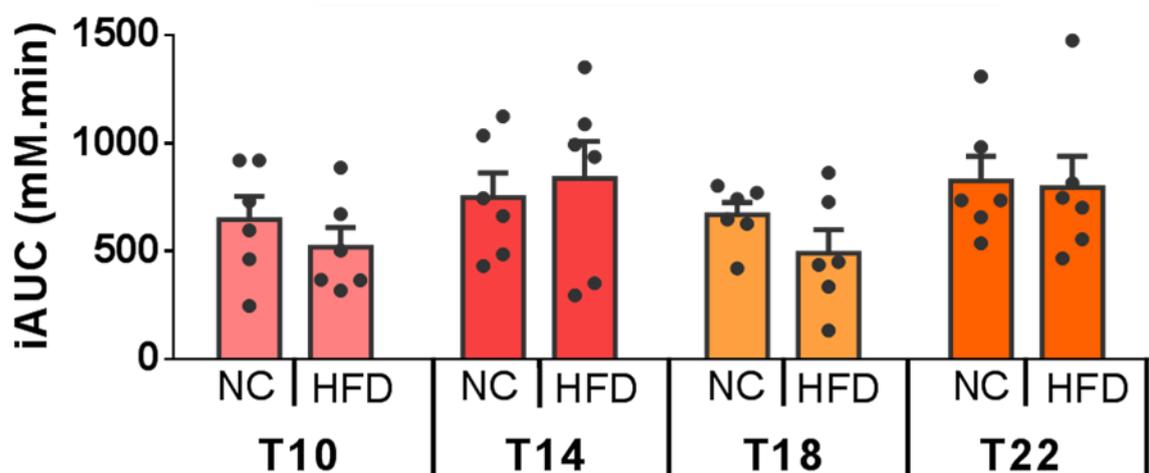


Figura 18: Área incremental sob a curva do OGTT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.2.10.1 IPITT

O teste de tolerância intraperitoneal à insulina revelou um maior valor de glicemia medida entre os animais tratados com dieta hiperlipídica (HFD) em relação ao de dieta padrão (NC) no ponto 0 (antes da injeção de insulina) em todos grupos (T10, T14, T18 e T22) (Figura 19). Foi também observado um maior valor de glicose no sangue dos animais HFD tratados por 10 semanas, comparados ao seus controles, nos pontos 15, 30 e 45 minutos, correspondendo a uma resposta diminuída frente ao estímulo da insulina para a captação de glicose (Figura 19-A). Essa resposta também foi observada, em menor grau, no grupo HFD tratado por 14 semanas que teve sua manutenção da sua glicemia do ponto 15 minutos para 30 minutos e este último foi diferente dos animais NC de mesmo tempo (Figura 19-B). Nos grupos T18 e T22, a resposta de animais NC e HFD foi semelhante, tendo uma queda nos primeiro 15 minutos e depois se mantendo estável até o final do teste. A área sob a curva invertida destes gráficos é apresentada na figura 20, e não demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os animais. Porém, no grupo T10 há uma aparente redução da área sob a curva com $p = 0,058$.

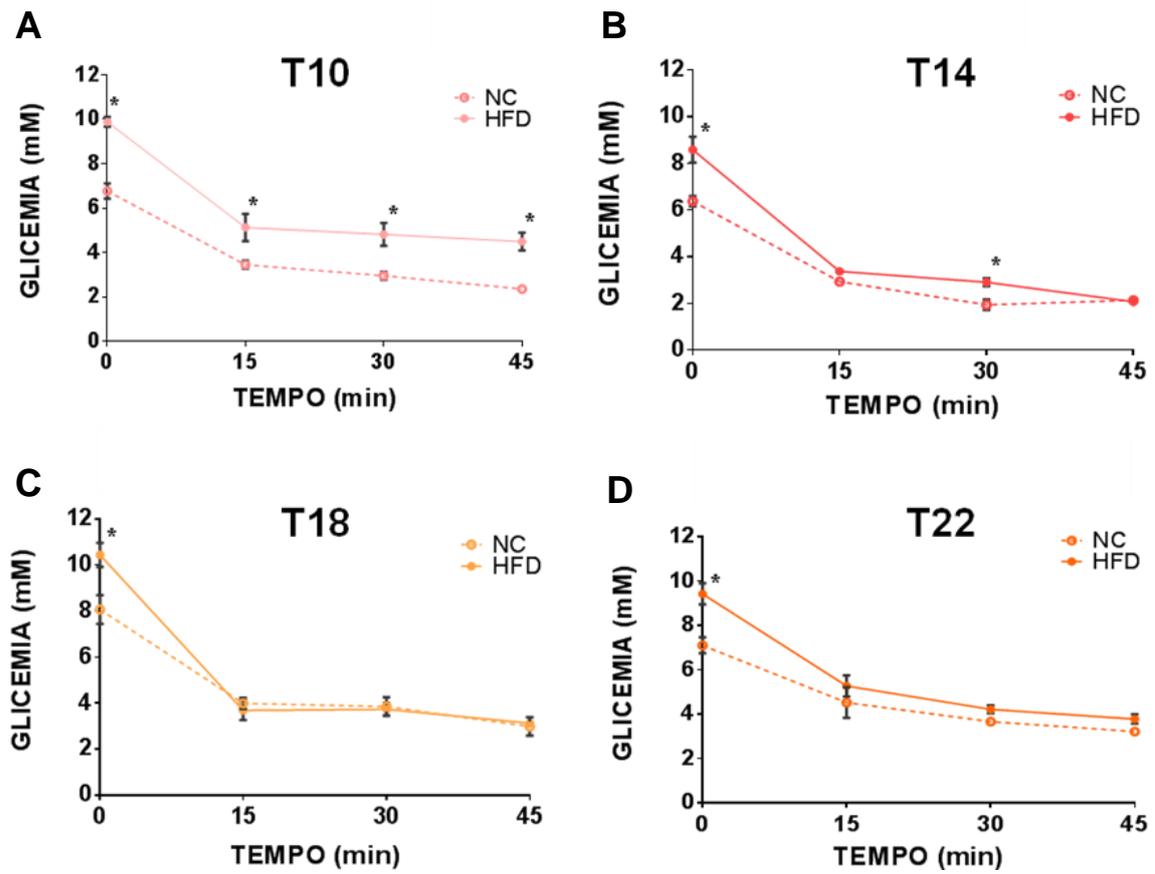


Figura 19: Curva de tolerância intraperitoneal à insulina realizada em animais mantidos sob dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). A: grupo tratado por 10 semanas (T10); B: grupo tratado por 14 semanas (T14); C: grupo tratado por 18 semanas (T18); D: grupo tratado por 22 semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre NC e HFD. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey

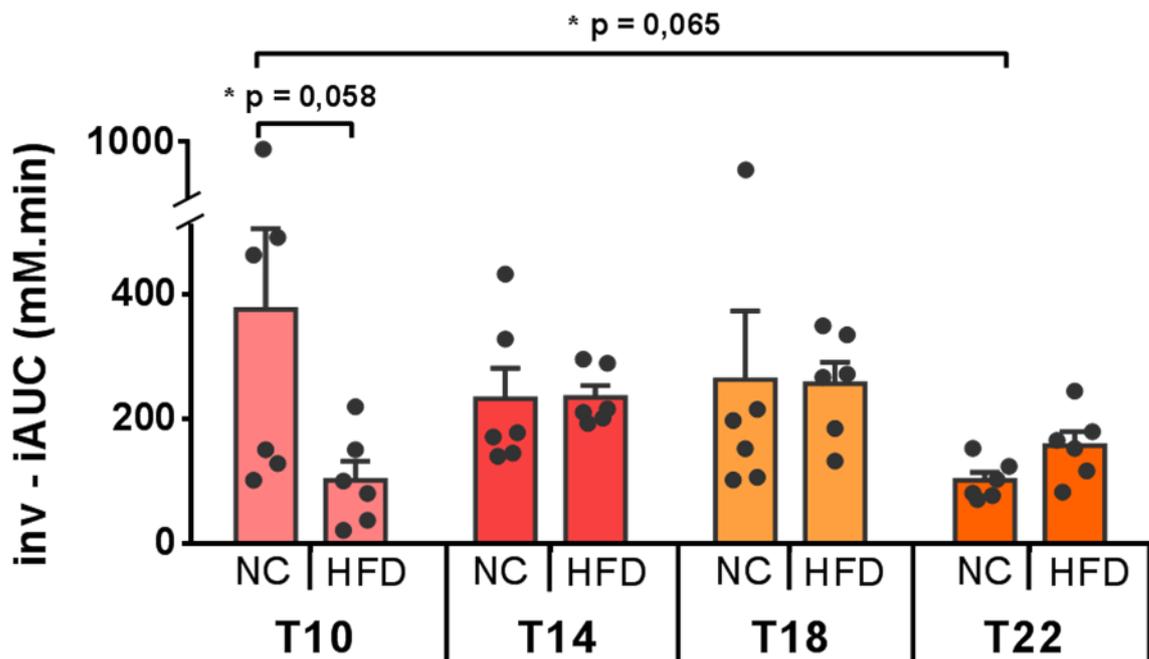


Figura 20: Área incremental sob a curva invertida do IPITT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.5 Medidas Morfométricas

Na figura 21, estão mostradas imagens representativas do fígado (A), tecido adiposo visceral (B) e vista superficial da deposição de gordura abdominal (C) dos animais eutanasiados de cada grupo de dieta em cada tempo de tratamento. Cabe observar o efeito da dieta no aspecto da coloração hepática, se tornando mais opaca nos grupos T18 e T22, o que se acentua nos animais HFD. Observa-se ainda aumento de conteúdo de tecido adiposo visceral extraído e visualizado nos grupos HFD em comparação aos NC em todos os tempos, demonstrando a efetividade da dieta.

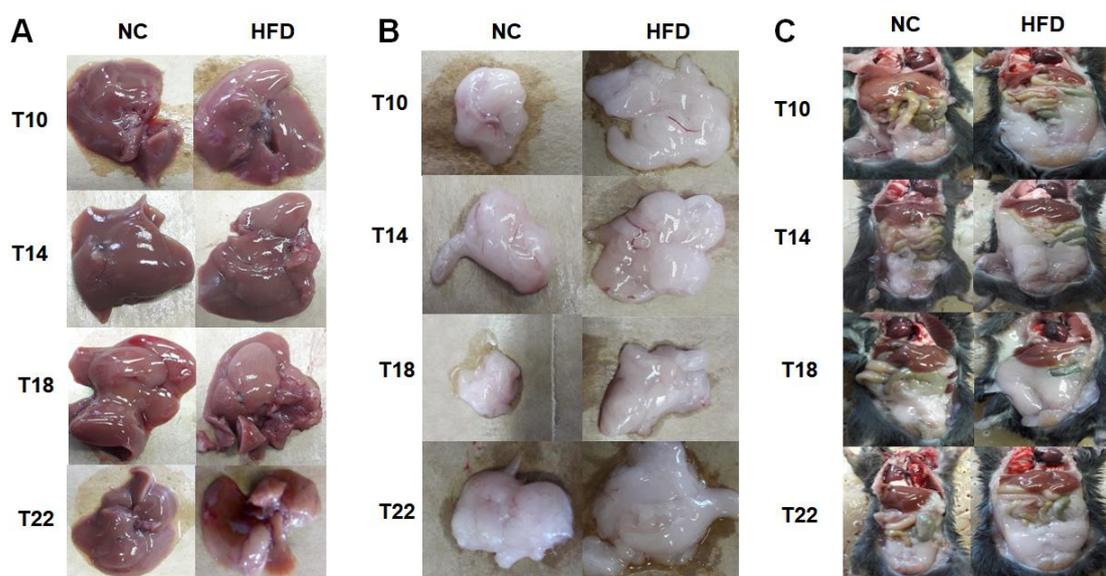


Figura 21: Imagens representativas obtidas dos tecidos dos animais tratados com dieta padrão (NC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A- Fígados; B – Tecido Adiposo Visceral; C – Carcaça recém-aberta.

A relação tecido adiposo visceral e peso do animal, (dados mostrados na figura 22), mostrando efeito da dieta, com o aumento de mais de duas vezes nos animais HFD tratados por 10, 14, 18 e 22 semanas em relação aos NC de mesmo tempo.

TECIDO ADIPOSEO

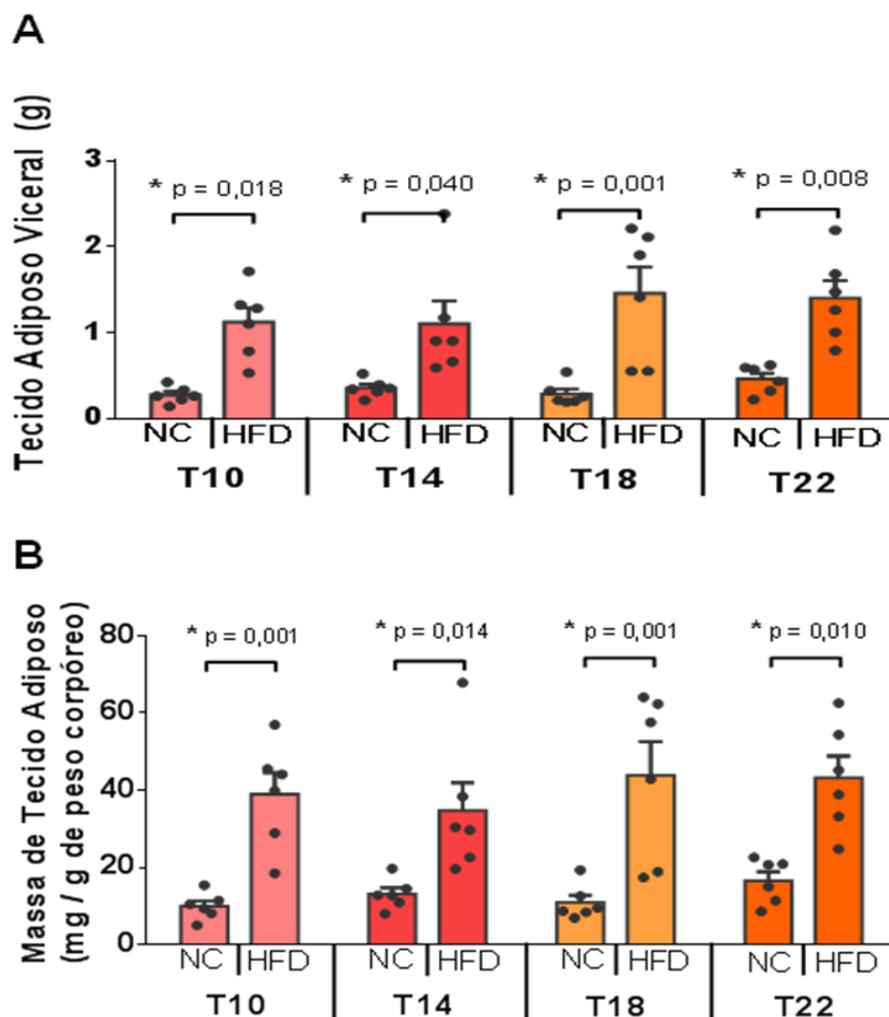


Figura 22: Dados de massa do tecido adiposo visceral de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do tecido extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

O parâmetro de congestão hepática (relação da massa do fígado por peso corpóreo), mostrado na figura 23, mostrou influência da dieta no grupo T10, com o aumento nos animais HFD confrontados com NC de mesmo tempo e influência do tempo, com aumento deste parâmetro nos animais NC do T14 e T18, quando comparados aos de mesma dieta do T10.

FÍGADO

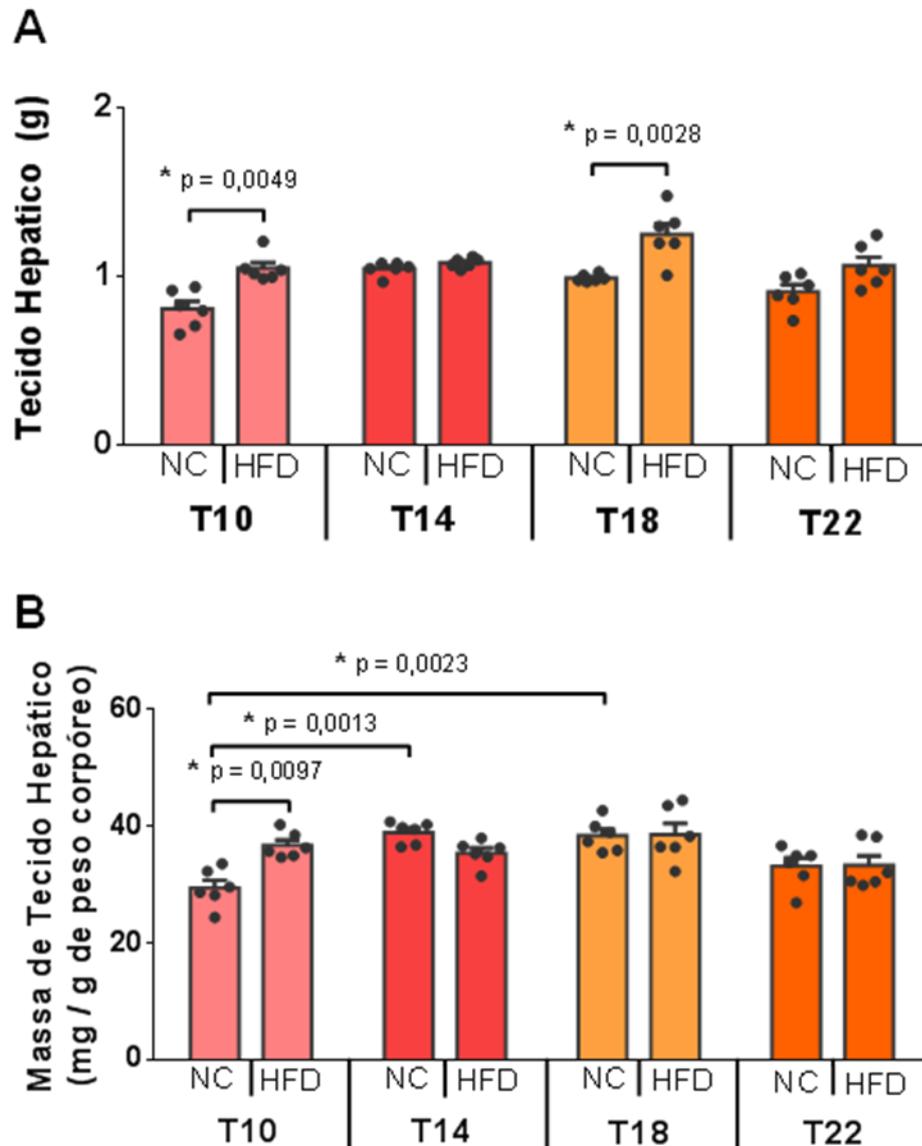


Figura 23: Dados de massa do tecido hepático de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

Os valores da relação de tecido muscular com peso total do animal, utilizando-se a massa do músculo gastrocnêmio, não mostraram alteração em relação à dieta ou tempo (dados mostrados na figura 24).

GASTROCNÊMIO

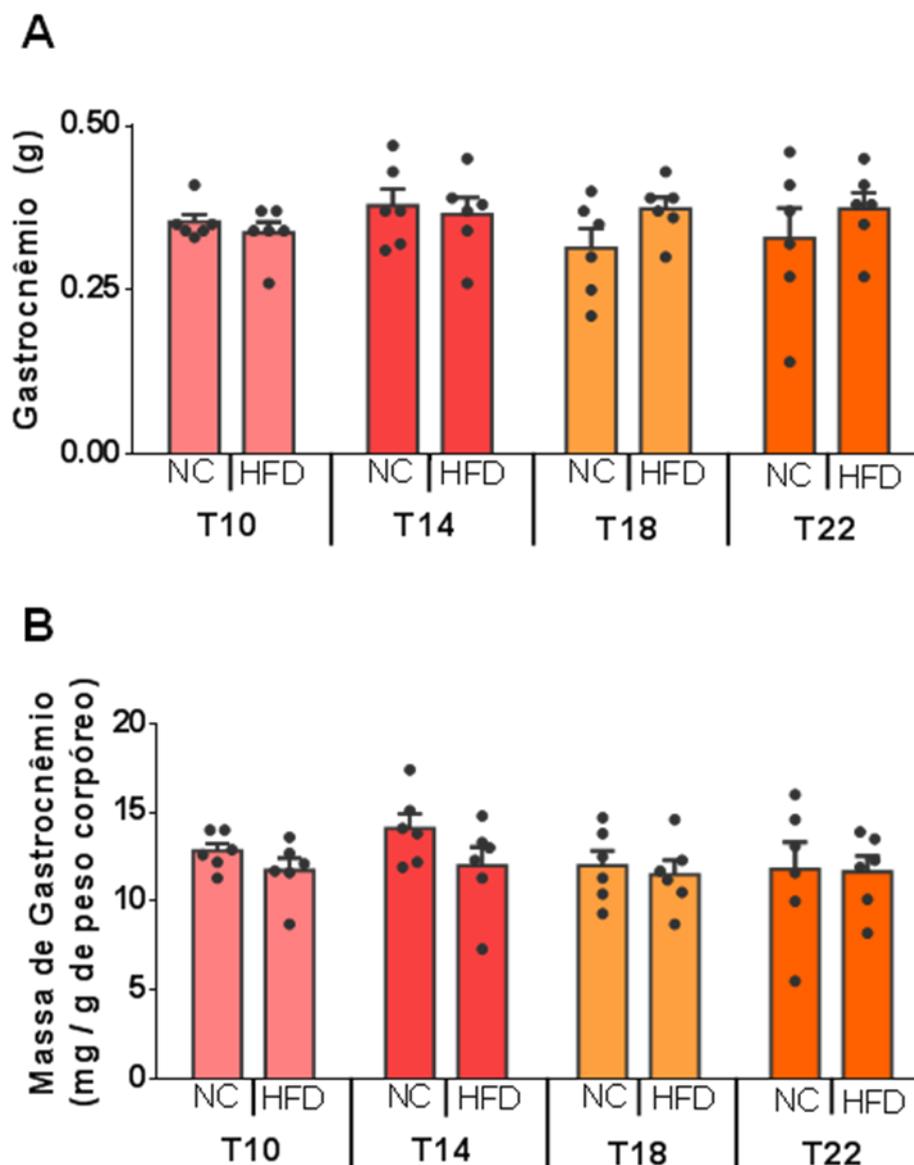


Figura 24: Dados de massa do músculo gastrocnêmio de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

A medida da relação entre a massa do tecido cardíaco extraído e o peso total do animal (figura 25 -B) evidenciou uma redução nos animais HFD dos tempos T10 e T18, com efeito da dieta, quando os valores foram normalizados pelo peso dos animais. Interessantemente, em relação ao acompanhamento temporal, os animais tratados por 14 semanas HFD tiveram esta medida aumentada em relação aos

demais grupos (T10, T18 e T22) submetidos a mesma dieta ($p = 0,0321$). Estes efeitos não foram visualizados quando comparados os valores brutos (figura 25- A), mas sim um aumento da massa do tecido cardíaco dos animais em dieta hiperlipídica em relação aos de dieta padrão de mesmo tempo.

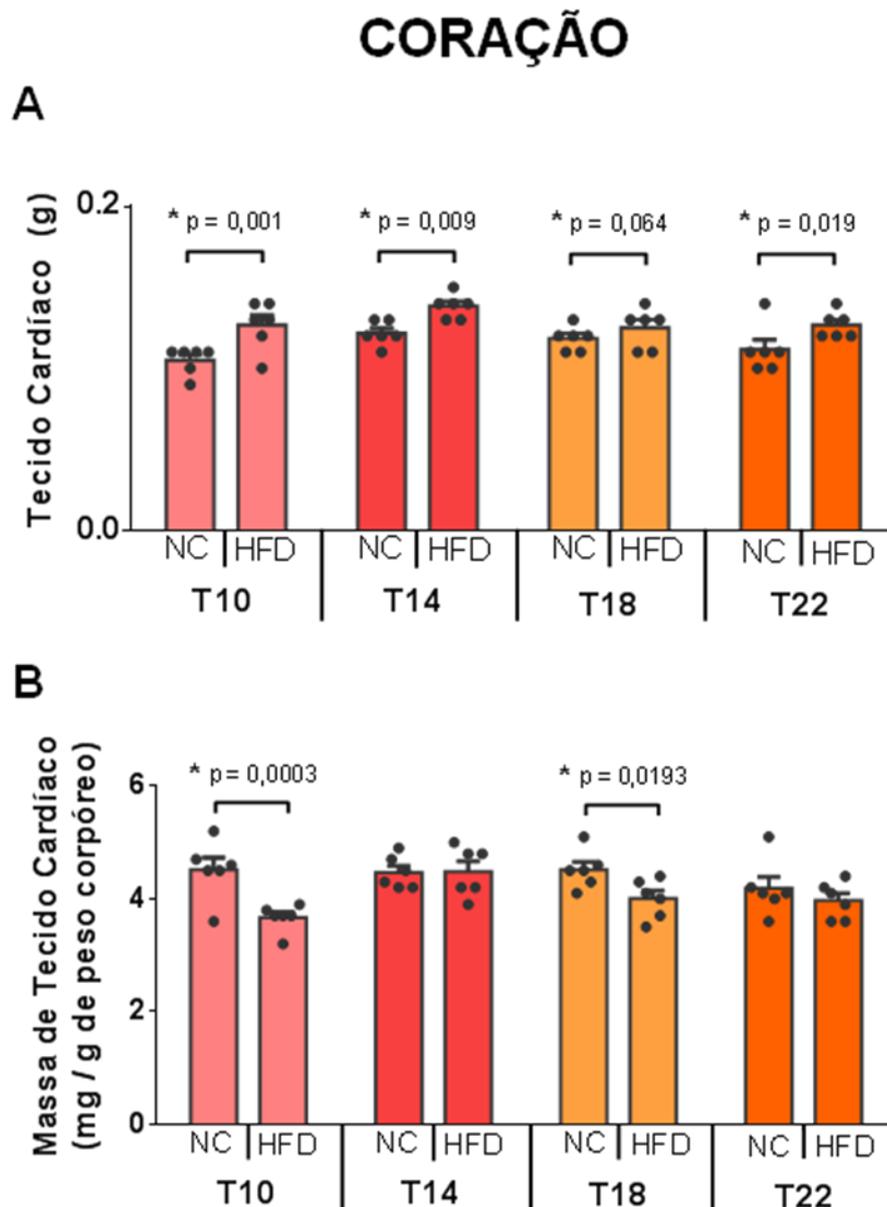


Figura 25: Dados de massa do tecido cardíaco de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças entre as dietas mostradas no gráfico.

2.3.6 *Análise anatomopatológica*

A análise anatomopatológica do tecido hepático não demonstrou aumento de deposição de gordura (esteatose) nem lesão tecidual em nenhum dos grupos analisados (figura 26).

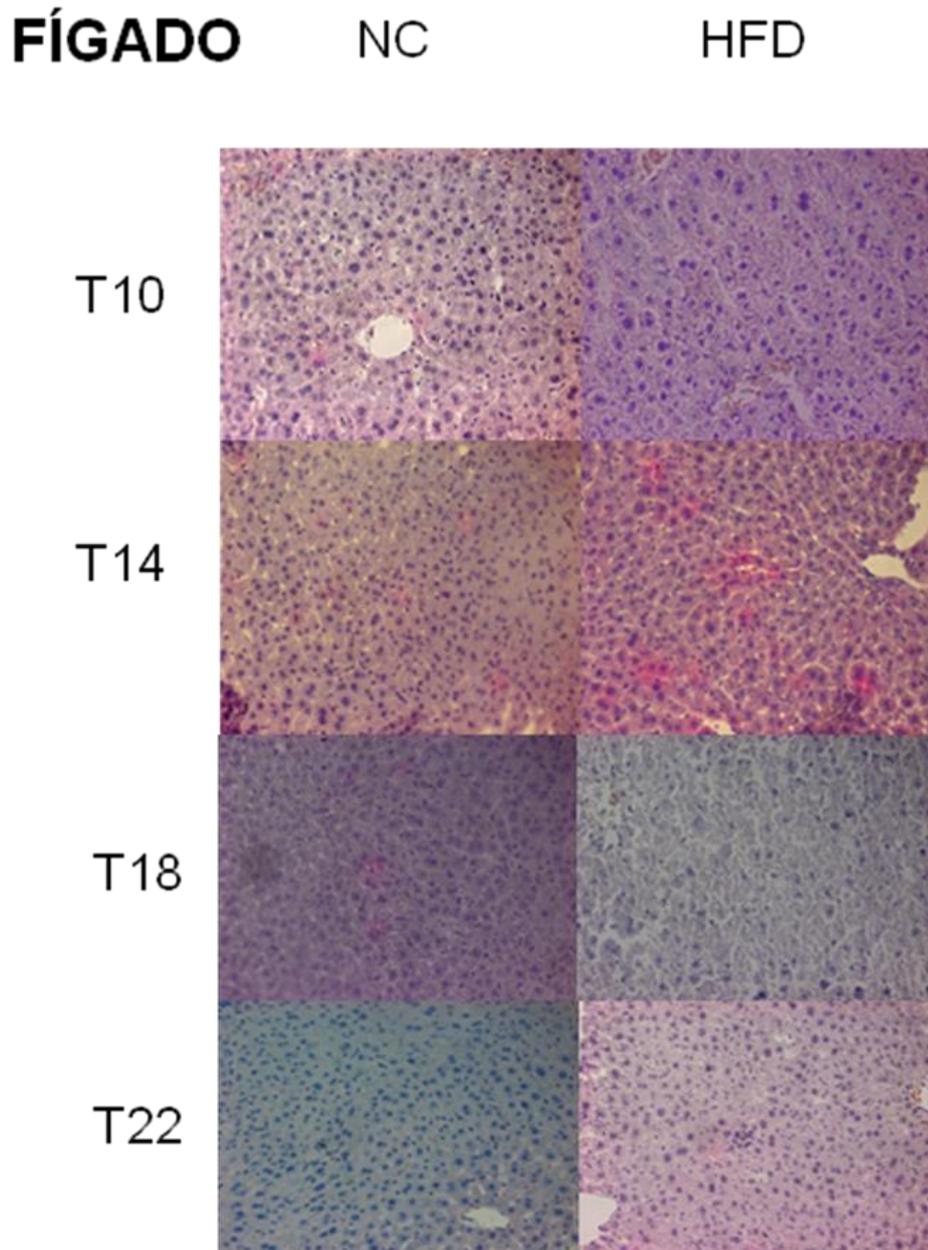


Figura 26: Cortes histológicos de tecido hepático corado com HE de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Aumento de 400 X.

2.3.7 Detecção de senescência proliferativa em Tecido Adiposo

Conforme mostrado na figura 27, a quantificação macroscópica da coloração obtida pela técnica de determinação de senescência proliferativa pela atividade da enzima Beta-Galactosidase mostrou diferença entre as dietas apenas no grupo tratado por 10 semanas, com os animais HFD apresentando maior senescência no tecido adiposo que os animais controle (NC).

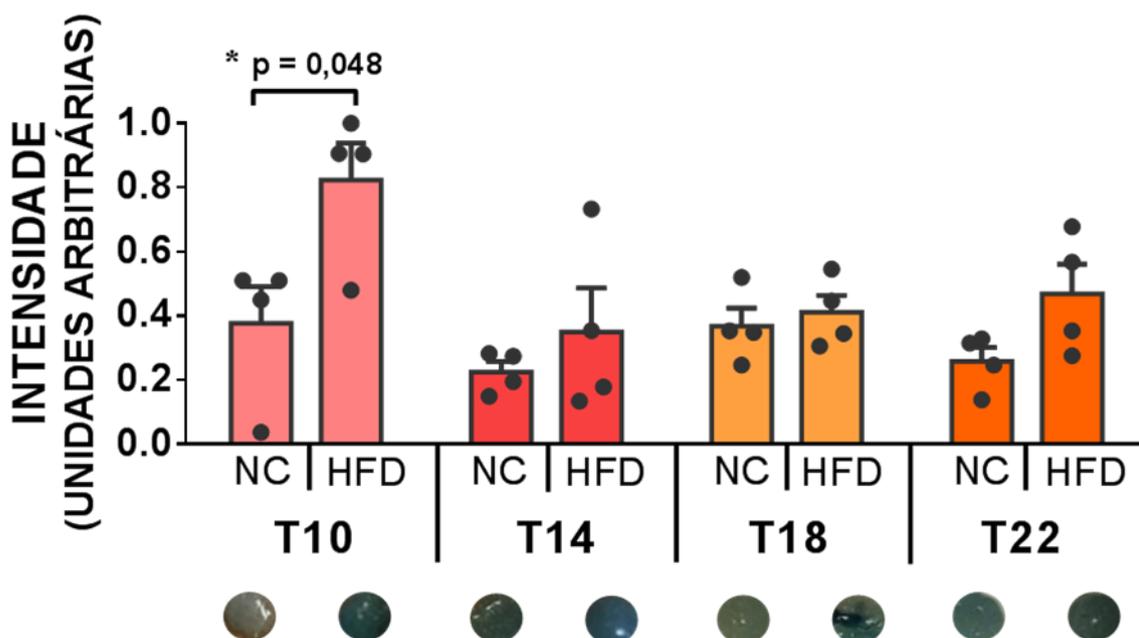


Figura 27: Detecção macroscópica da atividade da enzima Beta-Galactosidase em tecido adiposo visceral. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre dietas. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.8 Imunoconteúdo Proteico

O acompanhamento temporal do conteúdo de HSP70 no fígado mostrou diferença entre as dietas apenas nos animais tratados por até 10 semanas, (aumento com dieta hiperlipídica; figura 28-A). O de HSF1 dos animais HFD tratados por 22 semanas apresentou-se reduzido em comparação com os animais tratados por 10 semanas sob a mesma dieta (figura 28-B). Já o de SIRT-1 neste tecido mostrou-se reduzido nos animais T22, tanto de dieta padrão, quanto hiperlipídica, quando comparados aos animais de mesma dieta tratados por 10, 14 ou 18 semanas (figura 28-C).

FIGADO

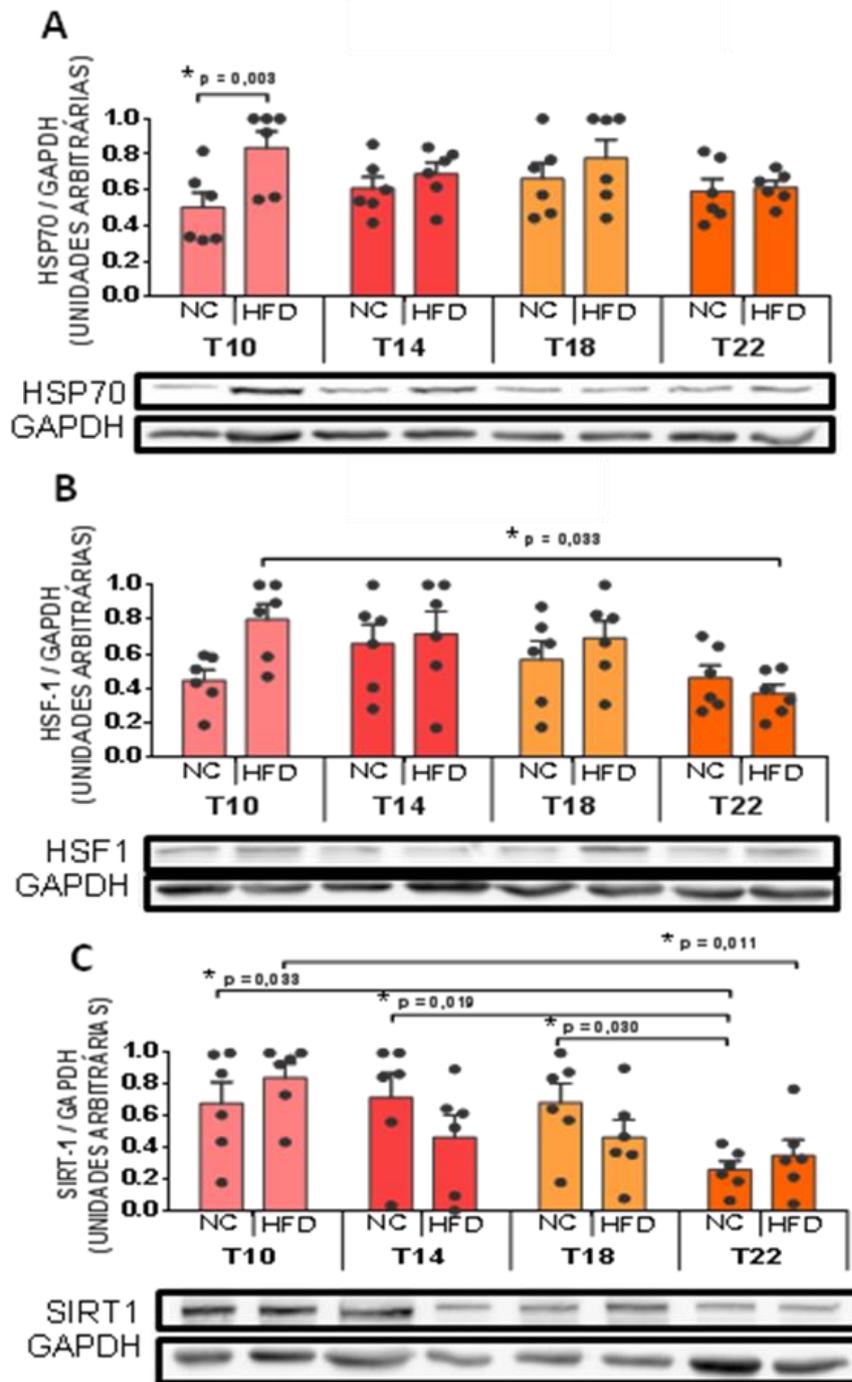
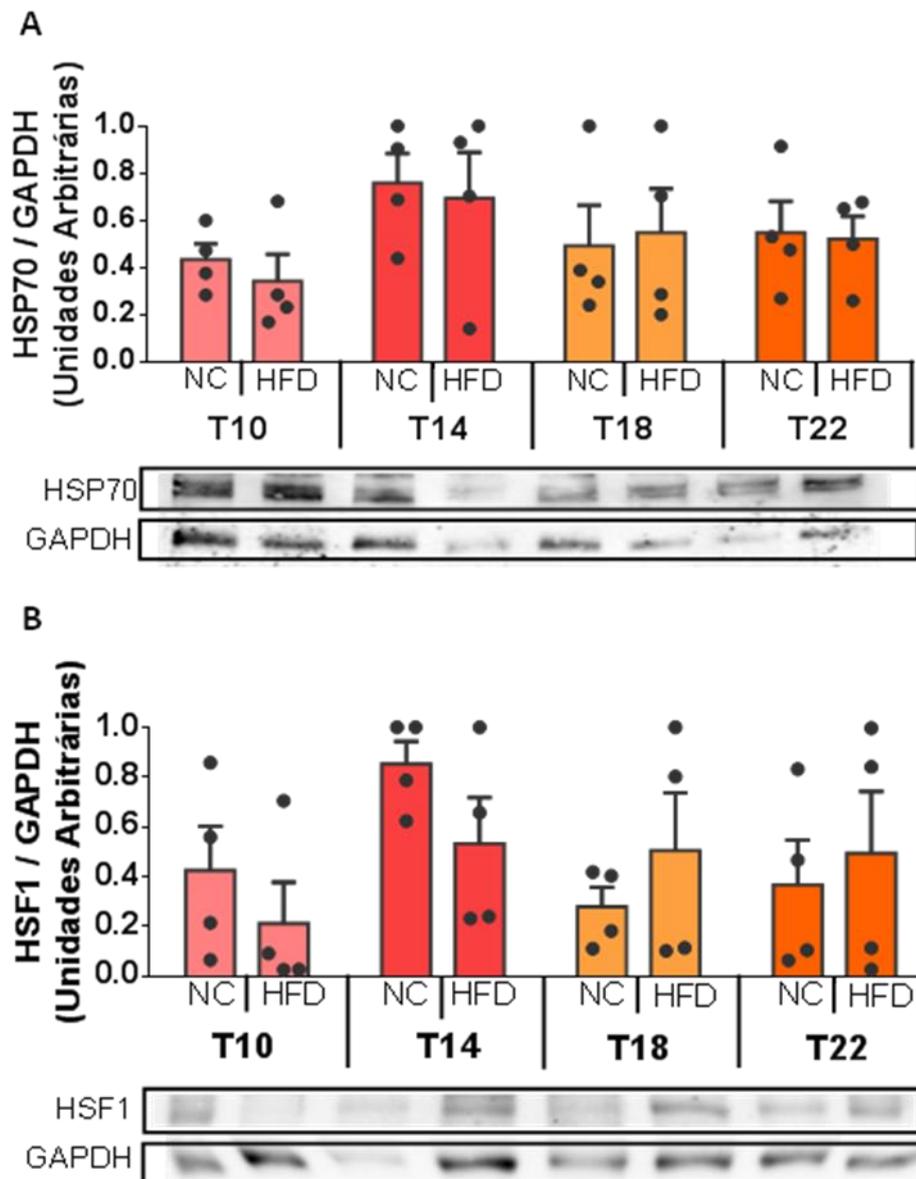


Figura 28: Imunoconteúdo proteico do fígado de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). A – HSP70 normalizada pelo GAPDH; B – HSF1 normalizado pelo GAPDH; C – SIRT1 normalizado pelo GAPDH. Em detalhe imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média ± EPM. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

O tecido adiposo visceral não apresentou diferença na expressão de HSP70 e HSF1 em nenhum dos grupos (figura 29 A e B). A SIRT-1 dos animais HFD tratados por 14 semanas estava reduzida em relação ao seu grupo controle de dieta padrão e mesmo tempo. Também, os animais de dieta padrão (NC) tratados por 22 semanas também apresentaram esta proteína reduzida em relação aos animais NC tratados por 14 semanas (figura 29-C), enquanto a imunodeteção do inflamassomo NLRP3 foi maior no grupo NC T14, quando comparado com o grupo T10 de mesma dieta (figura 29-D).

TECIDO ADIPOSEO VISCERAL



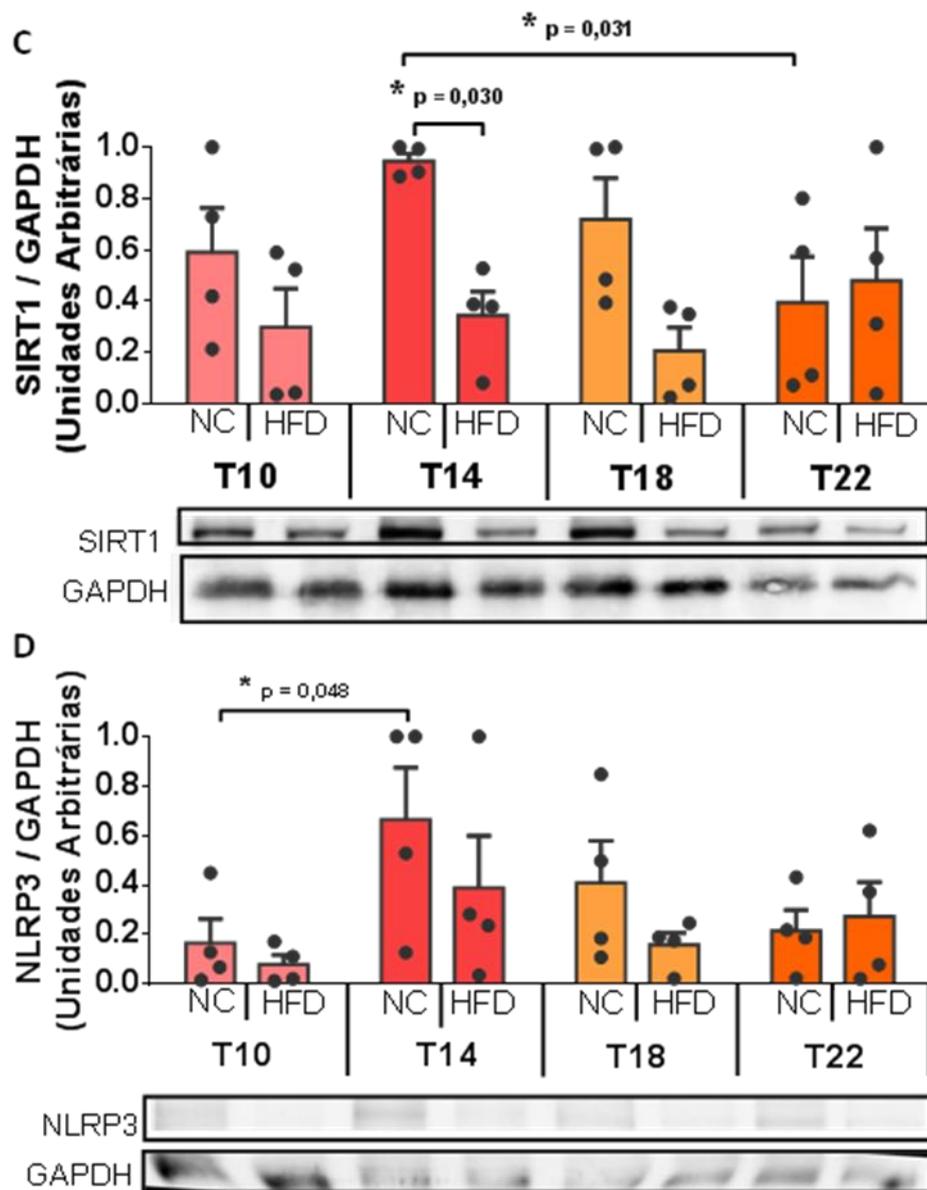
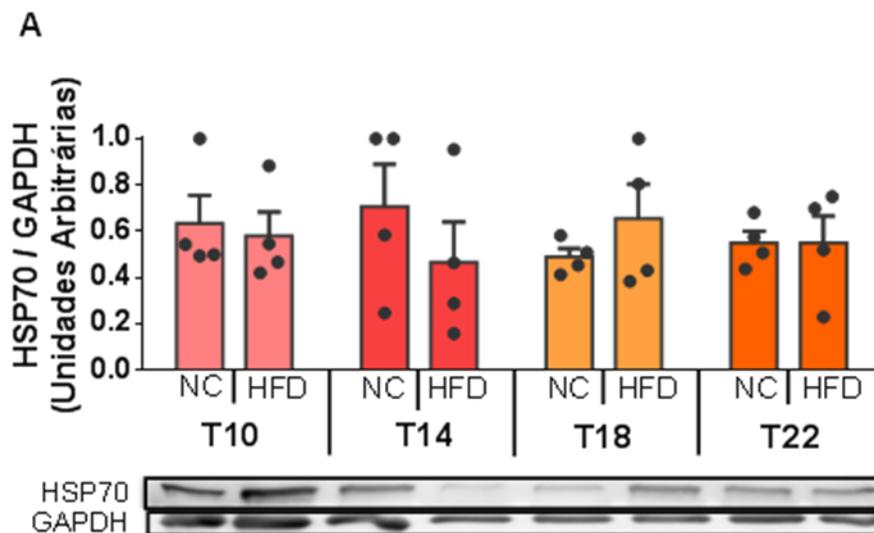


Figura 29: Imunoconteúdo proteico do tecido adiposo de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). A – HSP70; B – HSF1; C – SIRT1; D – NLRP3. Normalização realizada pelo GAPDH. Em detalhe imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

O imunoconteúdo de HSP70 nos músculos gastrocnêmio e sóleo são mostrados na figura 30 (A e B, respectivamente) e foram iguais em todos os grupos, independente da dieta, ou tempo de tratamento.

GASTROCNÊMIO



SÓLEO

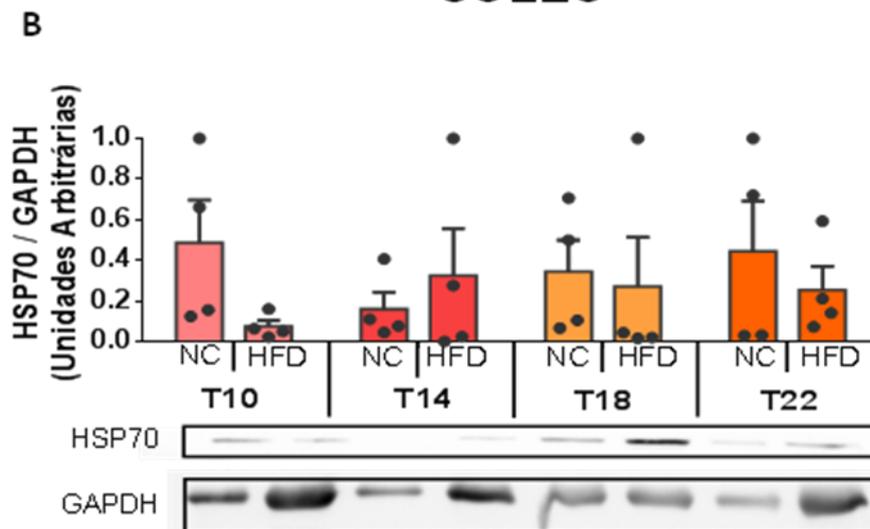


Figura 30 - Imunoconteúdo proteico de HSP70 no músculo de camundongos tratados por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD). A Gastrocnêmio; B – Sóleo. Normalização realizada pelo GAPDH. Em detalhe imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2 vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.3.9 *Desafio Térmico*

Para a avaliação da capacidade de resposta da via de choque térmico, desenvolvemos a técnica do desafio térmico em células de sangue total chocado a 42 °C por 1 ou 2 h em que a expressão de HSP70 depois de 6 h de recuperação das

células é comparada com aquela observada nas células controles mantidas a 37 C. Os resultados a seguir referem-se aos experimentos de incubações por 1 h que não mostraram diferença em nenhum dos grupos. (figura 31). Continuam em andamento os testes com células incubadas por 2 h (dados não mostrados).

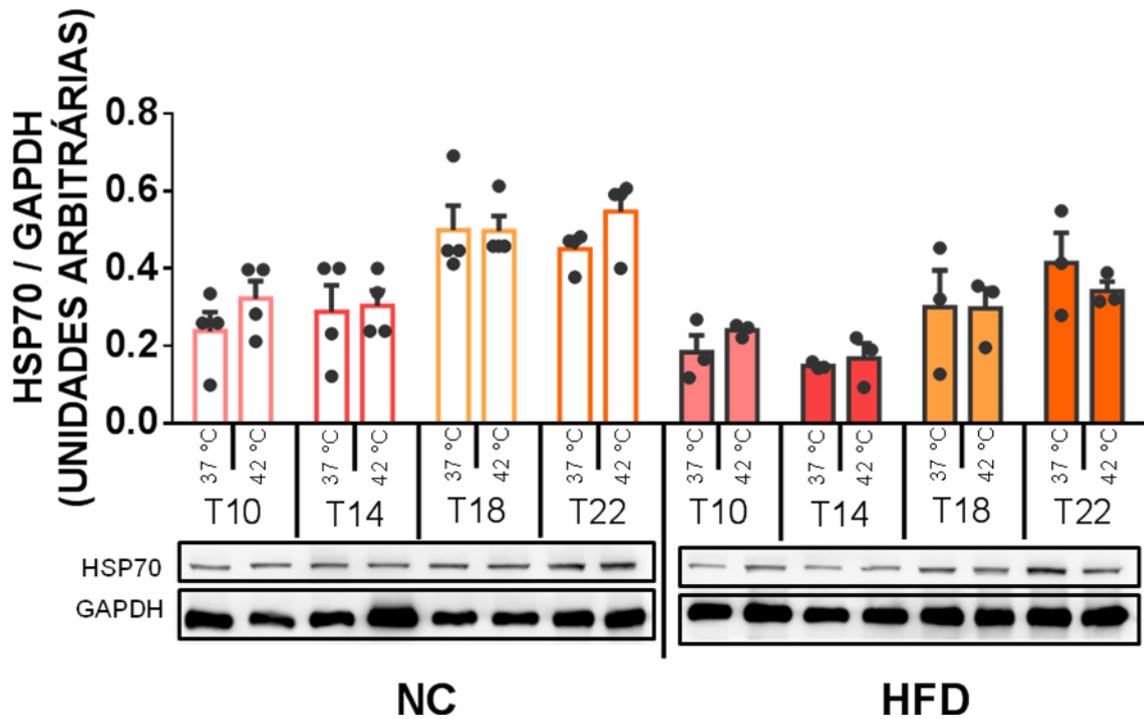


Figura 31: Avaliação da resposta da via de choque térmico em camundongos C57BL/6J. Sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C por 1 h e imunodeteção após mais 7 h para HSP70, normalizada pelo conteúdo de GAPDH. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

2.4 Discussão

Na parte I deste trabalho realizou-se acompanhamento temporal dos animais mantidos em dieta padrão e hiperlipídica, nos tempos de 10, 14, 18 e 22 semanas de tratamento e, conforme o modelo seguido pelos autores Winzell e Ahrén (WINZELL; AHRÉN, 2004), os animais HFD obtiveram ganho de peso superior aos animais NC a partir da sexta semana, tendo um aumento inicialmente exponencial que foi seguido por uma redução no aumento de peso aproximadamente pela décima semana de tratamento. Por outro lado, diferentemente do visto por esses autores, os animais avaliados no presente estudo não mostraram diferença nem na ingestão calórica (que se esperava estivesse aumentada), nem da eficiência metabólica (a qual deveria estar reduzida, já que os animais em HFD tendem a transformar mais eficientemente energia em gordura visceral).

Pode-se dizer que a dieta hiperlipídica utilizada foi efetiva em produzir obesidade nos camundongos, não apenas por seu ganho de peso, mas também pelo grande aumento do tecido adiposo visceral dos animais HFD em relação aos NC de mesmo tempo de tratamento. Todos os tempos estudados mostraram esta expansão do tecido adiposo visceral total, que se mostrou ainda mais significativa, quando normalizada pelo peso do próprio animal. Embora, o índice de Lee destes animais não tenha refletido este aumento, o que seria esperado, por se correlacionar diretamente com o conteúdo de tecido adiposo dos animais (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Demonstrando mais uma vez a efetividade da dieta empregada, o peso final dos animais HFD foi maior que os NC, exceto nos tempo de 10 semanas de dieta, que inclusive mostrou média significativamente menor que os animais tratados com a mesma dieta por 18 e 22 semanas, demonstrando um efeito temporal somado ao da dieta.

Nenhum dos grupos apresentou alteração nas análises anatomopatológicas do fígado, (*e.g.*, esteatose) que já foi mostrado ocorrer em animais submetidos a dietas hiperlipídicas (RINGLING; GASTECKI; WOODFORD; LUM-NAIHE *et al.*, 2016). Entretanto, o tecido hepático dos animais HFD tratados por até 10 semanas mostrou um aumento característico de hipertrofia hepática, causada pela congestão sanguínea, em relação ao seu controle. Contudo, apenas nesse grupo temporal foi

observada tal resposta. Este dado chama a atenção pois, ou está ocorrendo algum mecanismo compensatório nos animais mais velhos, que reverteu este quadro, ou a diferença não existe, pois os animais NC de mesmo tempo também estão comprometidos. Parece mais provável a segunda opção, como discutiremos mais adiante. Com relação ao tecido cardíaco destes animais, corroborando com este quadro de congestão sanguínea, houve uma hipertrofia cardíaca visualizada quando consideramos apenas o peso do coração extraído, apesar de que deva ser mais importante considerado apenas a massa ventricular (KOREN; DEVEREUX; CASALE; SAVAGE *et al.*, 1991; MUIESAN; SALVETTI; RIZZONI; CASTELLANO *et al.*, 1995) (que não foi medida separadamente no presente trabalho).

Para as análises bioquímicas, obteve-se aumento da glicemia de jejum medida nos animais HFD tratados nos dois menores tempos (10 e 14 semanas), quando comparados com os animais NC de mesmo tempo. Assim, como o conteúdo plasmático da insulina de jejum em que os animais NC tratados por 10 semanas apenas tinham valores de insulina próximos do fisiológico e menores que os animais tratados com a mesma dieta por mais tempo. Este dado nos sugere que talvez nossos controles (NC) não sejam “tão controles” assim e que possa haver uma contribuição importante da associação do sedentarismo com a dieta *ad libitum* em tornar os animais NC, mesmo sem dieta hiperlipídica, tão doentes quanto os animais HFD. Sabe-se que a hiperinsulinemia precede o desenvolvimento da obesidade (GENUTH; PRZYBYLSKI; ROSENBERG, 1971; MEHRAN; TEMPLEMAN; BRIGIDI; LIM *et al.*, 2012). De fato, tem-se discutido o aumento da própria insulina como causadora da resistência à insulina (CORKEY, 2012). Da mesma maneira, os resultados do índice HOMA IR com os animais NC apresentando valores mais baixos que os animais HFD de mesma idade e que os animais NC tratados por 22 semanas, demonstraram uma piora no quadro dos animais NC ao longo do acompanhamento, reforçando a hipótese acima aventada. Estes valores de insulina plasmática, HOMA IR altos dos animais NC a partir da 14ª semana correspondem a valores de animais com IR, o que é suportado pelos dados dos testes de tolerância a insulina e glicose, para os quais apenas os animais mantidos em dieta por no máximo 10 semanas mostraram diferença entre as dietas na curva do GTT e ITT e a área incremental sob a curva invertida (do ITT), que foi maior ($p = 0,058$).

As análises de *immunoblotting* no tecido adiposo visceral não mostraram diferença relacionada à dieta nos tempos medidos em relação ao conteúdo de HSP70, HSF1 e NLRP3. O estudo de Betanzos-Cabrera e colaboradores (BETANZOS-CABRERA; ESTRADA-LUNA; BELEFANT-MILLER; CANCINO-DIAZ, 2012) empregando camundongos CD-1 com dieta hiperlipídica (50 % de lipídios insaturados) por quatro semanas também não encontrou diferença no conteúdo de NLRP3 no tecido adiposo e nem no fígado destes animais em relação aos seus controles. Assim como outro trabalho utilizando camundongos espontaneamente obesos (ob/ob) em que não se observou diferença no conteúdo do inflamassomo no tecido adiposo visceral, o qual somente aumentou nos animais obesos em células vasculares do estroma (NAGAREDDY; KRAAKMAN; MASTERS; STIRZAKER *et al.*, 2014). Na verdade, o aumento do mRNA mensageiro do NLRP3 está associado a um maior conteúdo da interleucina 1 beta clivada em animais tratados com dieta 45 % de lipídios saturados durante 24 semanas (FINUCANE; LYONS; MURPHY; REYNOLDS *et al.*, 2015). De maneira inconclusiva, no entanto, o único aumento encontrado no presente estudo foi com os animais NC tratados por 14 semanas em relação aos animais de mesma dieta tratados por 10 semanas. E, apesar de o aumento da ativação do NLRP3 estar associado ao desenvolvimento da SASP nos adipócitos, os resultados com relação à senescência proliferativa no tecido adiposo visceral, não corresponderam ao aumento do inflamassomo encontrado no grupo NC T14. Observou-se, no entanto, a detecção de maior intensidade da atividade da enzima beta-galactosidase nos animais HFD quando comparados aos seus controles (NC) tratados por até 10 semanas, o que novamente reforça a ideia de que, a partir de 10 semanas em regime de sedentarismo e dieta (controle) ad libitum os controles podem estar deixando de ser controles e ficando, na verdade, doentes. Em outras palavras, nós acreditamos que, a partir da 10^a semana, tanto os controles NC quanto os animais dos grupos HFD passem a apresentar senescência proliferativa idêntica, ou seja, ambos os grupos podem estar apresentando resistência à insulina e início da doença crônica de baixo grau que leva ao DMT2.

A SIRT1 encontra-se diminuída no tecido adiposo visceral nos grupos T22 NC e T14 HFD em relação ao grupo T14 NC. Seria de se esperar uma redução desta proteína com a piora da sensibilidade a insulina, pois já foi demonstrado que a

SIRT1 é regulada negativamente em células com alta IR e que o aumento da sua expressão, aumenta a sensibilidade à insulina, sugerindo que esta proteína está associada ao aumento da sensibilidade a este hormônio (SUN; ZHANG; GE; YAN *et al.*, 2007). Infelizmente, esta ligação não ficou tão evidente no presente trabalho para o tecido adiposo, pelo menos nos grupos temporais acima de 10 semanas. Já o tecido hepático mostrou diminuição do conteúdo de SIRT1 nos animais T22 NC e HFD quando comparados aos menores tempos de mesma dieta, sugerindo a piora dos animais tratados por mais tempo, **independentemente da dieta**, após várias semanas de hiperinsulinemia. No tecido hepático também foi possível visualizar a diminuição do conteúdo de HSF1 nos animais HFD tratados por 22 semanas em relação aos animais de mesma dieta tratados por 10 semanas. O resultado anterior acompanha o aumento de HSP70 no mesmo tecido no grupo HFD apenas com 10 semanas de dieta, possivelmente pelo caráter fásico do desenvolvimento da IR, na qual tem sido demonstrado um aumento inicial de HSP70 (e sua via de ativação) compensatório frente à inflamação crônica e posterior agravamento do quadro pela inibição da via de choque térmico (ARCHER; VON SCHULZE; GEIGER, 2017).

O gastrocnêmio não mostrou alteração na sua massa causada pela dieta ou pelo tempo de tratamento quando comparados os animais analisados. O conteúdo de HSP70 muscular, medido no gastrocnêmio e sóleo dos animais tratados não se mostrou diferente. Este resultado está de acordo com a literatura, no sentido de que a grande maioria dos estudos com roedores tratados com dieta hiperlipídica, modelos de obesidade e IR, por 6, 10, 12 e até 28 semanas não mostraram alteração nos níveis de HSP70 musculares (BOCK; KRAUSE; SCHROEDER; HAHN *et al.*, 2016; GUPTE; BOMHOFF; SWERDLOW; GEIGER, 2009; HENSTRIDGE; BRUCE; DREW; TORY *et al.*, 2014). Esses achados diferem dos resultados obtidos em humanos e outros primatas, em que se verifica que a expressão do mRNA que codifica para a forma induzível da HSP70 (gene HSPA1A) apresenta-se drasticamente reduzida na IR e DMT2 (90 % de decréscimo) em biópsias de músculo esquelético de pacientes diabéticos tipo 2, em comparação com voluntários saudáveis (KURUCZ; MORVA; VAAG; ERIKSSON *et al.*, 2002), bem como o próprio conteúdo da proteína HSP70 que mostra uma redução acentuada na expressão intracelular em pacientes com DMT2 obesos e não obesos (CHUNG; NGUYEN;

HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008; KAVANAGH; WYLIE; CHAVANNE; JORGENSEN *et al.*, 2012). É possível ainda que não tenhamos encontrado o espaço temporal adequado para se observar esses fenômenos em roedores, por serem animais mais resistentes ao desenvolvimento de patologias. Porém acreditamos que é mais provável que os controles utilizados em nossos modelos não nos permitem realizar as comparações corretas e visualizarmos estes resultados. Por essas razões, estamos repetindo todo o procedimento experimental aqui apresentado incluindo-se, desta feita, os grupos adicionais T0 (imediatamente após o desmame), T1 (com 1 semana em dieta NC ou HFD), T4 (com 4 semanas de observação) e T8 (8 semanas de observação) nas medidas bioquímicas, anatomopatológicas e imunológicas.

Por fim, as análises de capacidade da HSR não mostraram a resposta conjecturada para o desafio térmico de 1 h a 42 °C. Aparentemente, o protocolo de realização não foi efetivo, possivelmente por tempo ineficiente, como mostra a proposta de protocolo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa, utilizando uma técnica semelhante para mononucleares humanos e utilizando 2 h a 42 °C ao invés de apenas 1 h (DE LEMOS MULLER; DE MATOS; GRIGOLO; SCHROEDER *et al.*, 2019). Essa abordagem está igualmente sendo repetida para os novos grupos experimentais acima mencionados.

PARTE II

3 PARTE II – TRATAMENTO HIPERTÉRMICO DA OBESIDADE

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivos Gerais

Comparar o efeito do tratamento térmico de corpo inteiro sobre os parâmetros de resistência à insulina em camundongos tratados com dieta hiperlipídica ou não.

3.1.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito do tratamento térmico nos parâmetros de composição corporal;

Verificar em diferentes tecidos a expressão das proteínas da via de choque térmico (HSP70, HSF1 e SIRT1) nos diferentes tempos;

Verificar a capacidade da HSR pelo desafio térmico no sangue total;

Determinar da atividade do inflamassomo NLRP3, por meio da ativação da caspase- 1 no tecido adiposo.

3.2 Métodos

3.2.1 Desenho Experimental

Da mesma forma que na parte I, e como mostrado na figura 32, os camundongos foram submetidos a dieta controle (NC) ou hiperlipídica (HFD) logo após o desmame e mantidos por, dezoito (T18) ou vinte e duas (T22) semanas de tratamento. Mimetizando indivíduos humanos que consomem a mesma dieta desde o desmame até cinquenta e seis (T18) e sessenta e sete (T22) anos de vida. Os testes realizados para acompanhamento e análise dos tecidos foram realizados da forma descrita na parte I.

Após quatorze semanas em dieta (dezessete semanas de vida) os animais de cada grupo foram subdivididos em novos dois grupos: animais que foram submetidos a tratamento térmico, sessões semanais de choque térmico, (HS, do inglês *heat shock*) ou animais controles (SHAM). O tratamento térmico consistiu na elevação da temperatura do animal anestesiado por 15 minutos a 41,0 °C, uma vez a cada sete dias, perfazendo quatro e oito sessões HS nos grupos T18 e T22, respectivamente.

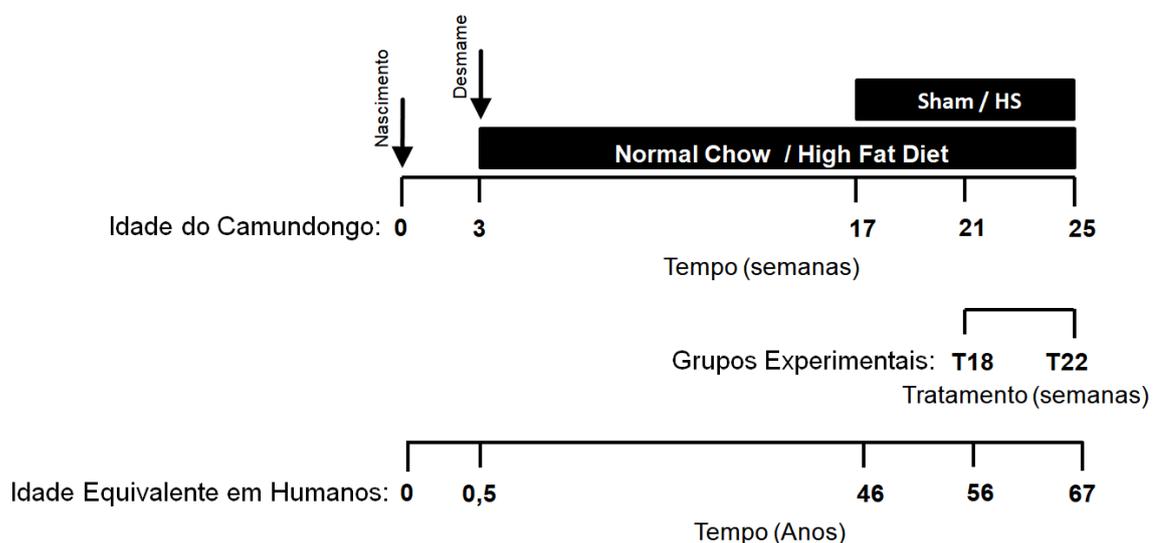


Figura 32: Desenho experimental parte II.

3.2.1 Protocolo de Choque Térmico

Para o procedimento de choque térmico (*hot tub*), os animais foram anestesiados com tiopental sódico 2% i.p. (5 mg para 100 g de camundongo; 2,5 µL/g de peso corpóreo, o que representa cerca de 60-80 µL por animal) com antecedência de dez minutos ao procedimento. A escolha do anestésico se baseia no fato do mesmo não causar alterações glicêmicas característicos da maior parte dos anestésicos em uso. A temperatura da sala para a realização do experimento foi monitorada e mantida a aproximadamente 25 °C.

O controle da temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal (dimensões do eletrodo, 8 x 2 mm, em comprimento e diâmetro respectivamente), durante todo o período em que os animais foram mantidos no banho térmico com água a 40 °C. Após alcançar a temperatura retal de 41°C, os animais permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura (41-41,7 °C), durante 15 min. Durante o choque térmico os animais ficaram com as patas traseiras e cauda imersas na água, uma vez que especialmente a cauda determina a regulação da temperatura perdendo calor na troca de temperatura com o ambiente. O procedimento utilizado é um modelo adaptado e padronizado em nosso laboratório (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019), similar a (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008).

Os camundongos do grupo SHAM, não submetidos ao choque térmico foram igualmente anestesiados (e tomados como controles experimentais), permanecendo à temperatura ambiente com sua temperatura corporal controlada, mantida entre 36,5-37,5°C, com auxílio de termômetro retal. Após o choque térmico e/ou anestesia, os animais foram reidratados com uma injeção subcutânea, na região dorsal, de tampão fisiológico 0,9% (2 mL para cada 100 g de animal) estéril e permaneceram no laboratório até recuperação da anestesia.

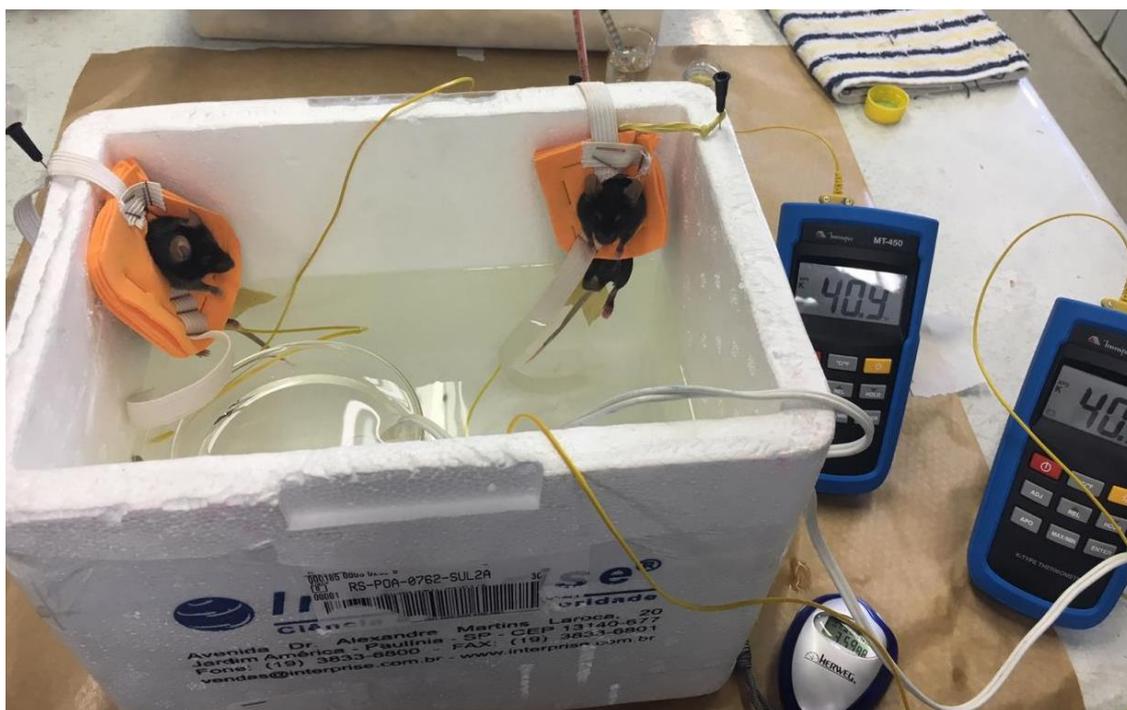


Figura 33: Modelo de choque térmico (HS).



Figura 34: Recuperação dos animais HS e espera dos animais SHAM. Evidenciado pela seta bolsa gel de calor.

3.3 Resultados

3.3.1 Parâmetros Metabólicos

3.3.1.1 Ganho de peso

Os dados de ganho de peso estão apresentados na figura 35. Estes dados mostraram diferença significativa entre os grupos com diferentes dietas, a partir da sexta semana, tendo os animais dos grupos HFD um aumento no ganho de peso em relação aos animais NC, a terapia térmica (iniciada na décima quarta semana) não foi capaz de influenciar neste parâmetro durante o tempo observado.

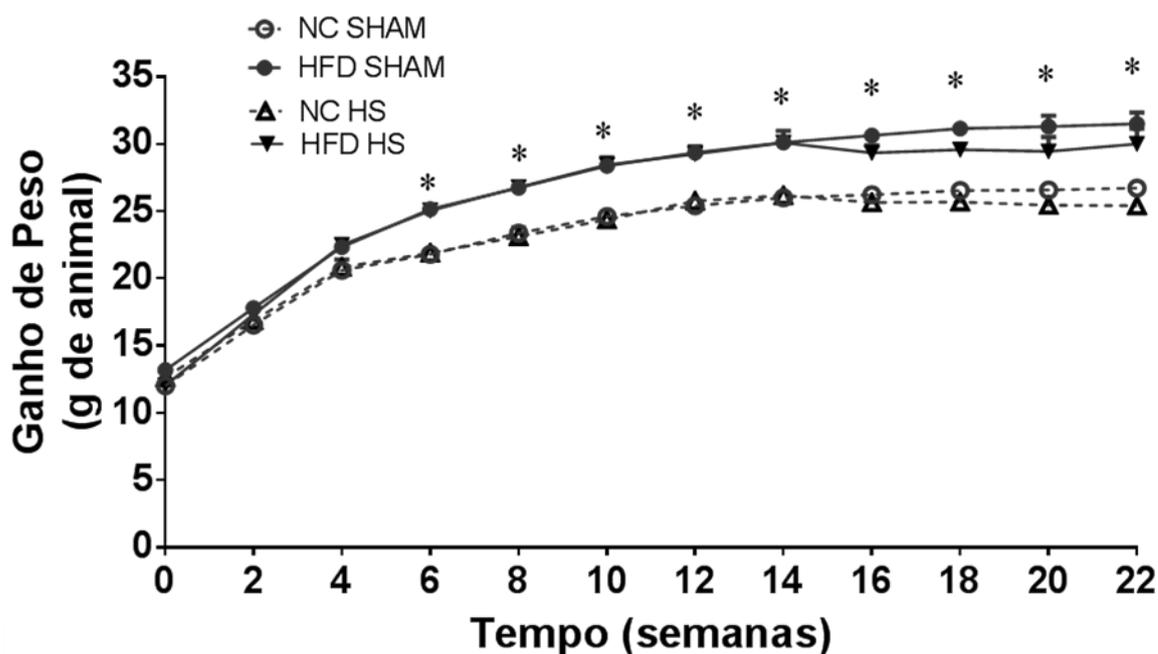


Figura 35: Ganho de peso dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) com tratamento térmico (HS) ou sem (SHAM) ao longo das semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias post hoc Tukey. * $p < 0,05$ da comparação entre as dietas do mesmo tratamento.

Porém, quando considerados em separado os dados dos grupos tratados por 18 e 22 semanas observa-se há aumento do peso final do grupo HFD em relação ao NC apenas nos animais T18 SHAM e T22 SHAM e HS. Os dados de peso inicial (A) e final (B) são mostrados na figura 36.

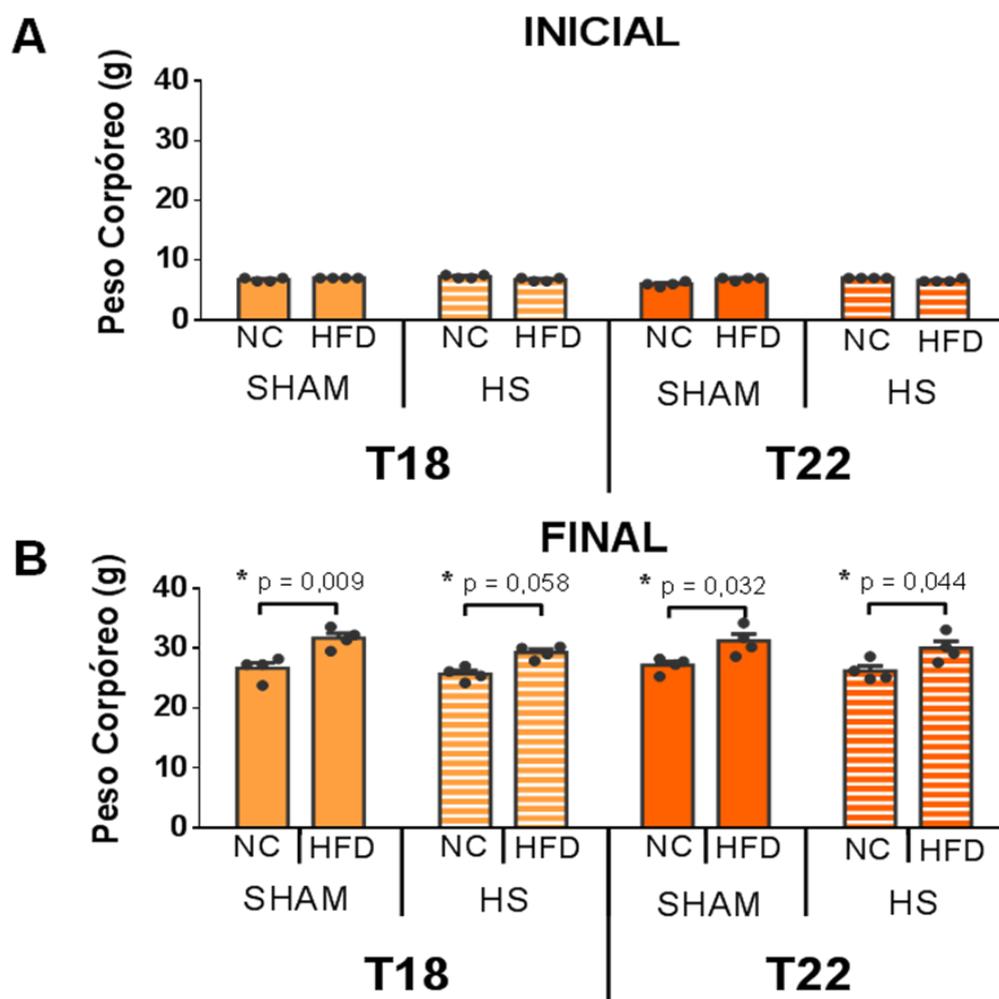


Figura 36: Peso corpóreo dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante: 10 (T10), 14 (T14), 18 (T18) e 22 (T22) semanas nos grupos tratados com choque térmico (HS) ou não (SHAM). A: valores iniciais obtidos no desmame; B: valores finais obtidos na véspera da eutanásia dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças indicadas no gráfico.

3.3.1.2 Consumo Alimentar

Os dados de consumo alimentar estão apresentados na figura 37. Ao longo das semanas, não houve diferença nos valores de consumo relacionado à dieta e a terapia térmica também não influenciou neste parâmetro.

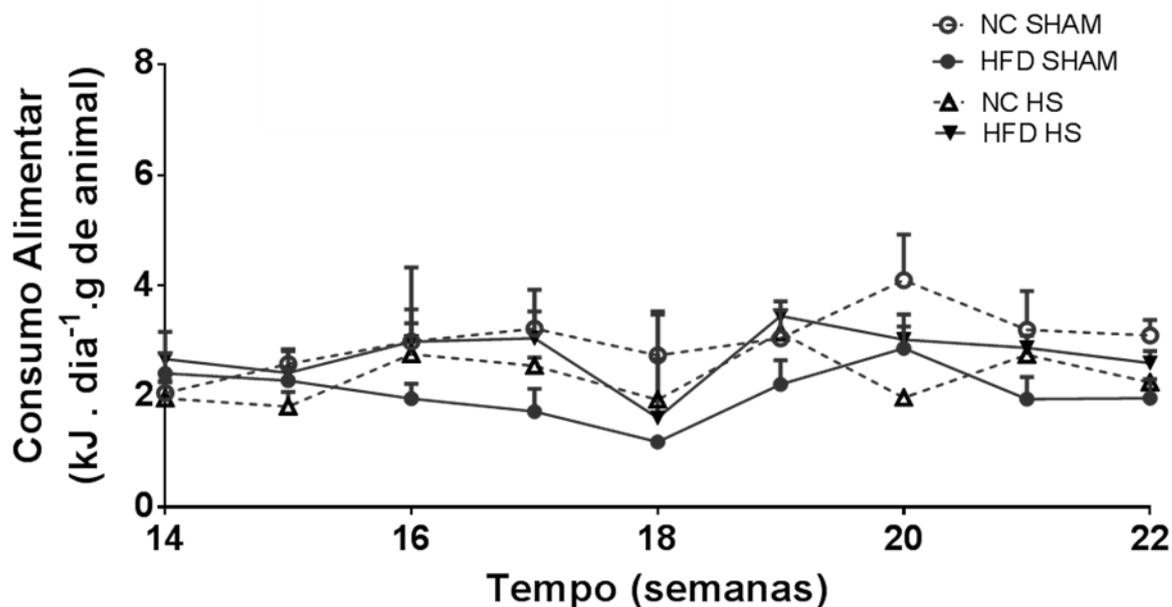


Figura 37: Consumo alimentar dos animais tratados com dieta padrão (NC) e hiperlipídica (HFD) divididos nos grupos com e sem tratamento térmico (HS e SHAM, respectivamente) ao longo das semanas de tratamento térmico em kJ por dia normalizado pelo peso de cada animal. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

3.3.1.3 Índice de Lee

O índice de Lee apresentado pelos grupos não mostrou diferença significativa no período anterior à intervenção (apresentado na figura 38-A), nem no final do acompanhamento de cada grupo (18 e 22 semanas), como mostrado na figura 38-B.

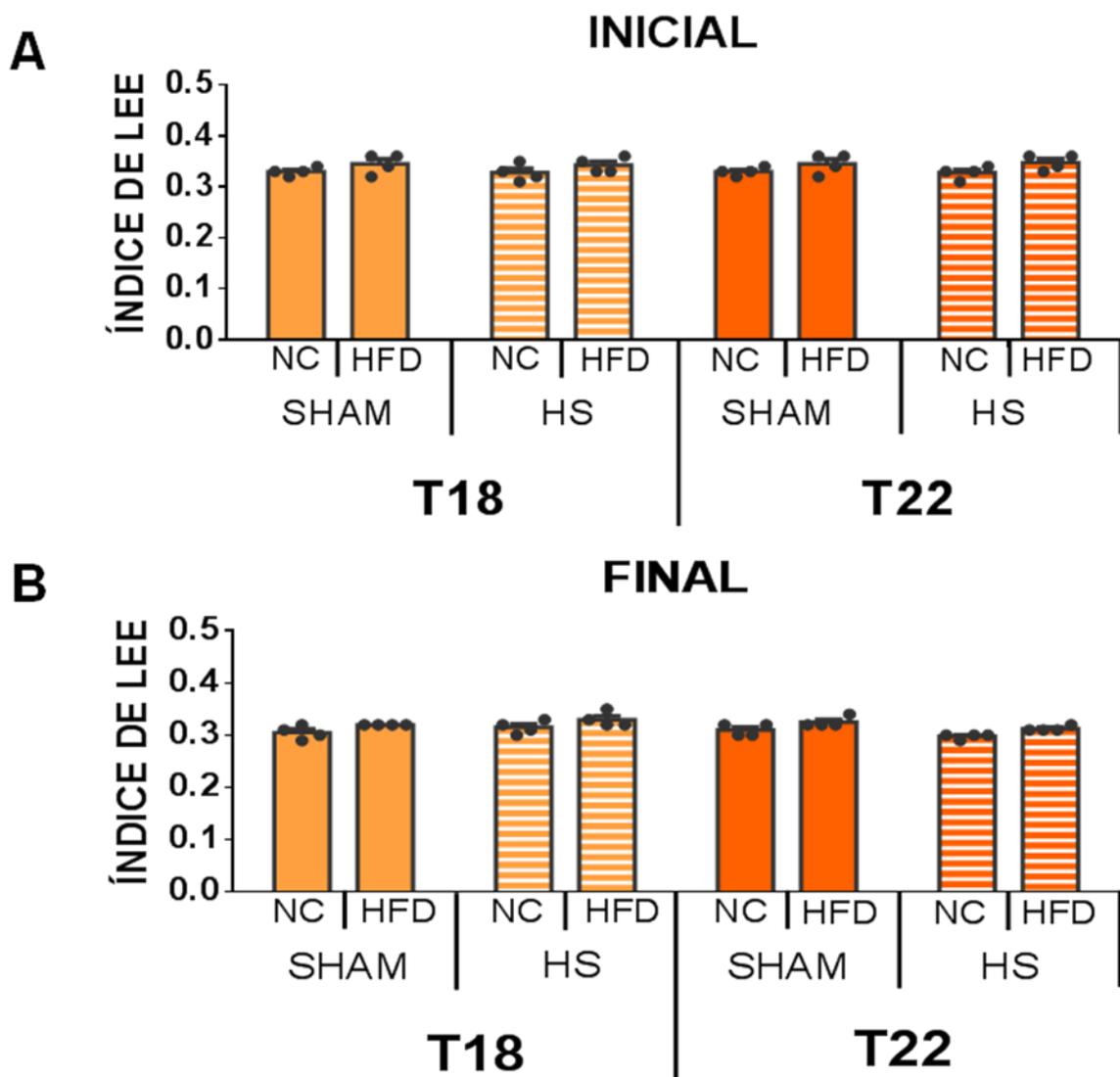


Figura 38: Índice de Lee dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas nos grupos tratados com choque térmico (HS) ou não (SHAM). A: valores iniciais obtidos no desmame; B: valores finais obtidos na véspera da eutanásia dos animais. Dados expressos em média \pm EPM.

3.3.2 Medidas Bioquímicas

3.3.2.1 Glicemia

Os valores glicêmicos de jejum (12 h) mostraram médias iguais em todos os grupos, como indicado na figura 39.

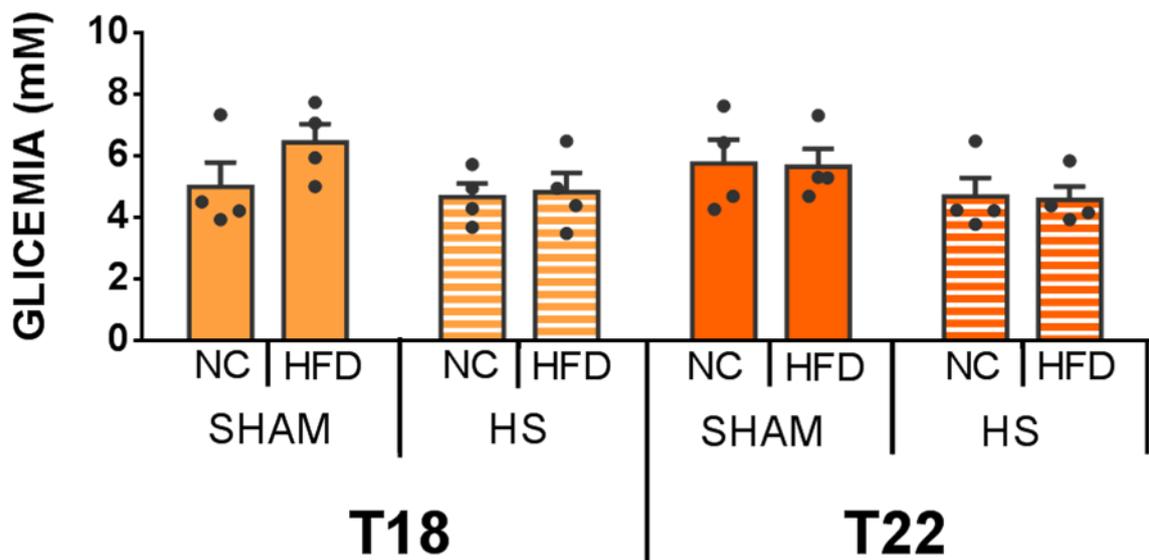


Figura 39: Glicemia de jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

3.3.2.2 Insulinemia

Mesmo não tendo sido observada diferença nas glicemias de jejum (acima), a insulina plasmática de jejum (12 h) medida nos animais tratados por 22 semanas e submetidos a oito sessões de tratamento térmico (HS) foi significativamente menor nos animais NC em relação aos animais SHAM tratados por 18 e 22 semanas e os animais HS tratados por 18 semanas (submetidos a quatro sessões HS) de mesma dieta, assim com os animais HFD em relação aos grupos de mesma dieta SHAM tratados por 18 e 22 semanas e os animais HS tratados por 18 semanas (fig. 40).

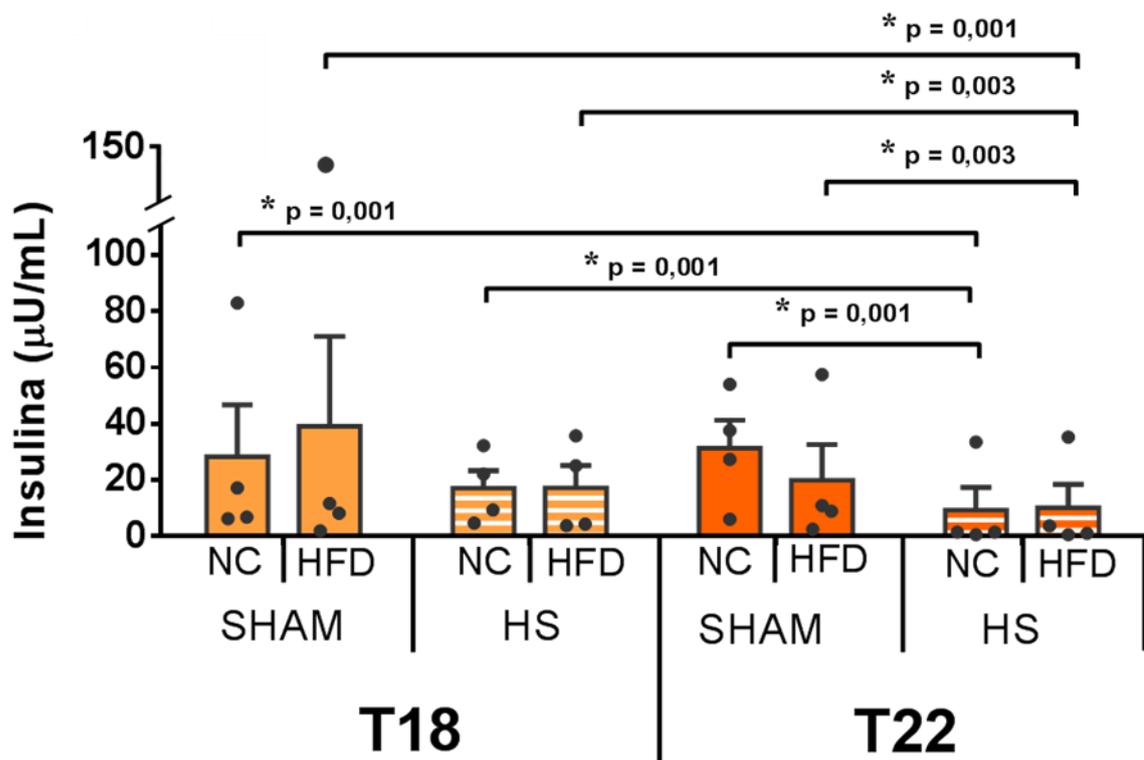


Figura 40: Insulinemia de Jejum (12 h) dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

3.3.3 Índices de Resistência à Insulina

3.3.3.1 HOMA IR

De mesmo modo que a insulina, os valores médios obtidos pelo cálculo do índice de resistência à insulina HOMA foram mais baixos nos grupos tratados por 22 semanas e submetidos a oitos sessões de tratamento térmico (HS) em relação a seus controles (SHAM) e SHAM dos animais tratados por 18 semanas com a mesma dieta. Resultado que não foi observado nos animais HS que foram submetidos a apenas quatro sessões de tratamento térmico (T18 HS), e que interessante apresentam valor mais alto do que o grupo T22 HS quando nos animais NC ($p = 0,006$) e HFD ($p = 0,010$) quando realizada a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apenas entre estes grupos.

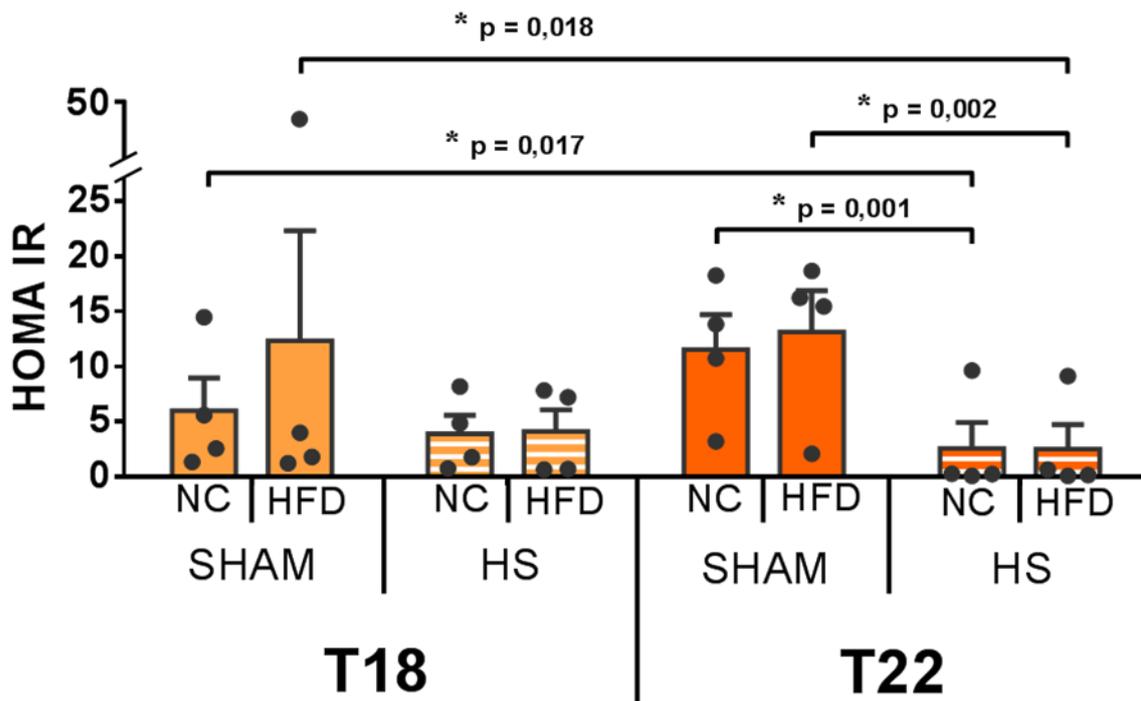


Figura 41: HOMA IR dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

3.3.3.2 HOMA BETA

Para o índice HOMA relativo à função das células beta do pâncreas os valores foram iguais em todos os grupos, como demonstrado na figura 42.

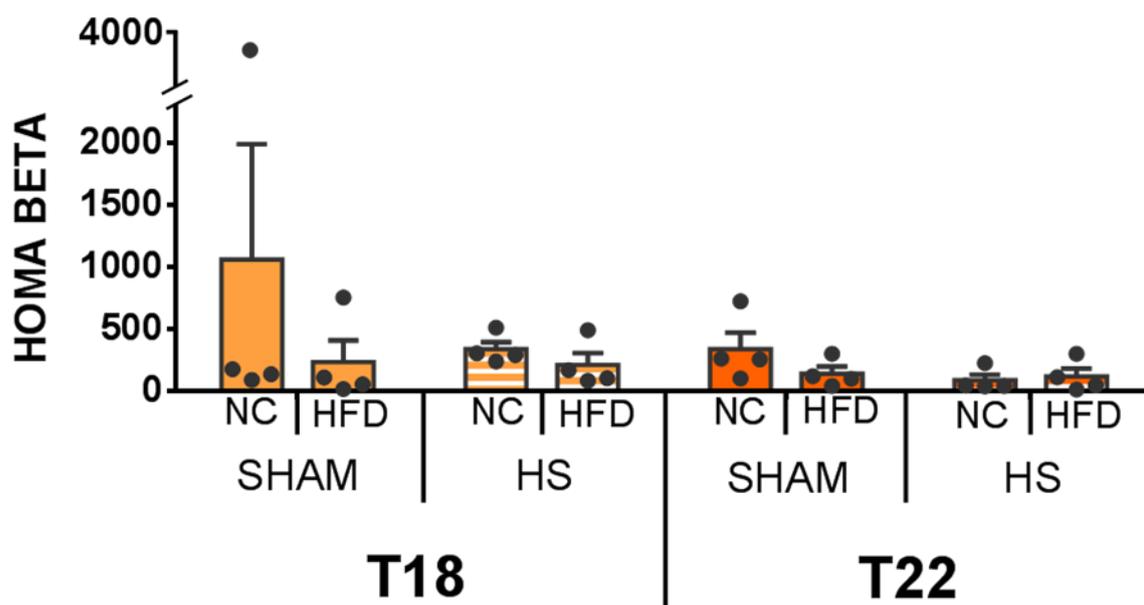


Figura 42: HOMA BETA dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

3.3.2 Testes de tolerância a Glicose e Insulina

3.3.2.1 OGTT

Em relação aos dados de tolerância oral a glicose (figura 43) os animais tratados por 18 semanas nas duas dietas e submetidos a quatro sessões de tratamento térmico (HS) ou SHAM (NC, fig. 43-A e HFD, fig. 43-B) não demonstraram diferenças entre si nas curvas apresentadas, sendo as glicemias medidas nos pontos 15, 30, 60 e 90 min mais altas que o ponto inicial (0 min). Nos animais tratados por 22 semanas e submetidos a oito sessões de tratamento térmico (HS) ou SHAM os animais mantidos com dieta padrão de laboratório não mostraram diferença nas curvas relacionadas ao tratamento térmico, e os pontos 15, 30 e 60 min foram maiores que o valor inicial nos dois grupos (NC, fig. 43-C). Os animais submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica e HS tiveram valores mais baixo de glicemia do seu respectivo controle (SHAM HFD T22) nas medidas realizadas 30, 60, 90 e 120 min depois da administração de glicose. (HFD, fig. 43-D). Essa diferença fica clara também ao avaliar-se separadamente o comportamento das

duas curvas, a curva dos animais HS do HFD tratados por 22 semanas tem valores maiores de glicemia do que o valor basal apenas nos pontos de 15 e 30 min, já os animais SHAM de mesmo tratamento não retornam a glicemia a valores basais nem 120 min depois do início do teste, se mostrando muito mais intolerante no teste. Interessantemente, houve diferença entre as curvas dos animais tratados por 22 semanas (T22) e submetidos a tratamento térmico (HS) nas diferentes dietas, os animais HFD tiveram valores de glicemia mais baixos que os apresentados pelos NC nos tempos de 30 ($p = 0,0312$), 60 ($p = 0,0017$), 90 ($p = 0,0091$) e 120 ($p = 0,0421$).

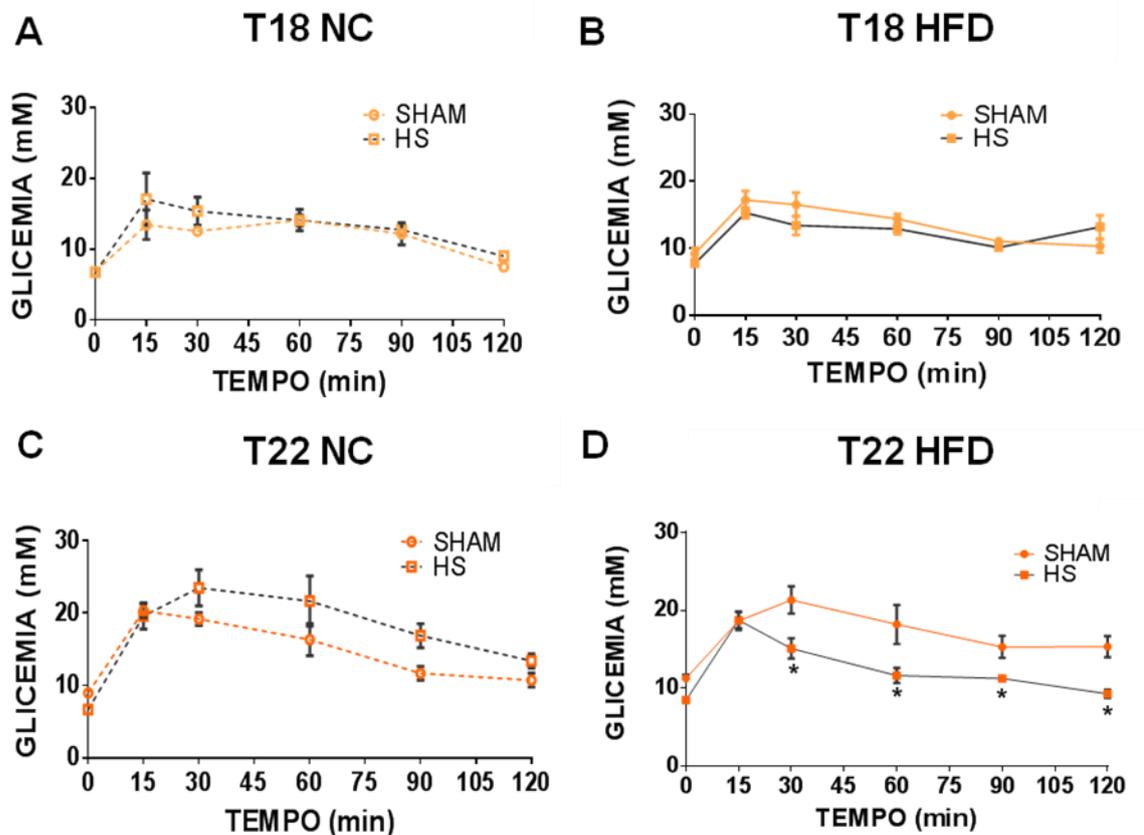


Figura 43: Curva de tolerância oral a glicose realizada em animais submetidos a terapia térmica (HS) ou não (SHAM). A: grupo dieta padrão (NC) acompanhado por 18 semanas (T18); B: grupo dieta hiperlipídica (HFD) acompanhado por 18 semanas (T18); C: grupo dieta padrão (NC) acompanhado por 22 semanas (T22); D: grupo dieta hiperlipídica (HFD) acompanhado por 22 semanas (T22). Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre SHAM e HS.

Os valores médios da área incremental sob a curva, mostrados na figura 44, foram menores no grupo HFD de 22 semanas, submetido a tratamento térmico, que

seu grupo controle (SHAM) de mesmo tempo e dieta, bem como curiosamente, foi menor até que o grupo HS de mesmo tempo, mas tratado com dieta padrão (NC).

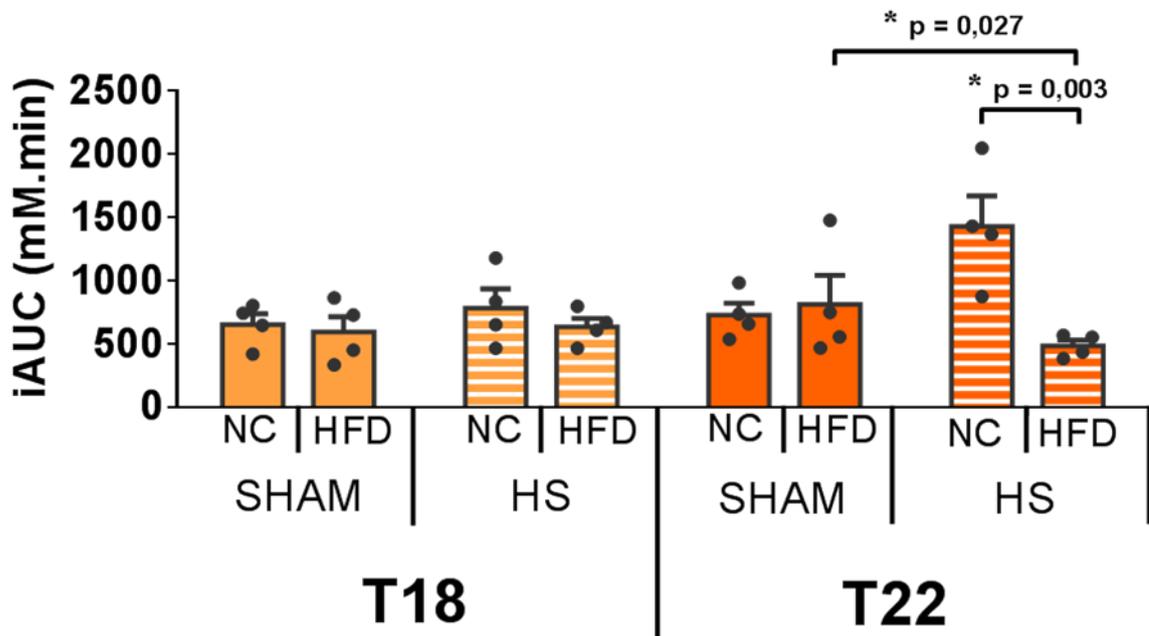


Figura 44: Área incremental sob a curva do OGTT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças apresentadas no gráfico.

3.3.3.3 IPITT

Em relação aos dados do teste de tolerância a insulina por via intraperitoneal (figura 45) os animais apresentaram curvas com comportamento semelhante, exceto pelo grupo tratado por 18 semanas com dieta hiperlipídica que os animais SHAM iniciaram com valores mais altos de glicemia e 15 min após a injeção de glicose estavam mais baixos que o grupo HS (fig. 45 – B), mostrando uma maior responsividade a insulina no grupo SHAM.

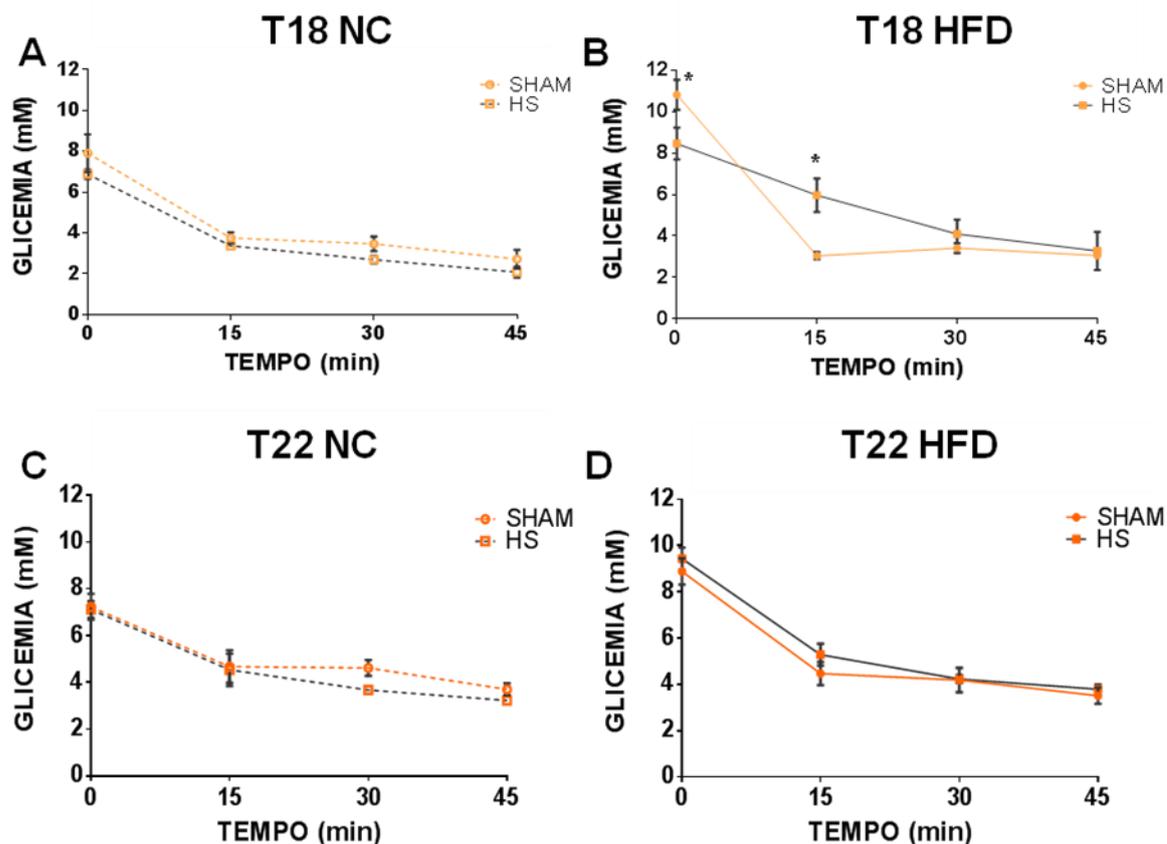


Figura 45: Curva de tolerância intraperitoneal a insulina a realizada em animais submetidos a terapia térmica (HS) ou não (SHAM). A: grupo dieta padrão (NC) acompanhado por 18 semanas (T18); B: grupo dieta hiperlipídica (HFD) acompanhado por 18 semanas (T18); C: grupo dieta padrão (NC) acompanhado por 22 semanas (T22); D: grupo dieta hiperlipídica (HFD) acompanhado por 22 semanas (T22). Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ entre SHAM e HS.

A área incremental sob a curva invertida (figura 46) mostrou dois resultados inesperados. O primeiro está relacionado com a apresentação das curvas dos grupos T18 HFD (SHAM e HS), descritas anteriormente, na qual o valor obtido para os animais HS foi menor que do grupo SHAM, mostrando novamente uma maior responsividade por parte dos controles. O outro resultado foi semelhante ao visto no teste OGTT entre os animais HS de 22 semanas tratados com dieta HFD ou NC: os valores das áreas para os animais tratados com dieta hiperlipídica foram maiores que os da dieta padrão, sugerindo melhor resposta à insulina nesse grupo.

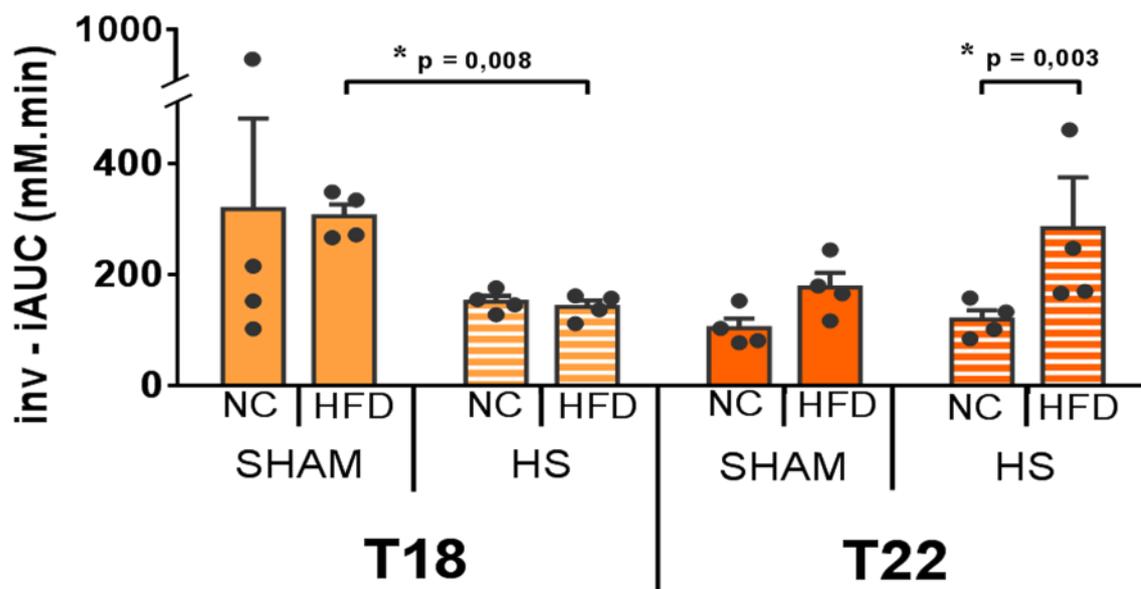


Figura 46: Área incremental sob a curva invertida do IPITT dos animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) durante 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças apresentadas no gráfico.

3.3.4 Medidas Morfométricas

Em relação as análises macroscópicas da morfologia de tecido adiposo e fígado (fig. 47) os animais tratados com dieta hiperlipídica demonstraram volume maior de tecido adiposo retirado (A) e visualizado na carcaça (C), bem como um fígado mais opaco (B) em relação aos animais NC, como visto na parte I, mas não foi visualizado diferenças relacionadas ao tratamento térmico nesses parâmetros.

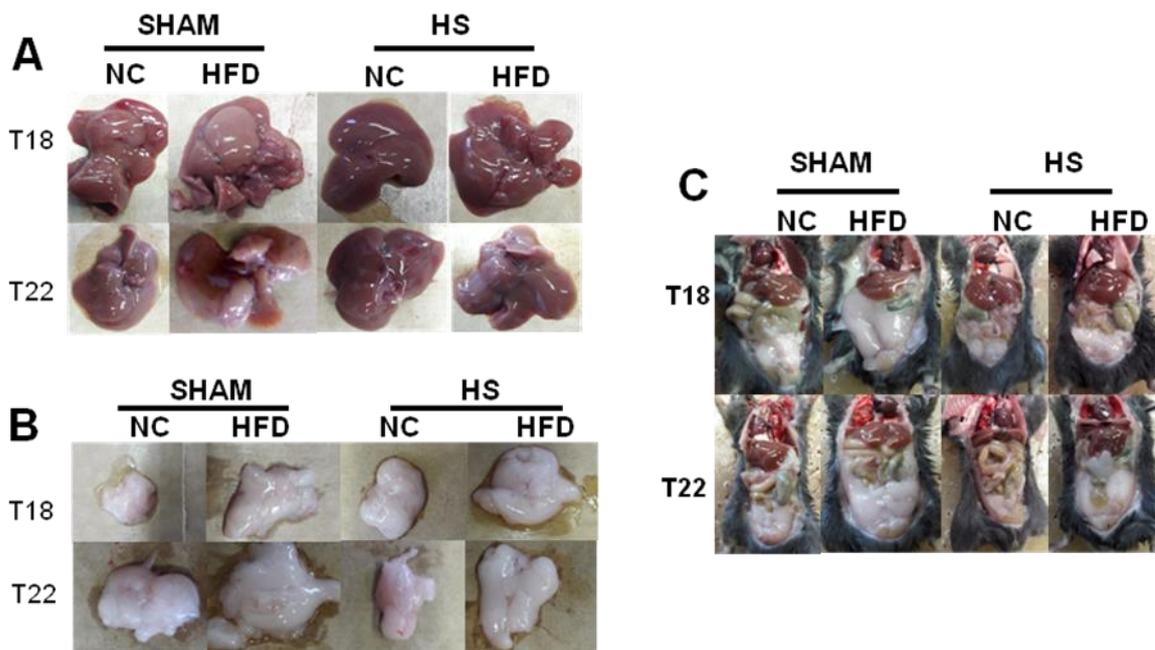


Figura 47: Imagens representativas obtidas dos tecidos extraídos dos animais tratados com dieta padrão (NC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A- Fígados; B – Tecido Adiposo Visceral; C – Carcaça recém aberta.

Já as medidas de massa do tecido adiposo (fig. 48), tanto de valores brutos em gramas (A), quanto os valores normalizados pelos pesos dos animais (B), mostraram que apenas os valores médios dos animais HFD HS T22 não foram diferentes dos NC de mesmo tratamento. Isso sugere um efeito benéfico do HS nos animais que foram submetidos a oito sessões, resultado que fica mais evidente no gráfico B da figura 48, o qual mostra que, quando a massa do tecido é normalizada pela própria massa total do animal, o grupo HS HFD de 22 semanas é cerca de duas vezes menor que seu respectivo grupo controle (SHAM HFD T22).

TECIDO ADIPOSEO

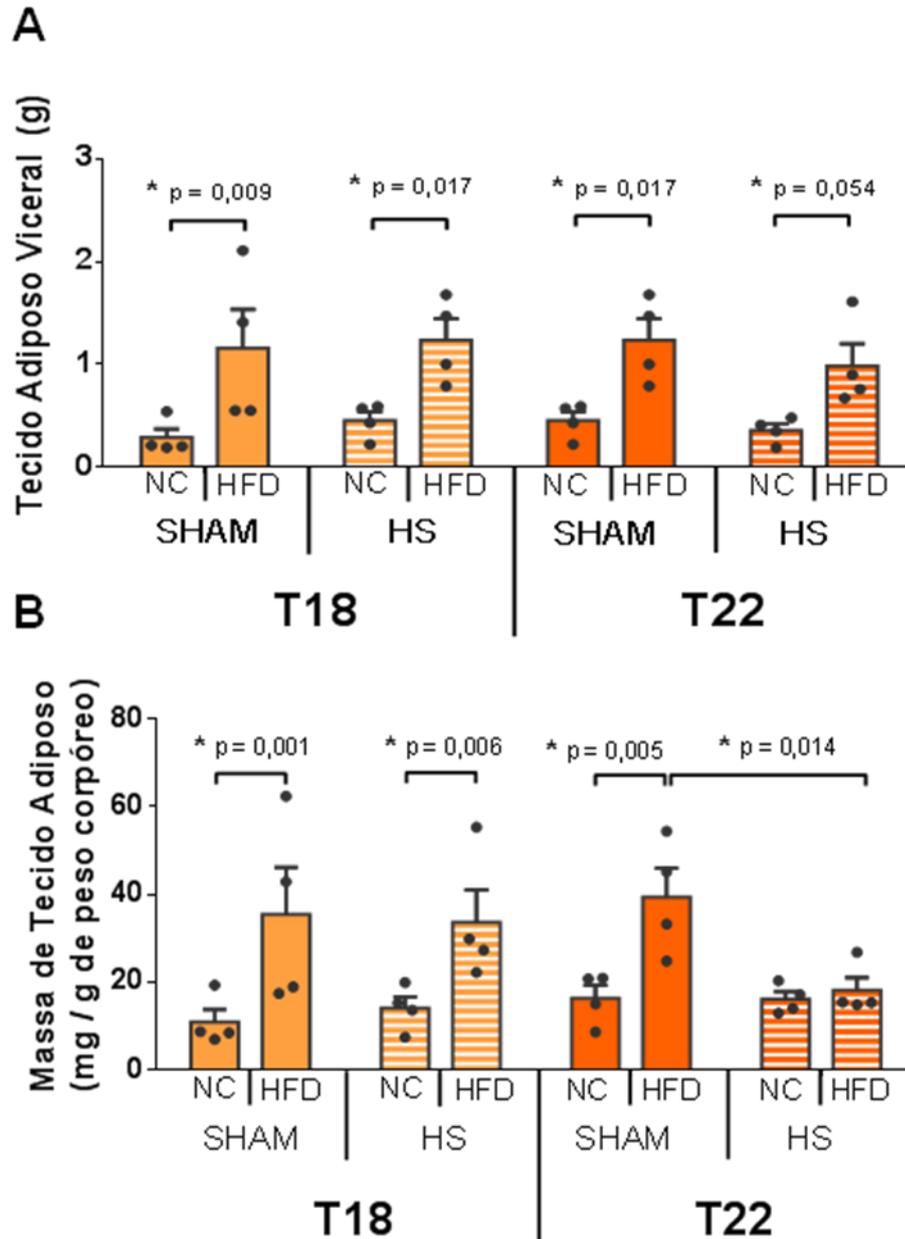


Figura 48: Dados de massa do tecido adiposo visceral de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

Na figura 49 são mostrados os dados obtidos da massa do tecido hepático dos animais, referentes à congestão hepática. Os animais não mostraram diferença

entre os tratamentos nem nos valores dos dados brutos (A), nem na normalização pelo peso corpóreo dos animais (B).

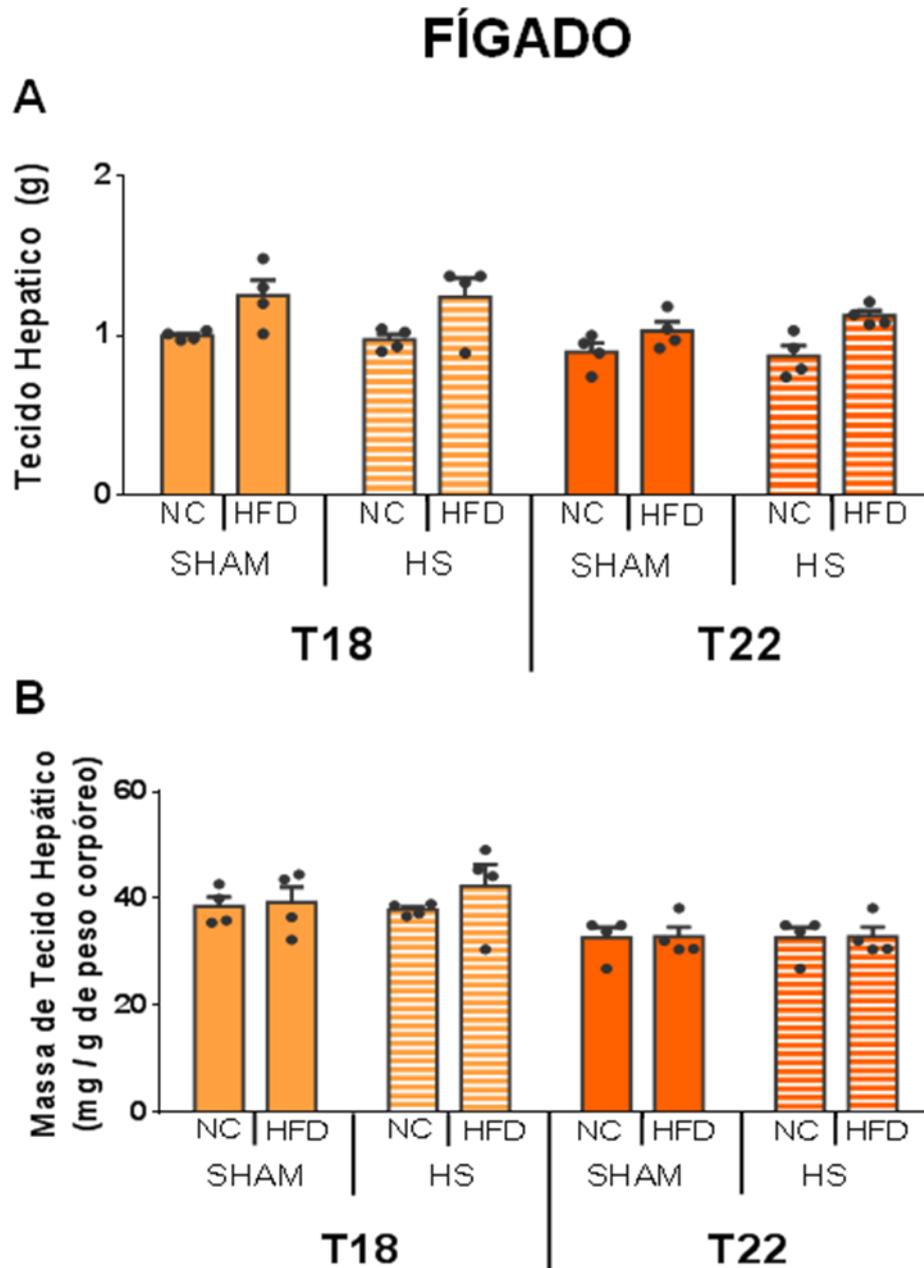


Figura 49: Dados de massa do hepático de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

A massa do músculo gastrocnêmio foi igual em todos os tratamentos, tanto nos dados brutos (fig 50-A), quanto normalizados (fig. 50-B).

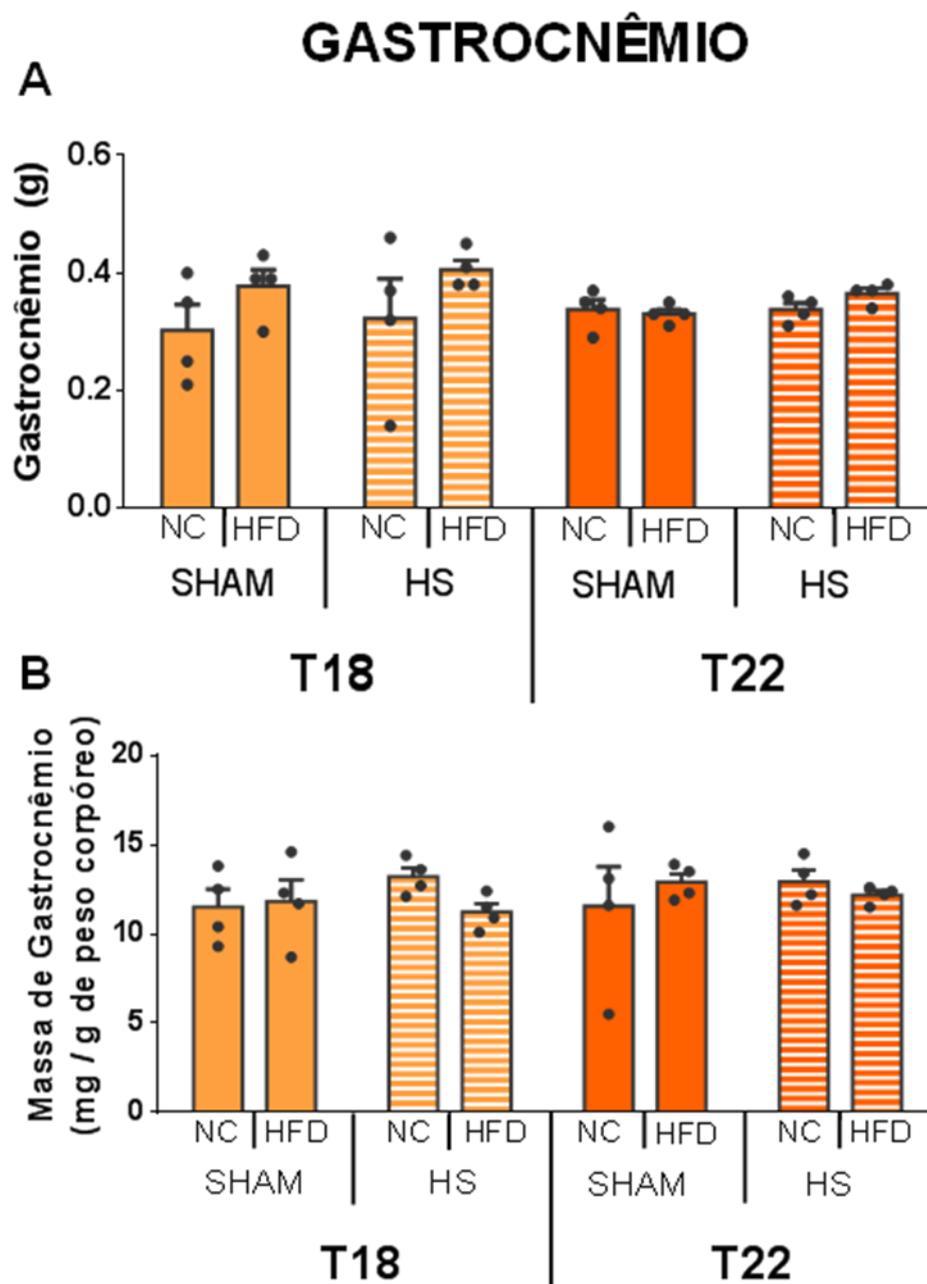


Figura 50: Dados de massa do músculo gastrocnêmio de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

Na análise do tecido cárdico, observamos um aumento nos valores brutos (fig. 51-A) do grupo HFD tratado por 22 semanas no grupo SHAM, o que não ocorre no grupo HS e não é observado quando estes valores são normalizados pelo peso dos animais (fig. 51-B).

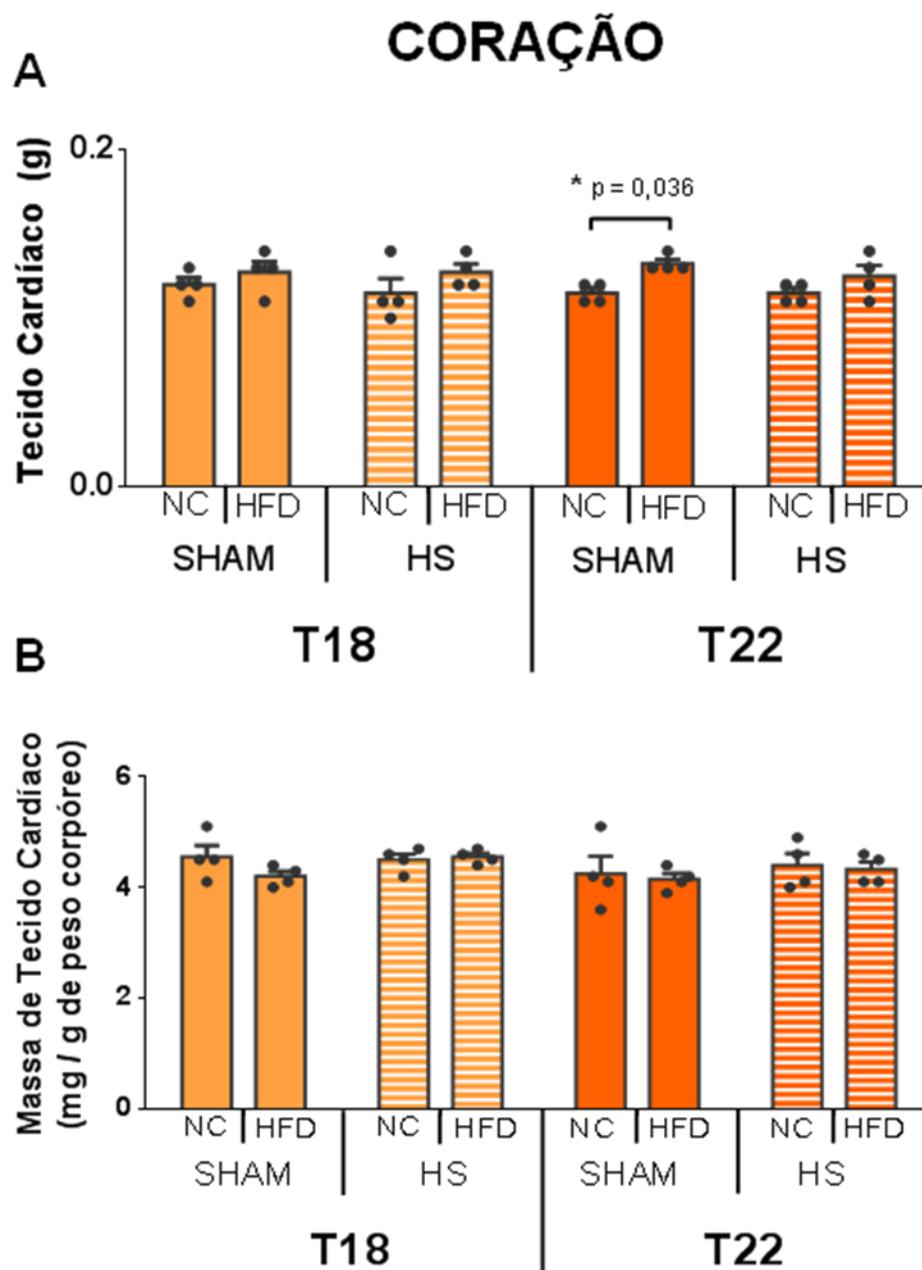


Figura 51: Dados de massa do tecido cardíaco de animais mantidos em dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A – Dados brutos em gramas; B – Normalização do extraído pela massa total dos animais. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

3.3.5 Detecção de senescência proliferativa em Tecido Adiposo

A análise macroscópica da coloração do tecido adiposo submetido à técnica de detecção de senescência proliferativa por meio da atividade enzima Beta-

Galactosidase (figura 52) demonstrou uma diminuição da senescência observada no grupo HFD submetido a oito sessões de tratamento térmico (HS do T22) quando comparado ao grupo HFD submetido a quatro sessões de tratamento térmico (HS do T18).

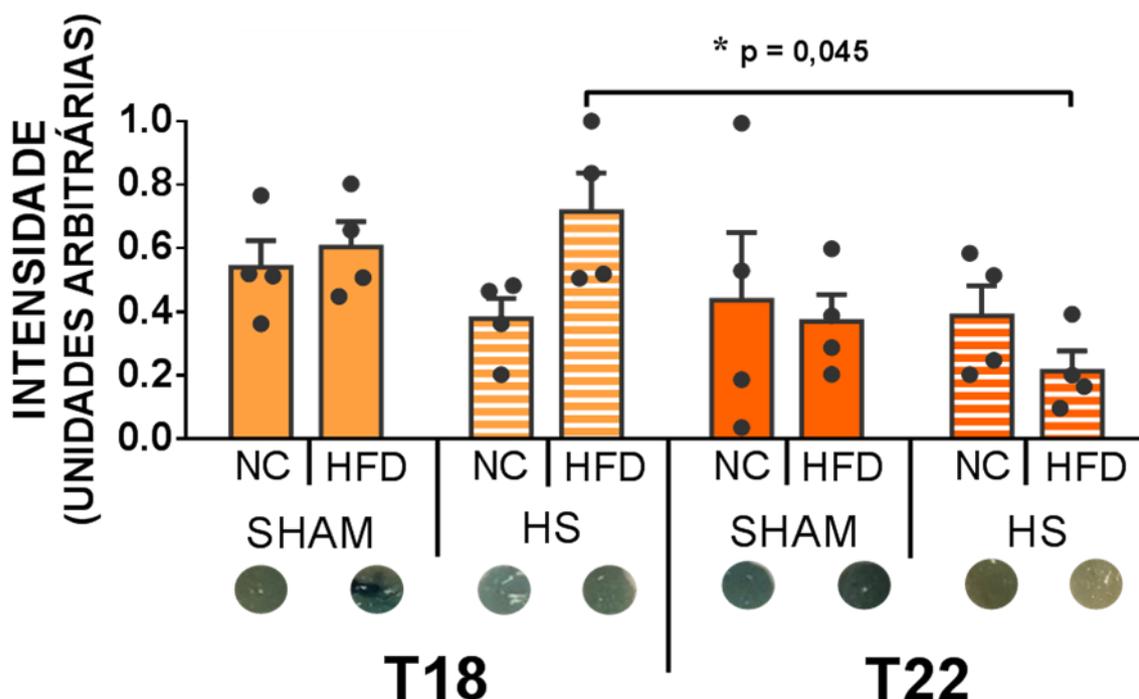


Figura 52: Detecção macroscópica da atividade da enzima Beta-Galactosidase em tecido adiposo visceral. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) por 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças indicadas no gráfico.

3.3.6 Imunoconteúdo Proteico

O conteúdo de HSP70 no fígado foi igual em todos os grupos (figura 53-A). O HSF1, inesperadamente, se mostrou mais baixo nos animais T22 de dieta padrão do grupo tratado com choque térmico em relação ao grupo SHAM da mesma dieta (figura 53-B). Assim como o conteúdo de SIRT-1 dos grupos de dieta hiperlipídica dos animais SHAM em relação aos animais tratados por igual tempo (18 e 22 semanas) e com a mesma dieta (figura 53-C).

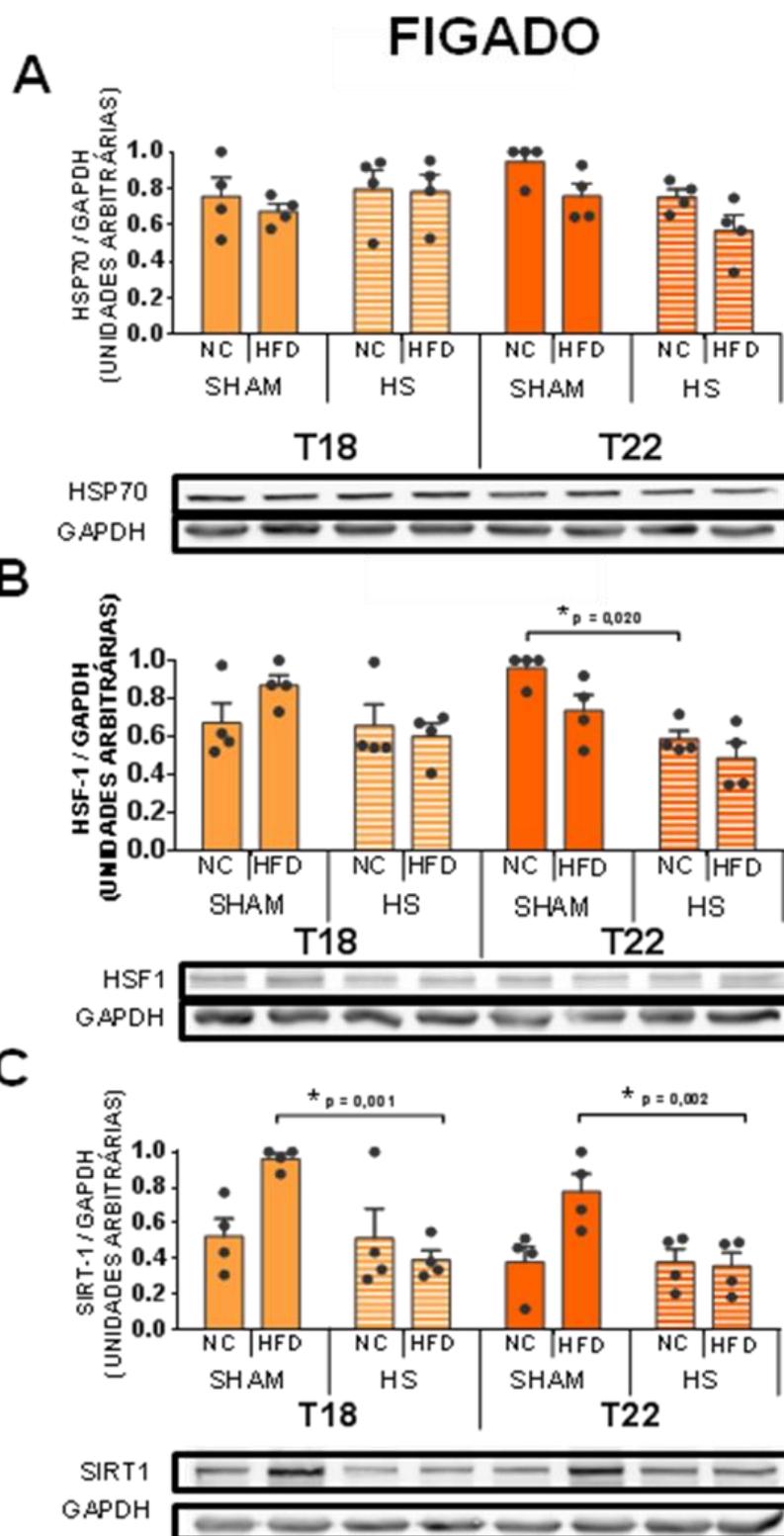
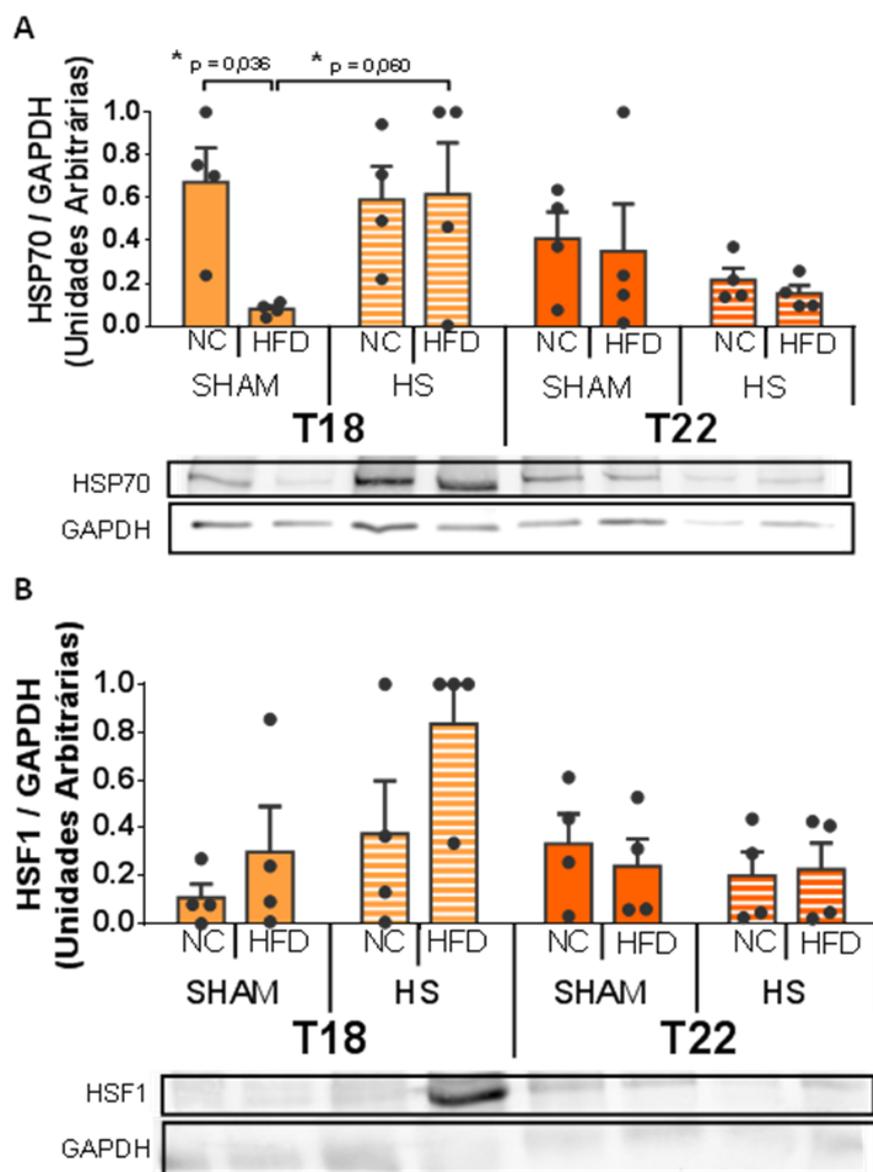


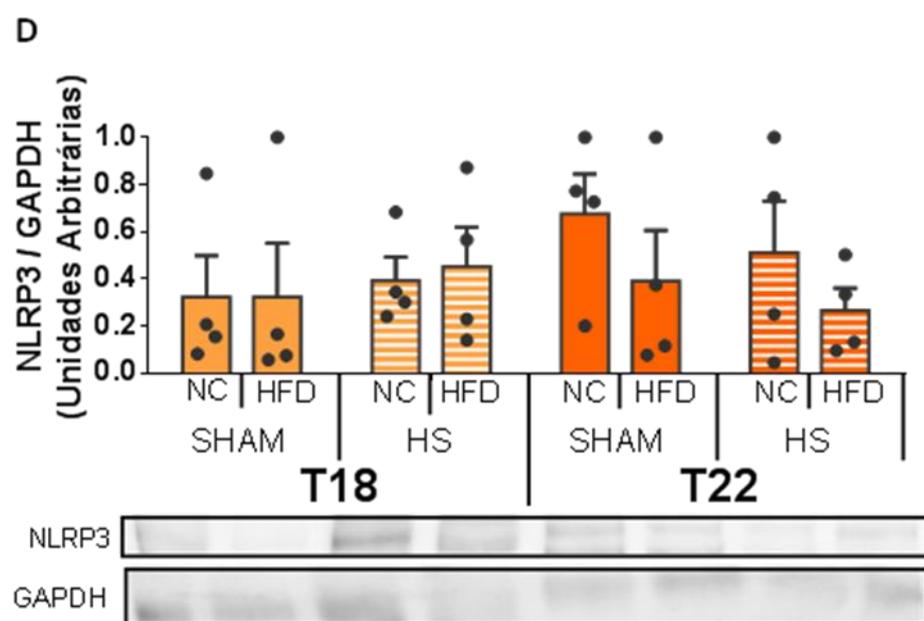
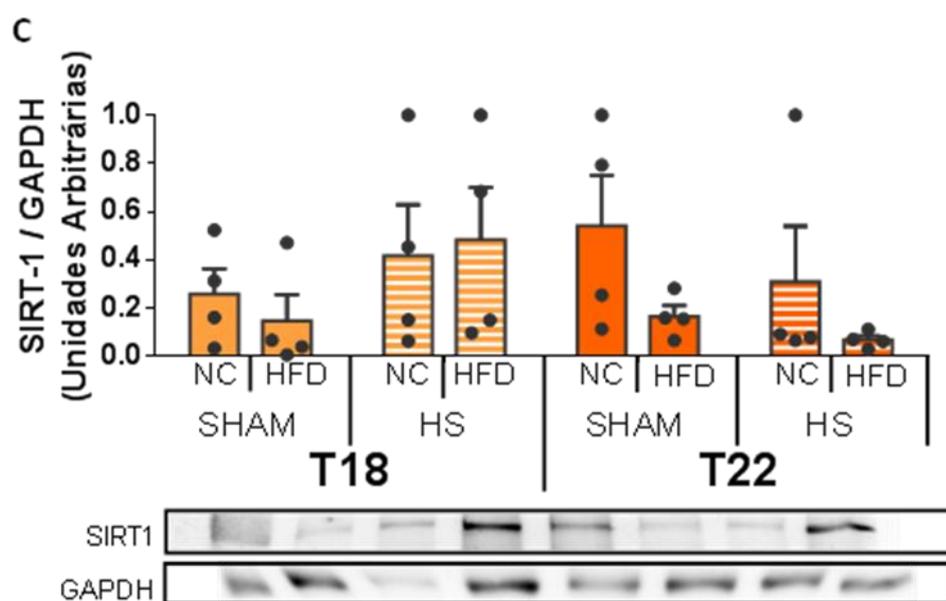
Figura 53: Imunoconteúdo proteico do fígado extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não. A – HSP70 normalizada pelo GAPDH; B – HSF1 normalizado pelo GAPDH; C – SIRT1 normalizado pelo GAPDH. Em detalhe imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos

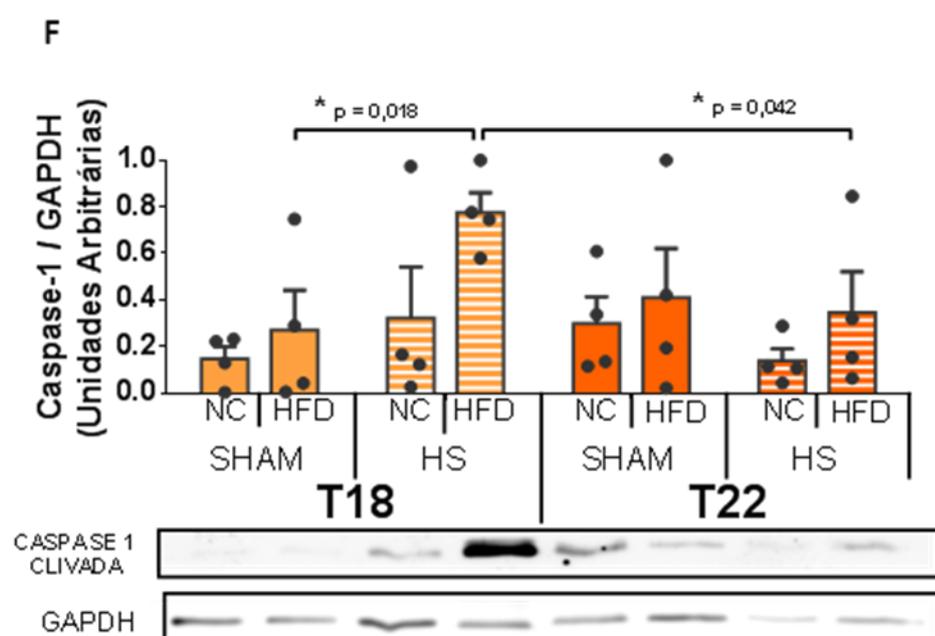
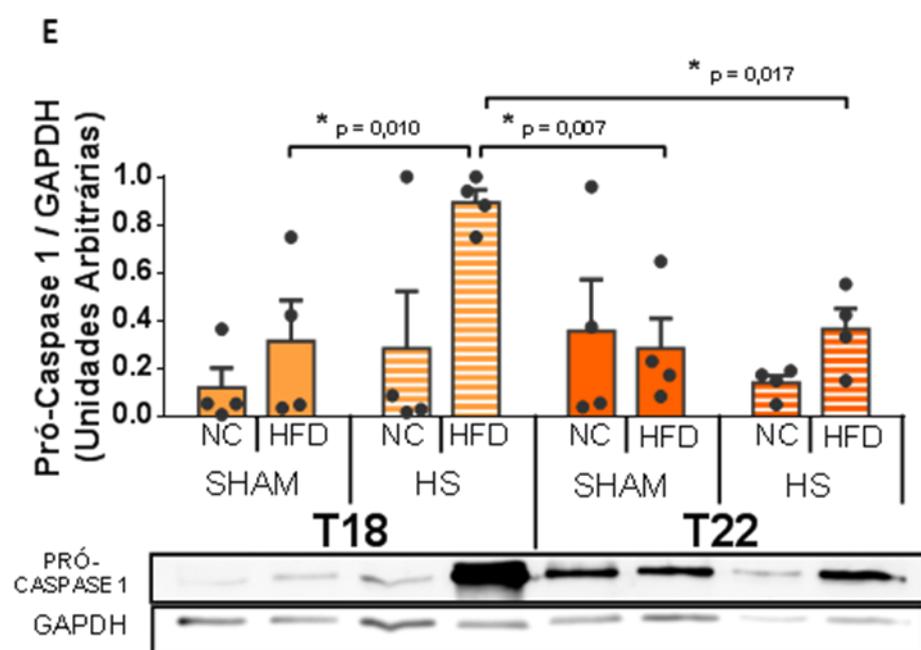
em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

No tecido adiposo, os dados obtidos mostraram que o tratamento térmico não alterou significativamente o imunoconteúdo de HSP70 (fig. 54-A), HSF1 (fig. 54-B), SIRT-1 (fig. 54-C) e NLRP3 (fig. 54-D). Interessantemente, a relação de caspase-1 clivada / pró-caspase-1, que indica a ativação do inflamassomo NLRP3, foi igual em todos os grupos (fig. 54-G). Já quando examinamos os valores isolados de cada forma da caspase-1, observamos um aumento nos animais HFD tratados com quatro sessões de choque térmico (HS T18) tanto na sua forma inativa (pró-caspase 1: fig. 54 – F), quanto sua forma ativa (caspase-1 clivada: fig. 54 – E) em relação ao seu controle de mesmo tempo e dieta (HFD SHAM T18) e grupo HFD tratados com oito sessões de choque térmico (HS T22).

TECIDO ADIPOSO VISCERAL







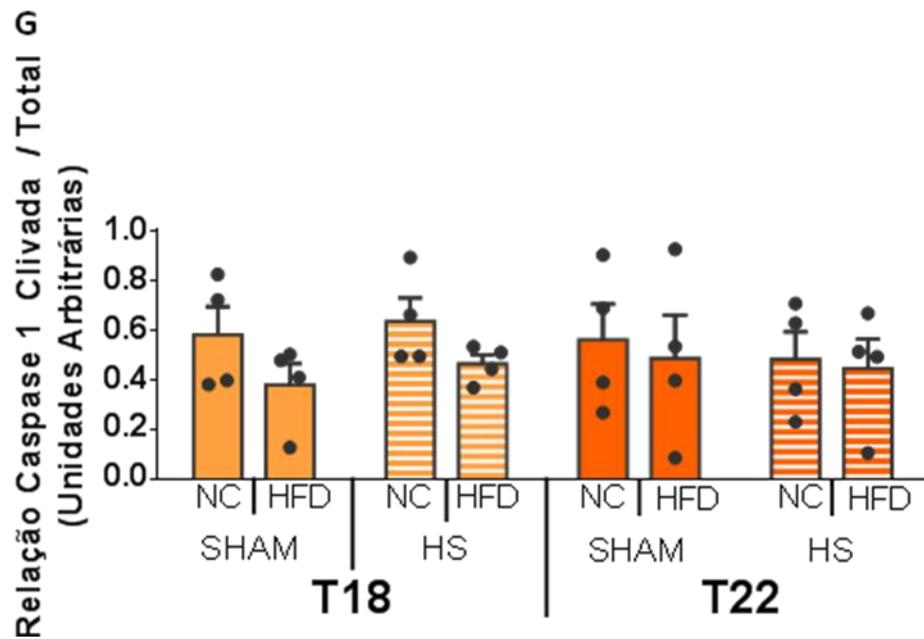


Figura 54 - Imunoconteúdo proteico do tecido adiposo extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). A – HSP70 normalizada pelo GAPDH; B – HSF1 normalizado pelo GAPDH; C – SIRT-1; D – NLRP3; E – Pró-caspase 1; F – Caspase 1 clivada. Normalizados pelo GAPDH. Em detalhe imagens representativas dos respectivos géis. G – Relação do conteúdo de Caspase 1 clivada com a pró-caspase 1. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

O conteúdo de HSP70 muscular, mostrado na figura 55, foi aumentado próximo a duas vezes no gastrocnêmio nos animais NC e HFD submetidos a oito sessões de tratamento térmico (HS T22) em relação aos animais SHAM de mesma dieta e tempo e animais submetidos a quatro sessões de tratamento térmico (HS T18) de mesma dieta. Não músculo sóleo os valores de HSP70 foram iguais em todos os grupos.

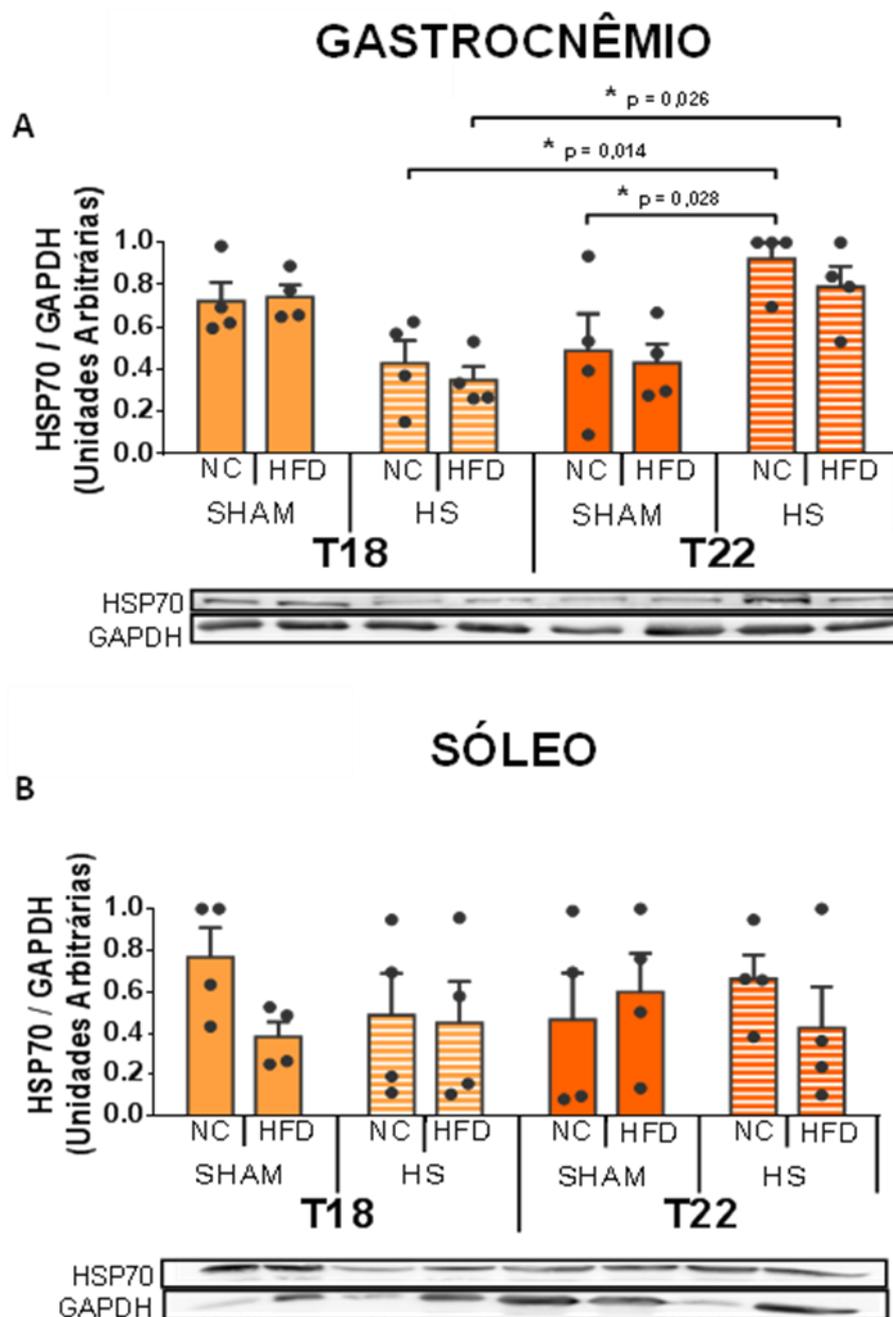


Figura 55 - Imunoconteúdo proteico de HSP70 do tecido muscular extraído de camundongos tratados por 18 (T18) e 22 (T22) semanas com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) que realizam tratamento térmico (HS) ou não. A – Gastrocnêmio; B – Sóleo. Normalizados pelo GAPDH. Em detalhe imagem representativa dos respectivos géis. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey. * Diferenças mostradas no gráfico.

3.3.7 Desafio Térmico

Da mesma forma que o experimento realizado na parte I, a avaliação da capacidade de resposta da via de choque térmico, realizada por meio do desafio térmico em células de sangue total por 1 hora não mostrou diferença em nenhum dos grupos (figura 56). Esse resultado sugere que a avaliação não tenha sido efetiva com o período de tempo empregado (1 h), razão pela qual os experimentos estão sendo repetidos, grupo a grupo, incubando-se as células por 2 h a 37 e 42 °C.

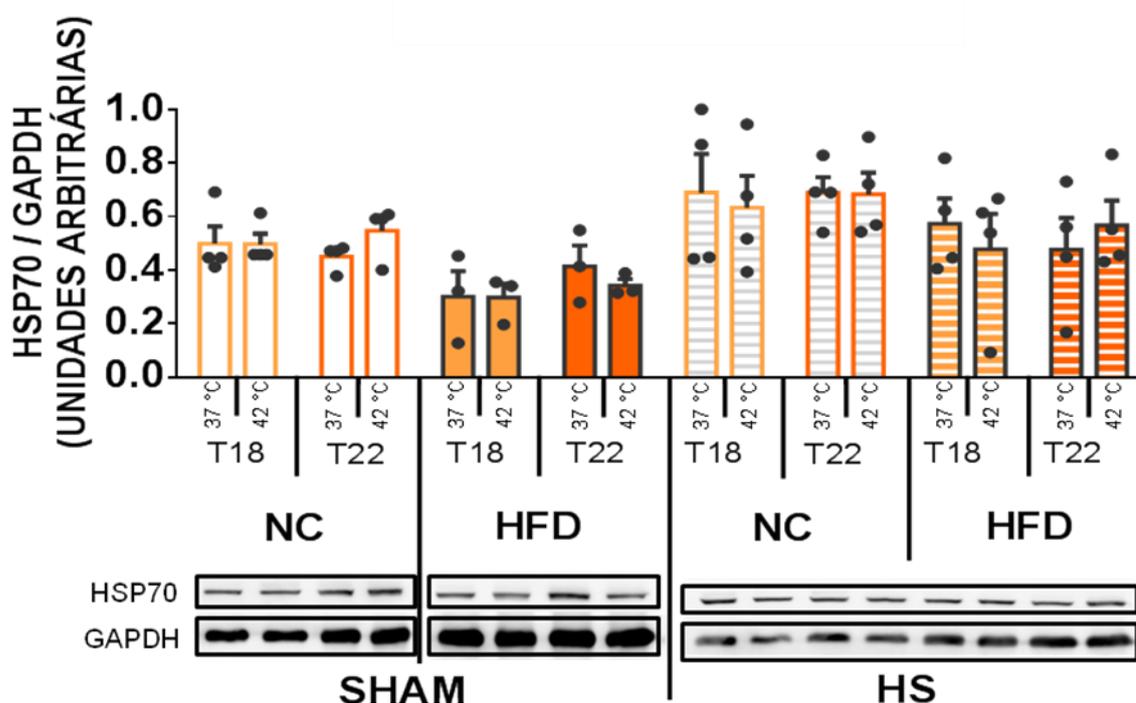


Figura 56: Avaliação da resposta da via de choque térmico em camundongos C57BL/6J. Sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C por 1 h e imunodeteção após mais 7 h para HSP70, normalizada pelo conteúdo de GAPDH. Animais tratados com dieta padrão (NC) ou hiperlipídica (HFD) 18 (T18) e 22 (T22) semanas submetidos a sessões de tratamento térmico (HS) ou não (SHAM). Os géis dos animais SHAM utilizados para montar esta figura são os mesmos da parte experimental I. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA de 2-vias com medidas repetidas *post hoc* Tukey.

3.4 Discussão

A parte II deste trabalho foi realizada para avaliar os efeitos da terapia hipertérmica em animais sabidamente doentes, por isso optou-se por utilizar os dois últimos tempos de acompanhamento do desenho experimental da parte I. Mais ainda, foi comparado o efeito de 1 mês (quatro sessões de HS) ou 2 meses (oito sessões de HS).

Todos os grupos tiveram consumo calórico, eficiência metabólica e índice de Lee iguais. O ganho de peso também não se mostrou sensível ao tratamento térmico pelo tempo realizado, sendo diferente apenas entre as dietas. As massas dos tecidos fígado, coração e gastrocnêmio não foram alteradas sob influência do tratamento hipertérmico. Contudo, interessante, o conteúdo de tecido adiposo visceral retirado dos animais HFD HS tratados por 22 semanas foi semelhante aos animais de mesmo tempo e tratamento alimentados com NC ($p = 0,054$), diferença que se torna mais significativa quando normalizado os valores pela massa corpórea de cada camundongo, revelando, ainda, uma diminuição do grupo HFD HS T22 com relação aos animais HFD T22 que não realizaram as sessões HS (grupo SHAM). Este resultado é bem animador e se coaduna com a literatura que mostra a terapia hipertérmica como um diminuidor da deposição de gordura, bem como deve estar diretamente ligado as melhoras observadas nos índices glicêmicos / insulinêmicos destes animais (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019; KARPE; TIKOO, 2014).

Os resultados mais promissores visualizados na literatura dizem respeito à melhora da sinalização por parte da insulina em animais HFD submetidos à HS. E foram reproduzidos apenas parcialmente neste trabalho. São relatados na literatura resultados de redução significativa nos valores de glicose e insulina de jejum, bem como o HOMA IR dos animais após 48 h e 72 h da última sessão de tratamento HS (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008; KARPE; TIKOO, 2014). No caso dos presentes resultados a glicemia medida em jejum no momento da morte dos animais não teve diferença entre os grupos. Porém, os achados de insulina, bem como o HOMA IR demonstraram redução nos valores dos animais HS do grupo T22 de ambas as dietas frente não só os animais de mesmo tempo e dieta SHAM, mas como também os animais HS submetidos à metade das sessões (T18). O HOMA beta realizado não demonstrou variação entre os grupos, mostrando ser uma questão de resistência periférica e não de um acometimento das células beta-pancreáticas, pelo menos até então.

Em relação às curvas glicêmicas, já foi mostrado um efeito sensibilizador do HS em animais HFD até 72 h após a intervenção (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008) e efeitos que perduraram mais de 72 h em animais com tratados com HFD e portadores de aterosclerose (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019). De fato, os animais HFD T22 que não receberam tratamento térmico demonstraram retardo na redução da glicemia no GTT, como mostrado pelos outros autores. Entretanto, parte dos resultados foi surpreendente, pois ocorreu uma aparente intolerância à insulina e à glicose nos animais NC HS tratados por 22 semanas (demonstrado pelo aumento da área incremental sob a curva do GTT e diminuição da área incremental sob a curva invertida do ITT) que não condiz nem com o esperado, nem com os resultados de HOMA IR obtidos.

As análises de conteúdo proteico da HSF1 e SIRT1 no tecido adiposo visceral não apresentaram diferenças, contrastando com o aumento da HSP70 no mesmo tecido de animais HFD T18 HS comparados ao mesmo grupo SHAM. Seria esperado que o aumento da HSP70 fosse acompanhado de uma maior ativação de toda a via de choque térmico. De igual forma os dados destas proteínas observadas no fígado não fazem sentido. Neste tecido a HSP70 não mostrou variação entre os grupos, enquanto a SIRT1 e o HSF1 se mostraram diminuídos justamente nos grupos submetidos ao HS. Sabe-se que o tratamento hipertérmico tem a capacidade de aumentar a expressão de toda a via de choque térmico a partir do aumento da SIRT1 (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019; KARPE; TIKOO, 2014), o oposto do observado nas análises da segunda parte deste trabalho, que não correspondem nem ao resultado da SIRT1 relacionado a dieta na parte I deste trabalho (com 6 animais por grupo). Portanto, imaginamos tratar-se de um erro estatístico do tipo II, onde observamos diferença onde realmente não há (MACFARLANE, 2003). Para a análise desta proteína talvez fosse necessário um número maior do que quatro animais por grupo e, por isso, estamos repetindo os estudos.

Já foi mostrado que o aumento da expressão de HSP72 no músculo protege os animais do desenvolvimento da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (HENSTRIDGE; BRUCE; DREW; TORY *et al.*, 2014). Parece possível, visualizando os resultados do presente trabalho, que os efeitos benéficos do tratamento térmico iniciem pelo tecido muscular e assim melhorem a sensibilidade à insulina, já que a melhora nos parâmetros glicêmicos coincide com o aumento de HSP70 no gastrocnêmio dos animais tratados com 8 sessões de HS NC e HFD frente tanto aos animais SHAM de mesmo tempo, como aos animais HS mantidos apenas até a 18ª semana.

Conforme comentado anteriormente, é esperado o aumento da ativação crônica do inflamassomo NLRP3 no tecido adiposo de animais obesos (RINGLING; GASTECKI; WOODFORD; LUM-NAIHE *et al.*, 2016). A presença do inflamassomo ativado está associado ao desenvolvimento da SASP e consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo inflamado, além de contribuir para a depleção da SIRT1 (KIM; MERIIN; GABAI; CHRISTIANS *et al.*, 2012; NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014). Foi demonstrado que a caspase-1 ativada pelo NLRP3 cliva a proteína de ligação ao mRNA HuR (TALWAR; JIN; CARROLL; LIU *et al.*, 2011), que estabiliza a transcrição SIRT1 (ABDELMOHSEN; PULLMANN JR; LAL; KIM *et al.*, 2007). Assim, seria possível explicar a capacidade do tratamento térmico em aumentar o conteúdo de SIRT1, descrito na literatura, pela inativação do inflamassomo NLRP3, cuja estrutura é sensível ao calor (LEVIN; WICKLIFFE; LEPPLA; MOAYERI, 2008). Para análise do efeito do choque térmico neste sistema realizou-se a imunodeteção do conteúdo de NLRP3, que não mostrou diferença em nenhum dos grupos, e realizou-se a medida de atividade do inflamassomo pela relação da forma ativa (clivada da caspase-1) pela total (pró-caspase-1). A relação entre as duas formas da caspase, como o NLRP3, não mostrou diferença entre os tratamentos. Entretanto, o conteúdo das duas formas apresentou-se aumentado cerca de duas vezes mais nos animais HFD HS T18 do que nos animais HFD HS T22. Interessantemente, quando comparamos a senescência do tecido adiposo visceral desses dois grupos novamente os animais T22 HFD HS demonstraram uma redução em relação aos animais de mesma dieta e tratamento, que foram submetidos a 4 sessões de HS (T18), sugerindo uma maior senescência justamente nos animais que tinham um maior conteúdo de pró-caspase 1 e caspase 1, mesmo que de maneira inesperada.

Considerando-se os dados de insulinemia e HSP70 no gastrocnêmio além da senescência do tecido adiposo visceral no grupo de animais submetidos a mais sessões de HS, percebe-se a consonância com protocolos propostos anteriormente: de oito sessões (BRUXEL; TAVARES; ZAVARIZE NETO; DE SOUZA BORGES *et al.*, 2019) e dezesseis sessões (CHUNG; NGUYEN; HENSTRIDGE; HOLMES *et al.*, 2008), indicando um número mínimo de sessões HS para verificação do efeito benéfico próximo de oito.

PARTE III

4. PARTE III – PADRONIZAÇÃO DO DESAFIO TÉRMICO EM SANGUE TOTAL DE CAMUNDONGOS

Tendo em vista os resultados obtidos na realização do desafio térmico em sangue total nas partes I e II do presente trabalho, foram realizados dois teste de padronização para confirmação do melhor tempo de incubação para a correta visualização da HSR.

4.1 *Objetivos*

4.1.1 Objetivos Gerais

Padronizar a técnica de desafio térmico de sangue total para avaliação da capacidade de resposta da via de choque térmico em camundongos.

4.1.2 Objetivos Específicos

Determinar o tempo ideal de incubação a 42 °C;

Verificar a existência de diferença na resposta dado o estado alimentar do animal;

Identificar a ocorrência de diferenças na resposta entre os sexos.

4.2 Métodos

4.2.1 Animais utilizados

Foram utilizados 22 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J, 8 fêmeos e 14 machos, com 13 semanas de vida obtidos do Biotério Setorial de Camundongos do Departamento de Fisiologia, ICBS – UFRGS, mantido pelo Laboratório de Fisiologia Celular – FisCel. Os animais permaneceram no mesmo biotério, em caixas de polipropileno (300 x 200 x 130 mm, totalizando uma área interna de 416 cm²) em ambiente enriquecido. O biotério possuía um ciclo de claro (iluminação artificial acendendo às 7:00 h) / escuro de 12 h, temperatura de 25 ± 2 C e umidade relativa do ar entre 50 e 60 %. Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante todo período. Nessas condições, a temperatura dentro de seus respectivos ninhos (28 °C) foi mantida próxima da termoneutralidade para camundongos (MALONEY; FULLER; MITCHELL; GORDON *et al.*, 2014).

4.2.2 Desenho experimental

Conforme apresentado na figura 57, os camundongos foram mantidos por dez semanas depois do desmame (mimetizando indivíduos humanos que com trinta e cinco anos de vida), e antes da morte dos animais para a retirada do sangue foram deixados alimentados ou em jejum por 10 h.

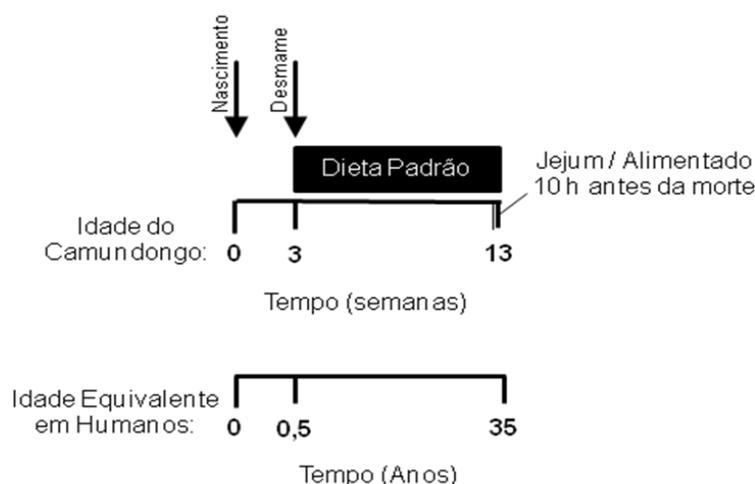


Figura 57: Desenho experimental parte III.

4.2.3 Desafio Térmico Teste 1

Para o primeiro momento, foram utilizados 16 camundongos divididos em 4 grupos: Fêmeas em Jejum de 10 h, Machos em Jejum de 10 h, Fêmeas Alimentadas e Machos alimentados, perfazendo 4 animais em cada grupo. O sangue heparinizado coletado no momento da eutanásia dos animais foi separado em 4 partes, disperso em meio de cultura RPMI 1640 (1:10, v/v) contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) e submetido às seguintes condições de incubação em banho-maria: por 1 h a 42 °C (choque térmico), 1 h a 37 °C (controle), 2 h a 42 °C (choque térmico) e 2 h a 37 °C (controle). Após, as amostras foram levadas, sem troca de meio, para estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C até completar 8 h (desde o início do desafio térmico) para cada protocolo. Para a análise, as amostras foram centrifugadas e tratadas com tampão de hemólise para posterior preparo para técnica de eletroforese SDS-PAGE e imunodeteção das proteínas HSP72 (Hspa1a), HSP73 (Hspa8) e GAPDH (normalizador) como nas partes experimentais I e II.

4.2.4 Desafio Térmico Teste 2

Para o segundo teste foram utilizados 6 camundongos machos em jejum de 10 horas. O sangue heparinizado coletado no momento da eutanásia dos animais foi separado em 4 partes, disperso em meio de cultura RPMI 1640 (1:10, v/v) contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) e submetido às seguintes incubações em banho-maria: 2 h a 42 °C (choque térmico), 2 h a 37 °C (controle) com troca de meio de cultura e 2 h a 42 °C (choque térmico), 2h a 37 °C (controle) sem troca de meio de cultura. Após as amostras permaneceram por mais 6 h em estufa de CO₂ (5 %) a 37 °C e foram preparadas como no teste 1.

4.3 Resultados

4.3.1 Teste 1

Os dados do teste 1 são mostrados na figura 58. O conteúdo relativo de HSP72, isoforma induzível (A), foi maior quando comparado ao conteúdo de HSP73, isoforma constitutiva (B). E, como esperado, que é justamente a isoforma induzível que mostrou responsiva ao teste, ocorreu, de fato, um aumento da expressão de HSP72, quando o sangue foi incubado por 2 h a 42 °C em machos e fêmeas em estado de jejum. Também como supúnhamos, não foi observada a mesma resposta na incubação de apenas por 1 h, ou com os animais em estado alimentado.

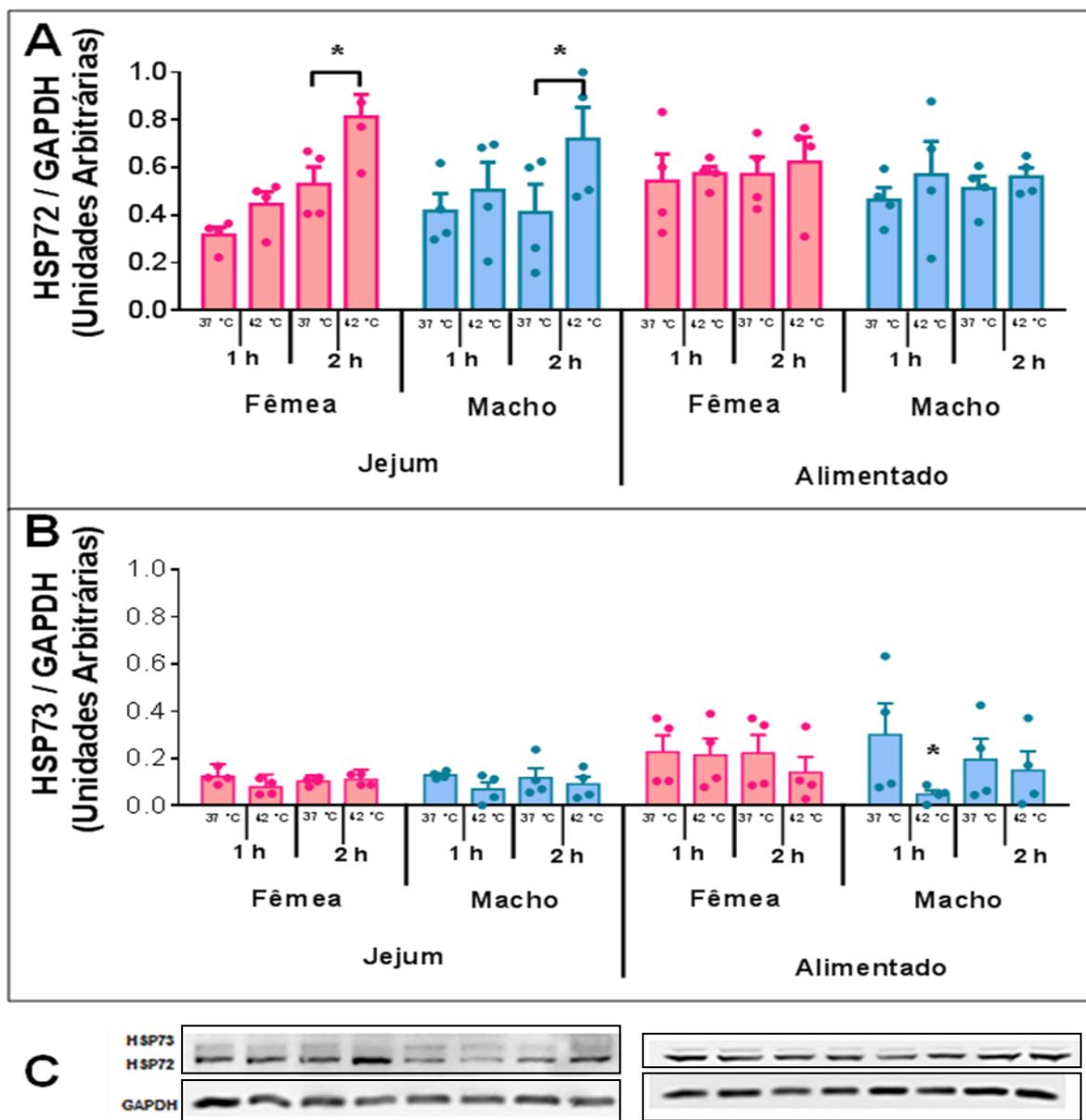


Figura 58: Resposta ao desafio térmico de sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C em camundongos C57BL/6J fêmeos e machos mantidos em jejum por 10 h ou alimentados. A: Imunodeteção de

HSP72 normalizada por GAPDH. B: Imunodeteção de HSP73 normalizada por GAPDH. C: Imagem representativa da imunodeteção. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post hoc* Tukey.

4.3.2 Teste 2

Os resultados do teste 2 estão mostrados na figura 59 e mostram o aumento esperado da expressão de HSP72, quando o sangue é incubado por 2 h a 42 °C. Esse perfil é notado tanto quando foi realizada a troca do meio com sem troca de meio, isto é, nas mesmas condições do teste 1.

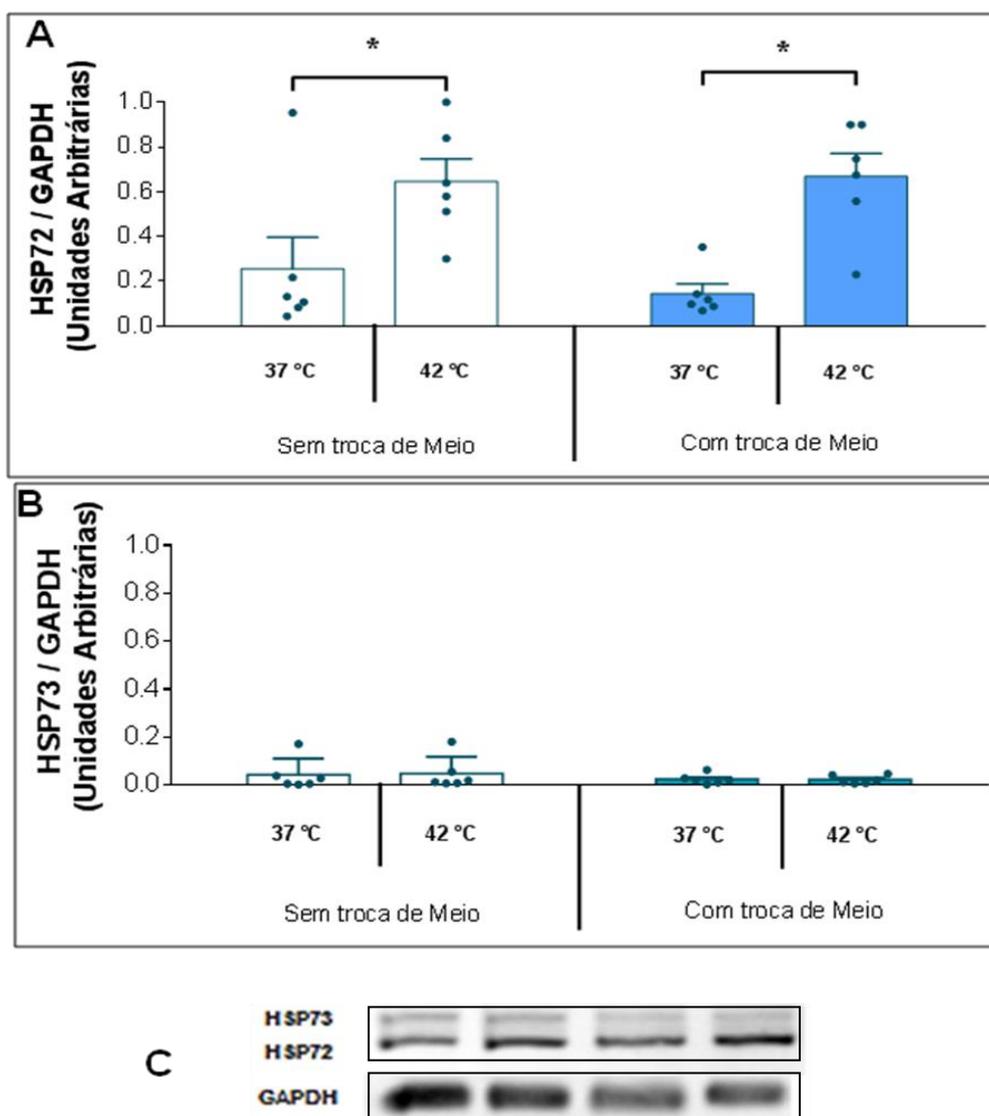


Figura 59: Resposta ao desafio térmico de sangue total incubado a 37 °C ou 42 °C em camundongos C57BL/6J machos mantidos em jejum por 10 h. A: Imunodeteção de HSP72 normalizada por GAPDH. B: Imunodeteção de HSP73 normalizada por GAPDH. C: Imagem representativa da imunodeteção. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas e *post hoc* Tukey.

4.4 Discussão

A parte III deste trabalho foi desenvolvida de maneira a complementar os resultados obtidos nas duas primeiras partes, nas quais não houve aumento da expressão de HSP70, nas células do sangue total, induzido pela incubação de apenas 1 h a 42 °C. E, como principal resultado, tem-se que o tempo necessário de incubação nesta temperatura para que ocorra a visualização da ativação da HSR foi o de 2 h. Inicialmente, optou-se pela realização do primeiro protocolo, pela conservação da resposta em monócitos. Foi mostrado que entre as células mononucleares (monócitos e linfócitos) ocorre uma diferença de sensibilidade ao estresse térmico e conteúdo basal de HSP70 (BOYKO; AZHIKINA; STRELTSOVA; SAPOZHNIKOV *et al.*, 2017). Monócitos incubados por 2 h têm uma melhor resposta entre 39 °C e 41 °C, enquanto linfócitos respondem melhor, em igual tempo, a 42 °C (OEHLER; PUSCH; ZELLNER; DUNGEL *et al.*, 2001). Acontece que aparentemente, os linfócitos, por estarem em maior proporção no sangue periférico, são os maiores responsáveis pelo aumento expressivo de HSP70 após o estresse térmico. Um estudo publicado utilizando células mononucleares periféricas demonstrou que o pico de expressão de conteúdo da HSP70 intracelular após incubação de 2 h, ocorria a 42 °C e não 39 °C (HUNTER-LAVIN; DAVIES; BACELAR; MARSHALL *et al.*, 2004). Estes achados corroboram os resultados obtidos com técnicas semelhantes propostas por outros grupos de pesquisa. Por exemplo, um trabalho comparou o aumento de HSP70 em células mononucleares quando incubadas por 1 h a 40 °C ou 43 °C, sendo que apenas o segundo demonstrou aumento significativo da HSP70 intracelular (LANCASTER; FEBBRAIO, 2005). Outro estudo publicado utilizando a incubação de sangue total para a visualização da liberação de HSP70 pelas células circulantes também utilizou 2 h a 42 °C e obteve êxito (DE LEMOS MULLER; RECH; BOTTON; SCHROEDER *et al.*, 2018; LANCASTER; FEBBRAIO, 2005). Estes dados indicam que, para incubações de sangue total por 1 h, a temperatura deveria ser maior; já incubações por 2 h a 42 °C parecem ser o suficiente.

Outro resultado interessante, embora esperado, foi a necessidade de jejum para que seja visualizado o aumento da HSP70 frente à estimulação da hipertermia. O jejum por si só é um estímulo estressor, o que faz sentido potencializar a HSR, por isso, é possível que a resposta tenha sido somada pelos estímulos estressores. No jejum temos vias ativas que aumentam a atividade da AMPK, que está relacionada com o aumento da atividade da SIRT1 (CANTÓ; GERHART-HINES; FEIGE; LAGOUGE *et al.*, 2009) que é necessária para que ocorra ativação do HSF1 e posterior indução da HSP70 (WESTERHEIDE; ANCKAR; STEVENS; SISTONEN *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que a produção e liberação para o plasma de HSP72 induzida por outro agente estressor, o exercício físico, é praticamente 100 % abolida se os voluntários ingerirem glicose (FEBBRAIO; MESA; CHUNG; STEENSBERG *et al.*, 2004).

Por sua vez, o teste 2 foi realizado para checar-se a possibilidade de interferência de citocinas liberadas para o meio em decorrência do choque térmico a que as células foram submetidas. Inclusive, a própria HSP70 é liberada para o meio extracelular (HIGHTOWER; GUIDON JR, 1989) e age como citocina pró-inflamatória. Este conteúdo pró-inflamatório poderia – de forma aguda – exacerbar a resposta observada células no meio de cultura após o desafio térmico, no tempo de incubação para indução da expressão de HSP70. Porém, não foi o que ocorreu.

5. Discussão Final

Quando reunidos os resultados das partes I e II deste trabalho, observa-se que a proposta de acompanhamento temporal do desenvolvimento da IR revelou um efeito do envelhecimento na piora nos parâmetros de sensibilidade a insulina, HOMA IR e proteínas da via de choque térmico. Animais tratados com NC por 22 semanas mostravam aumento nestes índices quando comparados aos animais de mesma dieta por apenas 10 semanas. Ainda mais, estes animais quando submetidos à terapia hipertérmica mostraram melhora destes parâmetros, sugerindo uma recuperação metabólica destes quando mantidos por maiores períodos de vida nas condições do biotério. Para entender com mais clareza o que estes tempos representam na vida destes animais, é preciso traçar um paralelo com os seres humanos. Propõe-se que nove dias na vida de um camundongo equivalham a um ano de vida do ser humano (DUTTA; SENGUPTA, 2016). Assim, os grupos T10 com 13 semanas de vida equivaleriam a um humano com 35 anos; T14 com 17 semanas de vida a um humano com 46 anos; T18 com 21 semanas de vida um humano com 56 anos; T22 com 25 semanas de vida a um humano com 67 anos. Tendo em vista que estes animais encontram-se confinados em um espaço restrito, com pouca atividade física e com livre acesso ao alimento ao longo da sua vida, começamos a compreender que os controles que vimos empregando durante anos podem ser, na verdade, animais doentes. Por isso, estamos dando continuidade a esses estudos com enfoque especial ao que ocorre com os animais controles. Em outras palavras, quando os controles passam a ter um quadro metabólico-inflamatório típico da resistência à insulina? A grande questão que persiste ao olhar o conjunto de resultados aqui expostos é: como os animais do grupo HFD, com aumento de peso e de tecido adiposo visceral, podem responder de forma semelhante a animais mantidos com dieta padrão de laboratório?

Muito se discute sobre a capacidade de transporem-se os resultados encontrados a partir de animais que não são mantidos em condições de acordo com a sua fisiologia. Primeiramente, por uma pura questão metabólica, entende-se que os animais são submetidos a constante estresse térmico em biotérios mantidos aquém da sua termoneutralidade que seria por volta de 30 °C. Os animais do presente trabalho foram mantidos em um ambiente a 25 °C, para que seus ninhos ficassem próximos de 28 °C, o que aparentemente ainda não é o ideal. Estudos têm mostrado uma grande diferença na resposta metabólica de animais mantidos a 30 °C frente a outras temperaturas (MALONEY; FULLER; MITCHELL; GORDON *et al.*, 2014). Um estudo demonstrou, com base no cálculo da atividade metabólica basal, que o gasto energético do camundongo só se assemelha ao do humano quando mantido na sua termoneutralidade (FISCHER; CANNON; NEDERGAARD, 2018). Ainda, as temperaturas abaixo da termoneutralidade têm se mostrado protetoras ao desenvolvimento da obesidade (LODHI; SEMENKOVICH, 2009). A eficiência metabólica dos animais NC ter sido igual aos HFD ao longo das semanas,

embora o segundo grupo ainda tenha tido ganho de peso superior, sugere um desbalanço metabólico nestes animais. Um trabalho utilizando camundongos *nocaut* para a UCP1 demonstrou que, apenas na sua termoneutralidade, a ausência da proteína desacopladora seria capaz de produzir obesidade espontânea (FELDMANN; GOLOZOUBOVA; CANNON; NEDERGAARD, 2009). Em outro caso camundongos C57BL/6J tratados com HFD mantidos a 30 °C apresentaram maior resistência à insulina quando comparados aos mesmos animais tratados a 25, 20 e 15 °C (DUDELE; RASMUSSEN; MAYNTZ; MALTE *et al.*, 2015). Possivelmente, os animais HFD acompanhados neste trabalho sofreram menos efeito da dieta, incluindo índices de IR frente ao NC de mesmo tempo, por não terem sido mantidos na sua temperatura termoneutra. Essa possibilidade está sendo investigada em um novo projeto de pesquisa proposto por nosso grupo que se encontra em fase de aprovação na CEUA/UFRGS.

Outro ponto importante levantado neste trabalho foi o uso de uma ferramenta de avaliação da HSR em modelos animais com vistas à comparação da resposta ao desafio térmico com o estado metabólico e resistência à insulina. Alguns resultados com humanos já estão sendo obtidos em nosso laboratório. Porém os resultados observados nas duas primeiras partes não foram conclusivos, por uma ausência de aumento da HSP70 no desafio térmico. A parte III se encaixa, neste contexto, corroborando que pode ter havido falha técnica relacionada ao tempo insuficiente (1 h) para desafio térmico empregado. Esperamos que, ao final dos estudos complementares que estamos realizando, possamos propor um protocolo para ser empregado em avaliações metabólicas relacionadas à obesidade e resistência à insulina num futuro próximo.

6. Conclusões

I - Podemos concluir que os animais acompanhados ao longo de 10, 14, 18 e 22 semanas de tratamento mostraram uma piora progressiva dos índices de sensibilidade à insulina independentemente da dieta.

II – O tratamento térmico de corpo inteiro foi capaz de reverter parcialmente a piora dos índices glicêmicos observados nos animais acompanhados por maiores tempos com 8 sessões de choque térmico semanais, mas não quando realizadas apenas 4.

III – Para o uso da técnica de desafio térmico em sangue total, deve-se utilizar a incubação por 2 h e os animais devem estar em jejum, podendo ser utilizada independentemente do sexo.

7. Perspectivas

- Aumentar o n amostral, principalmente dos animais submetidos a tratamento térmico, visto que o número de animais foi insuficiente para algumas análises;

- Realizar as mesmas análises em animais mantidos em tratamento por menos tempo (recém desmamados, 1, 4 e 8 semanas de dieta), para verificar o a quadro observado em animais mais jovens;

- Repetir os mesmos grupos para realizar a técnica de desafio térmico em sangue total por 2 h a 42°C, para visualizar a resposta da via de choque térmico incubada corretamente;

- Analisar HuR no fígado, tecido adiposo e músculo, para analisar todos os componentes da via de choque térmico;

- Realizar a avaliação do conteúdo de HSF1 e SIR1 nos tecidos musculares, para verificar a expressão dos outros componentes da via de choque térmico;

- Realizar a análise microscópica da senescencia proliferativa do tecido adiposo;

- Avaliar o conteúdo de NLRP3 no tecido adiposo por imuno-histoquímica;

- Realizar microscopia eletrônica para quantificação do número de mitocôndrias nos tecidos metabólicos, comparando-se animais submetidos ao tratamento hipertérmico com os mantidos à temperatura ambiente.

8. Referências

- ABDELMOHSEN, K.; PULLMANN JR, R.; LAL, A.; KIM, H. H. *et al.* Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. **Molecular cell**, 25, n. 4, p. 543-557, 2007.
- ARCHER, A. E.; VON SCHULZE, A. T.; GEIGER, P. C. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 373, n. 1738, p. 20160529, 2017.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, 40, n. 4, p. 527-528, Apr 1968.
- BETANZOS-CABRERA, G.; ESTRADA-LUNA, D.; BELEFANT-MILLER, H.; CANCINO-DIAZ, J. Mice fed with a high fat diet show a decrease in the expression of" toll like receptor (TLR) 2 and TLR6 mRNAs in adipose and hepatic tissues. **Nutricion hospitalaria**, 27, n. 4, p. 1196-1203, 2012.
- BIDEN, T. J.; BOSLEM, E.; CHU, K. Y.; SUE, N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. **Trends Endocrinol Metab**, 25, n. 8, p. 389-398, Aug 2014.
- BOCK, P. M.; KRAUSE, M.; SCHROEDER, H. T.; HAHN, G. F. *et al.* Oral supplementations with L-glutamine or L-alanyl-L-glutamine do not change metabolic alterations induced by long-term high-fat diet in the B6. 129F2/J mouse model of insulin resistance. **Molecular and cellular biochemistry**, 411, n. 1-2, p. 351-362, 2016.
- BOYKO, A. A.; AZHIKINA, T. L.; STRELTSOVA, M. A.; SAPOZHNIKOV, A. M. *et al.* HSP70 in human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes: comparison of the protein content and transcriptional activity of HSPA genes. **Cell Stress Chaperones**, 22, n. 1, p. 67-76, 01 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRODMERKEL, D. W.; TAYLOR, J. A. Passive heat therapy: a ready route to vascular health? **J Physiol**, 594, n. 18, p. 5039-5040, 09 2016.
- BRUXEL, M. A.; TAVARES, A. M. V.; ZAVARIZE NETO, L. D.; DE SOUZA BORGES, V. *et al.* Chronic whole-body heat treatment relieves atherosclerotic lesions, cardiovascular and metabolic abnormalities, and enhances survival time restoring the anti-inflammatory and anti-senescent heat shock response in mice. **Biochimie**, 156, p. 33-46, Jan 2019.
- CALAPRE, L.; GRAY, E. S.; ZIMAN, M. Heat stress: a risk factor for skin carcinogenesis. **Cancer Lett**, 337, n. 1, p. 35-40, Aug 2013.

- CANTÓ, C.; GERHART-HINES, Z.; FEIGE, J. N.; LAGOUGE, M. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, 458, n. 7241, p. 1056, 2009.
- CARICILLI, A. M.; SAAD, M. J. The role of gut microbiota on insulin resistance. **Nutrients**, 5, n. 3, p. 829-851, Mar 2013.
- CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G. *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 5, p. 1739-1744, Feb 2008.
- CNOP, M.; FOUFELLE, F.; VELLOSO, L. A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. **Trends Mol Med**, 18, n. 1, p. 59-68, Jan 2012.
- CORKEY, B. E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? **Diabetes**, 61, n. 1, p. 4-13, 2012.
- CRUZAT, V. F.; PANTALEÃO, L. C.; DONATO, J.; DE BITTENCOURT, P. I. *et al.* Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. **J Nutr Biochem**, 25, n. 3, p. 345-352, Mar 2014.
- DE LEMOS MULLER, C. H.; DE MATOS, J. R.; GRIGOLO, G. B.; SCHROEDER, H. T. *et al.* Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role for HSP70. **Journal of Science in Sport and Exercise**, 1, n. 2, p. 97-115, August 01 2019. journal article.
- DE LEMOS MULLER, C. H.; RECH, A.; BOTTON, C. E.; SCHROEDER, H. T. *et al.* Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training. **Exp Gerontol**, 111, p. 180-187, 10 2018.
- DI NASO, F. C.; PORTO, R. R.; FILLMANN, H. S.; MAGGIONI, L. *et al.* Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. **Obesity (Silver Spring)**, 23, n. 1, p. 120-129, Jan 2015.
- DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 20, p. 9363-9367, Sep 1995.
- DUDELE, A.; RASMUSSEN, G. M.; MAYNTZ, D.; MALTE, H. *et al.* Effects of ambient temperature on glucose tolerance and insulin sensitivity test outcomes in normal and obese C57 male mice. **Physiological reports**, 3, n. 5, p. e12396, 2015.
- DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: relating their ages. **Life sciences**, 152, p. 244-248, 2016.
- FEBBRAIO, M. A.; MESA, J. L.; CHUNG, J.; STEENSBERG, 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**, 9, n. 4, p. 390-396, 2004.

FELDMANN, H. M.; GOLOZOUBOVA, V.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell metabolism**, 9, n. 2, p. 203-209, 2009.

FINUCANE, O. M.; LYONS, C. L.; MURPHY, A. M.; REYNOLDS, C. M. *et al.* Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, 64, n. 6, p. 2116-2128, 2015.

FISCHER, A. W.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. **Molecular metabolism**, 7, p. 161-170, 2018.

GAZOLA, V.; GARCIA, R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. *et al.* Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, 25, n. 2, p. 211-216, 2007.

GEIGER, P. C.; GUPTA, A. A. Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity. **Exerc Sport Sci Rev**, 39, n. 1, p. 34-42, Jan 2011.

GENUTH, S. M.; PRZYBYLSKI, R. J.; ROSENBERG, D. M. Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. **Endocrinology**, 88, n. 5, p. 1230-1238, 1971.

GOMBOS, I.; CRUL, T.; PIOTTO, S.; GÜNGÖR, B. *et al.* Membrane-lipid therapy in operation: the HSP co-inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts. **PLoS One**, 6, n. 12, p. e28818, 2011.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, 29, p. 415-445, 2011.

GUPTA, A. A.; BOMHOFF, G. L.; SWERDLOW, R. H.; GEIGER, P. C. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Diabetes**, 58, n. 3, p. 567-578, Mar 2009.

HENSTRIDGE, D. C.; BRUCE, C. R.; DREW, B. G.; TORY, K. *et al.* Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. **Diabetes**, 63, n. 6, p. 1881-1894, Jun 2014.

HIGHTOWER, L. E.; GUIDON JR, P. T. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. **Journal of cellular physiology**, 138, n. 2, p. 257-266, 1989.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C. Z. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, 420, n. 6913, p. 333-336, Nov 2002.

- HOMEM DE BITTENCOURT, P. I.; NEWSHOLME, P. You, your children, your grandchildren, and their inflammatory responses are what you eat. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 18, n. 4, p. 325-327, Jul 2015.
- HOOPER, P. L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, 341, n. 12, p. 924-925, Sep 1999.
- HOOPER, P. L.; BALOGH, G.; RIVAS, E.; KAVANAGH, K. *et al.* The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell Stress Chaperones**, 19, n. 4, p. 447-464, Jul 2014.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. **Nat Med**, 16, n. 4, p. 396-399, Apr 2010.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, 95, n. 5, p. 2409-2415, May 1995.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, 271, n. 5249, p. 665-668, Feb 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1993.
- HUNTER-LAVIN, C.; DAVIES, E. L.; BACELAR, M. M.; MARSHALL, M. J. *et al.* Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 324, n. 2, p. 511-517, 2004.
- KARPE, P. A.; TIKOO, K. Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. **Diabetes**, 63, n. 3, p. 1124-1139, Mar 2014.
- KAVANAGH, K.; WYLIE, A. T.; CHAVANNE, T. J.; JORGENSEN, M. J. *et al.* Aging does not reduce heat shock protein 70 in the absence of chronic insulin resistance. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, 67, n. 10, p. 1014-1021, 2012.
- KIM, G.; MERIIN, A. B.; GABAI, V. L.; CHRISTIANS, E. *et al.* The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. **Ageing cell**, 11, n. 4, p. 617-627, 2012.
- KITADA, M.; KOYA, D. SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Diabetes Metab J**, 37, n. 5, p. 315-325, Oct 2013.
- KOREN, M. J.; DEVEREUX, R. B.; CASALE, P. N.; SAVAGE, D. D. *et al.* Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. **Annals of internal medicine**, 114, n. 5, p. 345-352, 1991.

KRAUSE, M.; LUDWIG, M. S.; HECK, T. G.; TAKAHASHI, H. K. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 18, n. 4, p. 374-380, Jul 2015.

KURUCZ, I.; MORVA, A.; VAAG, A.; ERIKSSON, K. F. *et al.* Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. **Diabetes**, 51, n. 4, p. 1102-1109, Apr 2002.

LANCASTER, G. I.; FEBBRAIO, M. A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. **J Biol Chem**, 280, n. 24, p. 23349-23355, Jun 2005.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, 89, n. 1, p. 24-33, 1929.

LEITE, J. S. M.; RAIZEL, R.; HYPÓLITO, T. M.; ROSA, T. D. S. *et al.* L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 41, n. 8, p. 842-849, 2016.

LEVIN, T. C.; WICKLIFFE, K. E.; LEPPLA, S. H.; MOAYERI, M. Heat shock inhibits caspase-1 activity while also preventing its inflammasome-mediated activation by anthrax lethal toxin. **Cell Microbiol**, 10, n. 12, p. 2434-2446, Dec 2008.

LI, G. C.; WERB, Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79, n. 10, p. 3218-3222, May 1982.

LODHI, I. J.; SEMENKOVICH, C. F. Why we should put clothes on mice. **Cell metabolism**, 9, n. 2, p. 111-112, 2009.

MACDOUGALD, O. A. Methods in Enzymology. Methods of adipose tissue biology, part B. Preface. **Methods in enzymology**, 538, p. xv, 2014.

MACFARLANE, T. V. Sample size determination for research projects. SAGE Publications Sage UK: London, England 2003.

MALONEY, S. K.; FULLER, A.; MITCHELL, D.; GORDON, C. *et al.* Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? **Physiology (Bethesda)**, 29, n. 6, p. 413-420, Nov 2014.

MARTÍNEZ DE TODA, I.; DE LA FUENTE, M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. **Biogerontology**, 16, n. 6, p. 709-721, Dec 2015.

MATTHEWS, D.; HOSKER, J.; RUDENSKI, A.; TURNER, R. Homeostatic model assessment (HOMA). Measurement of insulin resistance and beta-cell deficit in man. **Diabetologia**, 28, p. 412-419, 1985.

MEHRAN, A. E.; TEMPLEMAN, N. M.; BRIGIDI, G. S.; LIM, G. E. *et al.* Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. **Cell metabolism**, 16, n. 6, p. 723-737, 2012.

MINAMINO, T.; ORIMO, M.; SHIMIZU, I.; KUNIEDA, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. **Nature medicine**, 15, n. 9, p. 1082, 2009.

MIRAGEM, A. A.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flushes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response. **Hum Reprod Update**, 23, n. 5, p. 600-628, 09 2017.

MUIESAN, M. L.; SALVETTI, M.; RIZZONI, D.; CASTELLANO, M. *et al.* Association of change in left ventricular mass with prognosis during long-term antihypertensive treatment. **Journal of hypertension**, 13, n. 10, p. 1091-1095, 1995.

NAGAREDDY, P. R.; KRAAKMAN, M.; MASTERS, S. L.; STIRZAKER, R. A. *et al.* Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. **Cell metabolism**, 19, n. 5, p. 821-835, 2014.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT, P. I. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 17, n. 4, p. 295-305, Jul 2014.

NEWSHOLME, P.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. Gut associated bacteria are critical to metabolism, inflammation and health. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 19, n. 4, p. 245-249, 07 2016.

NJEMINI, R.; ABEELE, M. V.; DEMANET, C.; LAMBERT, M. *et al.* Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. **J Clin Immunol**, 22, n. 4, p. 195-205, Jul 2002.

OEHLER, R.; PUSCH, E.; ZELLNER, M.; DUNGEL, P. *et al.* Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia. **Cell Stress Chaperones**, 6, n. 4, p. 306-315, Oct 2001.

OLIVEIRA-YAMASHITA, F.; GARCIA, R. F.; FELISBERTO-JUNIOR, A. M.; CURI, R. *et al.* Evidence that L-glutamine is better than L-alanine as gluconeogenic substrate in perfused liver of weaned fasted rats submitted to short-term insulin-induced hypoglycaemia. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, 27, n. 1, p. 30-34, 2009.

ORGANIZATION, W. H. Obesity and overweight. Media centre: WHO. 311 2016.

OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A. H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, 306, n. 5695, p. 457-461, Oct 2004.

PETRY, E. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; DE BITTENCOURT, P. I. H. *et al.* L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, 25, n. 2, p. 188-197, 2015.

PETRY, É. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; LEITE, J. S. M. *et al.* Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. **Life sciences**, 94, n. 2, p. 130-136, 2014.

RADA, A.; TONINO, P.; ANSELMINI, G.; STRAUSS, M. Is hypothermia a stress condition in HepG2 cells? Expression and localization of Hsp70 in human hepatoma cell line. **Tissue Cell**, 37, n. 1, p. 59-65, Feb 2005.

RAO, D. V.; WATSON, K.; JONES, G. L. Age-related attenuation in the expression of the major heat shock proteins in human peripheral lymphocytes. **Mechanisms of ageing and development**, 107, n. 1, p. 105-118, 1999.

RINGLING, R. E.; GASTECKI, M. L.; WOODFORD, M. L.; LUM-NAIHE, K. J. *et al.* Loss of Nlrp3 does not protect mice from Western diet-induced adipose tissue inflammation and glucose intolerance. **PloS one**, 11, n. 9, p. e0161939, 2016.

RIUS, B.; LÓPEZ-VICARIO, C.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; MORÁN-SALVADOR, E. *et al.* Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. **Front Immunol**, 3, p. 257, 2012.

RODRIGUES-KRAUSE, J.; KRAUSE, M.; O'HAGAN, C.; DE VITO, G. *et al.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? **Cell Stress Chaperones**, 17, n. 3, p. 293-302, May 2012.

SINGH, I. S.; HASDAY, J. D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. **Int J Hyperthermia**, 29, n. 5, p. 423-435, Aug 2013.

SOUKAS, A.; COHEN, P.; SOCCI, N. D.; FRIEDMAN, J. M. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. **Genes Dev**, 14, n. 8, p. 963-980, Apr 2000.

SUN, C.; ZHANG, F.; GE, X.; YAN, T. *et al.* SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. **Cell metabolism**, 6, n. 4, p. 307-319, 2007.

TALWAR, S.; JIN, J.; CARROLL, B.; LIU, A. *et al.* Caspase-mediated cleavage of RNA-binding protein HuR regulates c-Myc protein expression after hypoxic stress. **Journal of Biological Chemistry**, 286, n. 37, p. 32333-32343, 2011.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of clinical investigation**, 117, n. 2, p. 289-296, 2007.

WESTERHEIDE, S. D.; ANCKAR, J.; STEVENS, S. M.; SISTONEN, L. *et al.* Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. **Science**, 323, n. 5917, p. 1063-1066, 2009.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, 53, n. suppl 3, p. S215-S219, 2004.

WOLEVER, T. M. **The glycaemic index: a physiological classification of dietary carbohydrate**. Cabi, 2006. 1845930517.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, 112, n. 12, p. 1821-1830, Dec 2003.