



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Sidney de Figueiredo Peres

**Papel do treinamento físico sobre a UPRmt na musculatura
esquelética de camundongos obesos**

Limeira
2022



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Sidney de Figueiredo Peres

Papel do treinamento físico sobre a UPRmt na musculatura esquelética de camundongos obesos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências do Esporte à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo R. Ropelle

Limeira
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

P415p Peres, Sidney de Figueiredo, 1999-
Papel do treinamento físico sobre a *UPRmt* na musculatura esquelética de camundongos obesos / Sidney de Figueiredo Peres. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Coorientador: Renata Rosseto Braga.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Exercícios físicos. 2. Obesidade. 3. Músculo esquelético. 4. Mitocôndria. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Braga, Renata Rosseto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Role of physical training on UPRmt in skeletal muscle of obese mice

Palavras-chave em inglês:

Exercise

Obesity

Skeletal muscle

Mitochondria

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

Barbara Moreira Crisol

Data de entrega do trabalho definitivo: 14-12-2022

Autor: Sidney de Figueiredo Peres

Título: Papel do treinamento físico sobre a UPRmt na musculatura esquelética de camundongos obesos.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte

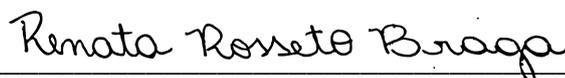
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 14/12/2022.

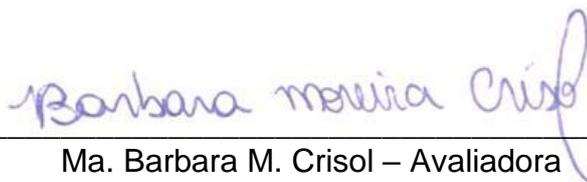
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo R. Ropelle – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Renata R. Braga – Coorientadora
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Ma. Barbara M. Crisol – Avaliadora
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Prof. Dr. Eduardo R. Ropelle
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

À minha querida família, que tanto
admiro, dedico o resultado do
esforço realizado ao longo
deste percurso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Sidnei e Maria de Fátima, minha irmã, Letícia, e minha família, que são a base da minha vida, forneceram todo apoio que precisei e me acompanharam em todo esse processo. Eles me motivam me fazendo seguir buscando sempre mais.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de faculdade por todo suporte, e principalmente aos meus amigos Brendon, Lucas, Rodrigo, por me acompanharem ao longo de todo o processo e serem fundamentais. Evidentemente é uma amizade para a vida toda.

Gostaria de agradecer a todos os professores da graduação, que foram fundamentais e contribuíram na minha formação como cientista do esporte, contribuindo na minha percepção sobre o mundo, ensinando também além dos conhecimentos técnicos, muito sobre ética e profissionalismo, mostrando vasto conhecimento na área.

Gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e à Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp (FCA) – em nome de seus inúmeros profissionais que são responsáveis por manter este ambiente funcionando (seguranças, funcionários da limpeza, do restaurante universitário, bibliotecários, entre outros), mesmo nestes tempos difíceis que passamos na pandemia, frente a todas dificuldades e perdas. Agradecer pela estrutura e apoio fornecido para a realização dos estudos, reuniões, aulas e experimentos que auxiliaram no meu processo de formação e no presente trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do LABMEX, com os quais aprendi muito, além do conhecimento sobre as técnicas de laboratório, mas também em questões como companheirismo, cooperação e proatividade. Agradeço também ao meu orientador Eduardo Ropelle pela oportunidade e por todo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim gostaria de agradecer também a agência de fomento FAPESP (processo número 2022/00388-8) pelo auxílio a pesquisa durante meu período de estudos durante a iniciação científica.

*“Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para a sua
própria produção ou a sua construção.”
(Paulo Freire)*

Peres, Sidney de Figueiredo. Papel do treinamento físico sobre a UPRmt na musculatura esquelética de camundongos obesos. 2022. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte.) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2022.

RESUMO

Introdução: A obesidade está intimamente ligada com a disfunção mitocondrial, inflamação, resistência à insulina e com desenvolvimento de outras desordens e doenças metabólicas. Estudos apontam que alterações na função mitocondrial é um fator chave na regulação de doenças metabólicas, como a obesidade e diabetes. Por outro lado, o exercício físico tem sido associado com mecanismos de reparo das mitocôndrias, incluindo a UPRmt (*mitochondrial unfolded protein response*), podendo recuperar a função mitocondrial e ser uma alternativa promissora na prevenção e tratamento da obesidade, diabetes e outras metabólicas. **Objetivo:** Avaliar o efeito do exercício físico aeróbio sobre marcadores da UPRmt no tecido muscular de camundongos obesos. **Métodos:** Camundongos swiss foram distribuídos em 3 grupos: controle, HFD (obeso) e HFD TR (treinado). Nas últimas semanas, o grupo obeso treinado foi submetido ao protocolo de exercício físico aeróbio por 4 semanas. No final do protocolo, os animais foram eutanasiados e amostras do músculo esquelético foram analisadas. **Resultados:** Foi observada melhora considerável de aspectos da fisiologia geral e na musculatura esquelética. Houve também aumento no conteúdo de marcadores da UPRmt (LONP1, YME1L1 e HSP60) e no conteúdo de alguns marcadores da CTE (cadeia transportadora de elétrons) no músculo esquelético. **Conclusão:** O exercício físico foi efetivo em recuperar prejuízos do consumo de dieta hiperlipídica onde o mecanismo de UPRmt na musculatura esquelética foi desencadeado e houve também o aumento de proteínas da CTE.

Palavras-chave: UPRmt. Exercício físico. Músculo. Mitocôndria. Obesidade.

Peres, Sidney de Figueiredo. Role of physical training on UPRmt in skeletal muscle of obese mice. 2022. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte.) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is linked to mitochondrial dysfunction, inflammation, insulin resistance and the development of other disorders and metabolic diseases. Studies point out that changes in mitochondrial function is a key factor in the regulation of metabolic diseases such as obesity and diabetes. On the other hand, physical exercise has been associated with mitochondrial repair mechanisms, including UPRmt (mitochondrial unfolded protein response), which may recover mitochondrial function, and may be a promising alternative in the prevention and treatment of obesity, diabetes and metabolic disorders. **Objective:** Therefore, the objective of this project was to evaluate the effect of aerobic exercise on UPRmt markers in the skeletal muscle tissue of obese mice. **Methods:** Swiss mice were distributed into 3 groups: control, received a standard diet, HFD and HFD TR, received a high-fat diet for 12 weeks. In recent weeks, the trained obese group was submitted to an aerobic physical exercise protocol for 4 weeks. At the end of the protocol, the animals were euthanized and skeletal muscle samples were analyzed. **Results:** Considerable improvement was observed in aspects of general physiology and skeletal muscle. There was also an increase in the content of UPRmt markers (LONP1, YME1L1 and HSP60) and in the content of some ETC (electron transport chain) markers in skeletal muscle. **Conclusion:** Physical exercise was effective in recovering losses from high-fat diet consumption where the UPRmt mechanism in the skeletal muscles was triggered and there was also an increase in ETC proteins.

Keywords: UPRmt. Physical exercise. Muscle. Mitochondria. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Figura esquemática simplificada da sinalização da UPRmt e do desequilíbrio mitonuclear.....	16
Figura 2	Efeito do exercício físico sobre o metabolismo em camundongos obesos.....	24
Figura 3	Efeito do exercício físico sobre marcadores da UPRmt no músculo de camundongos obesos.....	25
Figura 4	Análise da cadeia transportadora de elétrons na musculatura esquelética de camundongos alimentados com HFD submetidos ao exercício físico.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
ATP	Adenosina trifosfato
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation system</i>
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
UPRmt	<i>Mitochondrial unfolded protein response</i>
ClpP	<i>Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DNA_n	Ácido desoxirribonucleico nuclear
DNA_{mt}	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
MTCO1	<i>Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase 1</i>
SDHA	Succinato desidrogenase subunidade A
ATP5A	<i>ATP synthase F1 subunit alpha</i>
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15
LONP1	<i>Lon protease homolog, mitochondrial</i>
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
YME1L1	<i>YME1 Like 1 ATPase</i>
UQCRC2	<i>Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 2</i>
SDHB	Succinato desidrogenase subunidade B
NDUF8b	<i>NADH Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
1.1	O que são as mitocôndrias?.....	13
1.2	Sistemas de controle de qualidade mitocondrial.....	14
1.3	O desequilíbrio mitonuclear e a UPR mitocondrial.....	15
1.4	Potencial dos estudos sobre a UPRmt no contexto do exercício físico.	18
2.	Hipótese.....	18
3.	Justificativa.....	19
4.	Objetivos.....	19
4.1	Objetivo geral.....	19
4.2	Objetivos específicos.....	19
5.	Materiais e métodos.....	20
5.1	Animais.....	20
5.2	Protocolo de Exercício Físico.....	20
5.3	Reagentes e anticorpos.....	20
5.4	Procedimentos de extração.....	21
5.5	Análise proteica por Western blotting.....	21
5.6	Análise Estatística.....	22
6.	Resultados e discussão.....	22
7.	Conclusão.....	26
	Referências.....	27
	Anexo A.....	30

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, em 2003 (há 19 anos) quatro em cada dez brasileiros apresentavam excesso de peso, contudo, em 2019, esses números saltaram para seis em cada dez brasileiros, totalizando aproximadamente 96 milhões de pessoas estão acima do peso no país. Tendo a população adulta como foco, foi possível observar que a prevalência da obesidade mais do que dobrou nesse mesmo período, aumentando de 14,0% para 29,5% para as mulheres, e de 9,3% para 21,8% para os homens (FERREIRA; SZWARCOWALD; DAMACENA, 2019).

De maneira geral, podemos definir a obesidade como o acúmulo excessivo ou distribuição anormal de gordura corporal, afetando a saúde. É classificado principalmente pelo índice de massa corporal (MAYORAL et al., 2020) (IMC, em Kg/m^2), quando o IMC é de 25-29,9 Kg/m^2 , pode ser considerado sobrepeso, quando é maior que 30 Kg/m^2 , é considerado como obesidade.

A obesidade tem sido considerada por alguns autores como principal fator de risco para doenças como doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios metabólicos e neurodegenerativos (IKEZAKI et al., 2021; WANG, 2021). Neste contexto, a mitocôndria tem ganhado especial atenção por parte da comunidade científica, pois diversas pesquisas tem tentado entender o papel da disfunção mitocondrial no desenvolvimento da obesidade e doenças correlacionadas (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Essa disfunção ocorre, ao menos em parte, por conta de reduções na capacidade de fosforilação oxidativa, contribuindo para que ocorra alterações no metabolismo intercelular de lipídios, contribuindo com a maior incidência de resistência à insulina e de diabetes tipo 2 (PETERSEN et al., 2003).

O exercício físico tem sido discutido como estratégia terapêutica, não-farmacológica, capaz de aumentar a atividade mitocondrial (EGAN; ZIERATH, 2013; GAN et al., 2018; RUEGSEGGER; BOOTH, 2018), principalmente na musculatura esquelética. Tendo em vista tais pontos expostos, entende-se de que é necessário aprofundar os conhecimentos relacionados aos diversos mecanismos envolvidos na regulação das mitocôndrias na musculatura esquelética de pacientes obesos e o impacto do exercício físico sobre elas.

1.1 O que são as mitocôndrias?

Segundo a teoria endossimbiótica, acredita-se que as mitocôndrias eram organismos procariontes, semelhante a bactérias, que viviam de modo livre. Até o momento que essas estruturas foram englobadas, por células eucarióticas por meio de endocitose, o que resultou em uma relação simbiótica, em que ambos os envolvidos eram beneficiados com a associação (GRAY; BURGER; FRANZ LANG, 2001; WALLIN, 1993).

A vantagem de se manter uma proteobactéria incorporada com parte de suas estruturas mantidas, especialmente no caso da mitocôndria, pode ter sido pela sua função de ser capaz de produzir energia, advinda do trifosfato de adenosina (ATP). As mitocôndrias possuem um maquinário enzimático capaz de produzir ATP por meio da fosforilação oxidativa (OxPhos), que é uma via metabólica na qual utiliza energia libertada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir ATP, sendo então o sítio primário do processamento metabólico de organismos mais simples, unicelulares. Portanto, esta organela tem um importante papel no que se trata à manutenção da homeostase celular, devido a sua produção energética como outras funções (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012).

Doenças metabólicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade, podem alterar a homeostase celular, alterando o funcionamento da mitocôndria, que estão intimamente associadas à alteração da expressão gênica envolvida na OxPhos. O músculo esquelético de pacientes com DM2 mostrou uma diminuição na expressão de um conjunto global de genes de componentes da OxPhos (MOOTHA et al., 2003; SREEKUMAR et al., 2002). A dieta rica em gordura diminui a expressão dos genes necessários para OxPhos, proteínas mitocondriais e biogênese mitocondrial em humanos e camundongos (SPARKS et al., 2005), apresentando uma taxa de atividade de OxPhos mitocondrial no músculo esquelético 30% menor em indivíduos resistentes à insulina em comparação com indivíduos do grupo controle (PETERSEN et al., 2009), reduzindo consideravelmente a capacidade oxidativa das células musculares. Embora o motivo da disfunção mitocondrial em obesos ainda seja alvo de muito debate na comunidade científica, parece não haver dúvidas perda da função mitocondrial em obesos. Nesse cenário, postula-se que a atenuação do mal

funcionamento da função OxPhos possa ser uma estratégia terapêutica útil para obesidade e resistência à insulina.

1.2 Sistemas de controle de qualidade mitocondrial

Frequentemente, as proteínas mitocondriais são expostas a diferentes tipos de estresse que podem alterar suas atividades e funcionalidade, comprometendo significativamente a atividade mitocondrial. Com a finalidade de manter a proteostase (homeostase proteica) e a função mitocondrial em resposta à diversos níveis de danos proteotóxico, as mitocôndrias possuem sofisticados mecanismos de controle de qualidade de suas proteínas (FISCHER; HAMANN; OSIEWACZ, 2012; FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; RUGARLI; LANGER, 2012). A grande maioria das proteínas mitocondriais é transcrita e traduzida no citoplasma, necessitando de um sistema de importação através da dupla membrana mitocondrial antes de serem devidamente dobradas e assumirem a forma em que funcionam na mitocôndria (HARBAUER et al., 2014).

As chaperonas mitocondriais são agentes importantes que medeiam esse sistema de importação, auxiliando no processo de transporte, dobramento e montagem dos complexos proteicos. Dentre elas, as chaperonas da família das proteínas de choque térmico (*heat shock protein*, Hsp), como a mtHsp70 e a Hsp60, são responsáveis por dobrar proteínas recém importadas ou redobrar as proteínas danificadas, que podem entrar em ação em condições de aumento do estresse proteotóxico mitocondrial, o que causa a resposta mitocondrial a proteínas mal formadas (UPRmt), que sinaliza o sistema chaperona mitocondrial (ALDRIDGE; HORIBE; HOOGENRAAD, 2007). Se alguma proteína apresentar danos Irreversíveis, proteases como a ClpP, presentes na matriz mitocondrial, garantem sua degradação (CAO; KAUFMAN, 2012). Há também várias enzimas importantes para atividades antioxidantes que contribuem indiretamente para a homeostase das proteínas contra Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)(ZHANG et al., 2022).

A proteína de choque térmico 60 (HSP60) foi bastante estudada e é estabelecida como um marcador da UPRmt induzido em camundongos(YI; CHANG; SHONG, 2018). A HSP60 é encontrada em menores quantidades no hipotálamo de

camundongos obesos ou diabético, o que está associada à resistência à insulina central e disfunção mitocondrial (YI; CHANG; SHONG, 2018). O papel da leptina na função mitocondrial e sensibilidade à insulina no hipotálamo é dependente de HSP60 mitocondrial, sugerindo que o sistema chaperona mitocondrial hipotalâmico tem um efeito importante na homeostase energética sistêmica na obesidade e doenças metabólicas (KLEINRIDDERS et al., 2013).

Portanto, conforme os estudos tem revelado, as mitocôndrias não agem como diferentes organelas isoladas, mas sim como uma rede conectada e cooperativa que passa constantemente por processos de remodelamento (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014). Processos de fissão e fusão regulam diversas proteínas nessa dinâmica. A fusão de uma mitocôndria saudável à uma com danos faz com que possa ocorrer um processo de substituição positivo ou de diluição destas organelas danificadas (CHAN, 2012). Por outro lado, a fissão promove a separação de mitocôndrias que apresentam disfunção, para que então ocorra a mitofagia (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). Os mecanismos citados podem também serem ativados de modo a reparar as proteínas mitocondriais bem como as próprias organelas, dependendo do nível de dano ocorrido. Em casos de danos irreversíveis, pode haver a apoptose (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014).

1.3 O desequilíbrio mitonuclear e a UPR mitocondrial

Como citado anteriormente, a mitocôndria pode passar repetidas vezes por diversos momentos de estresse, que podem alterar sua funcionalidade e/ou quantidade. Para se adaptar a este cenário, o desenvolvimento do sistema de controle de qualidade de proteínas, como já citado, foi essencial para manter a proteostase e a função mitocondrial, tendo em vista os diversos níveis de danos proteotóxicos, como por exemplo o acúmulo de proteínas no citoplasma, que é uma ameaça para a célula visto que o desbalanço proteico gerado caracteriza um estresse (CANTÓ et al., 2009, 2010; LIN et al., 2002).

Uma das respostas adaptativas ao estresse é a UPRmt, que é um mecanismo de controle que é interpretado pela célula e sinalizado para o núcleo com o principal objetivo de assegurar a integridade e função das proteínas mitocondriais

(HOWALD et al., 1985). A UPRmt aumenta a capacidade de dobramento de proteínas e ao mesmo tempo induz a redução da síntese pela célula, como forma de conter a agregação proteica ocasionada pelo quadro de estresse celular, além de melhorar a degradação de proteínas malformadas (CAO; KAUFMAN, 2012).

Conforme ocorre o desencadeamento da UPRmt, chaperonas (como a HSP60) e proteases mitocondriais (como a ClpP) são estimuladas pois são moléculas consideradas essenciais para a caracterização da UPRmt (HOWALD et al., 1985). Em alguns modelos animais, foi observado que a melhora de função e da capacidade oxidativa está relacionada à sinalização adaptativa no reparo mitocondrial, que também está relacionado a UPRmt (CANTÓ et al., 2012; HOUTKOOPEL; PIRINEN; AUWERX, 2012; PIRINEN et al., 2014), tendo implicações quando se pensa em distúrbios do seu funcionamento, que pode facilitar doenças metabólicas e neurodegenerativas.

Há alguns estudos mutagênicos que revelaram que mudanças no equilíbrio estequiométrico (mudança da razão DNAm_t e DNAn) entre as proteínas MTCO1, codificada pelo DNA mitocondrial (DNAm_t), e proteínas da cadeia transportadora de elétrons, SDHA ou ATP5A, codificadas pelo DNA nuclear (DNAn), ativa a UPRmt. Essa mudança na razão DNAm_t e DNAn é conhecida como “desequilíbrio mitonuclear” (EGAN; ZIERATH, 2013). A figura a seguir ilustra de forma simplificada o desequilíbrio mitonuclear e a UPRmt (Figura 1).

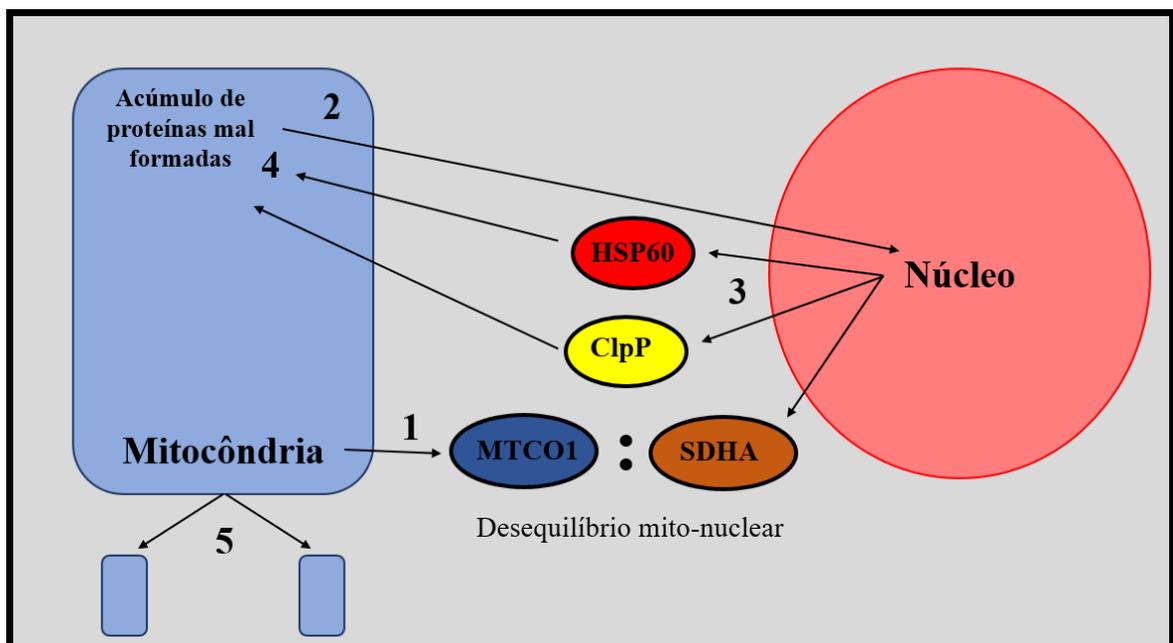


Figura 1. Figura esquemática simplificada da sinalização da UPRmt e do desequilíbrio mitonuclear. 1. O equilíbrio mito-nuclear se dá pela razão entre proteínas da cadeia transportadora de elétrons (CTE), responsáveis pela fosforilação oxidativas (OXPHOS), exemplificada pela razão entre MTCO1 (que é codificada pelo DNA mitocondrial) e SDHA (que é codificada pelo DNA nuclear). 2. O acúmulo de proteínas malformadas sinaliza fatores de transcrição ao núcleo da célula. 3. Ocorre o aumento da transcrição de chaperonas (HSP60) e proteases (ClpP) mitocondriais. 4. As proteínas malformadas são redobradas ou degradadas, dando origem às proteínas com o funcionamento correto. 5. O Aumento de proteínas mitocondriais favorece a melhora da função e da biogênese mitocondrial. Portanto, alterações no equilíbrio mitonuclear (como o acúmulo de proteínas malformadas) perturbam a proteostase mitocondrial e conseqüentemente ativam a UPRmt.

Estudos feitos com vermes (*C. elegans*) e moscas (*Drosophila*), demonstraram que a UPRmt desencadeada pelo desequilíbrio mitonuclear resultou em aumento significativo da função mitocondrial, do metabolismo celular e da longevidade (DILLIN; CRAWFORD; KENYON, 2002; OWUSU-ANSAH; SONG; PERRIMON, 2013).

Como a força motriz da célula, as mitocôndrias geram a maior parte da energia por meio da fosforilação oxidativa (OxPhos), um processo no qual elétrons são passados ao longo de uma série de subunidades de proteínas da OxPhos incorporadas na membrana mitocondrial interna (HÜTTEMANN et al., 2007). Alguns estudos apontam que a disfunção da OxPhos está associada ao desenvolvimento de resistência à insulina, à diminuição da secreção de insulina pela célula beta e à desregulação do metabolismo dos ácidos graxos em camundongos e humanos (PERKS et al., 2017).

A UPRmt induzida pela deficiência de OxPhos específica do músculo esquelético também está associada com aumento da lipólise e oxidação de ácidos graxos pela indução do fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF15), protegendo assim contra os efeitos adversos da obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos (CHUNG et al., 2017). A indução da UPRmt pela deficiência de OxPhos no músculo esquelético também está associado a ação protetora contra a obesidade e resistência à insulina, paradoxalmente, camundongos com maior IMC, apresentaram maior LONP1, que conseqüentemente apresentaram maior VAT (“*visceral adipose tissue*” ou tecido adiposo visceral, em português) (LEE et al., 2021) o que contribui para a piora do quadro de obesidade e resistência a insulina, tendo alta correlação para a ocorrência da disfunção mitocondrial.

1.4 Potencial dos estudos sobre a UPRmt no contexto do exercício físico

Sabidamente, o exercício físico aeróbio é uma alternativa não-farmacológica muito eficiente tanto para a prevenção, como para o tratamento da obesidade. É bem estabelecido na literatura que o exercício físico estimula a biogênese e aumenta a função mitocondrial, principalmente no músculo esquelético (EGAN; ZIERATH, 2013; GAN et al., 2018; RUEGSEGGER; BOOTH, 2018). No entanto, os efeitos do exercício físico sobre os mecanismos que controlam a proteostase mitocondrial ainda não são completamente entendidos. Recentemente, demonstramos que o treinamento físico foi capaz de estimular marcadores da UPRmt na musculatura esquelética em animais idosos (CORDEIRO et al., 2021, 2020). Esses resultados foram acompanhados pela melhora significativa da proteostase mitocondrial nas fibras musculares e também para a melhora de performance aeróbia.

Em um outro estudo, demonstramos que o exercício físico aeróbio aumentou o conteúdo proteico de marcadores da UPRmt no hipotálamo de camundongos eutróficos, contribuindo para aumento da função das mitocôndrias no sistema nervoso central (BRAGA et al., 2021). Neste cenário, acreditamos que o exercício físico aeróbio possa ser um agente estressor fisiológico capaz de estimular a UPRmt na musculatura esquelética de camundongos obesos, contribuindo para o reequilíbrio da proteostase mitocondrial e conseqüentemente para o aumento do funcionamento das mitocôndrias, gerando maior capacidade oxidativa, bem como maior capacidade de produção de energia.

2 HIPÓTESE

Como o exercício físico é considerado uma forma de tratamento não farmacológica e de prevenção de doenças metabólicas (EGAN; ZIERATH, 2013), aventamos a hipótese de que o exercício físico possa induzir e estimular proteases e chaperonas envolvidas do desencadeamento da UPRmt, levando a melhora da função mitocondrial e conseqüentemente da função oxidativa no músculo esquelético de camundongos obesos, podendo ter relevância na melhora em casos de disfunção mitocondrial.

3 JUSTIFICATIVA

As crescentes taxas de obesidade em praticamente todo o planeta, são reflexo de hábitos alimentares inadequados, sedentarismo e também refletem a ineficácia das estratégias antiobesogênicas vigentes. Como descrito anteriormente, a disfunção mitocondrial é um fenômeno celular intimamente ligado ao fenótipo obeso, podendo ser considerado um alvo terapêutico bastante promissor. Curiosamente, o exercício físico aeróbio é conhecido como uma das estratégias não-farmacológicas mais eficazes na prevenção e no tratamento da obesidade, com impacto positivo sobre a função das mitocôndrias. Contudo, os efeitos do exercício físico sobre os mecanismos de controle da proteostase mitocondrial, em particular a UPRmt, na musculatura esquelética de obesos ainda não são conhecidos. Portanto, a realização do presente projeto poderá ajudar a elucidar o papel do exercício físico aeróbio no controle da UPRmt na musculatura de camundongos obesos, abrindo novas perspectivas de tratamento para a obesidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar o papel do treinamento físico aeróbio sobre a UPRmt da musculatura esquelética de camundongos obesos.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o conteúdo das proteínas ClpP, Hsp60, Yme1L1 e Lonp1, conhecidos marcadores da UPRmt, no músculo esquelético de camundongos Swiss obesos após 4 semanas de treinamento físico em esteira;
- Avaliar os componentes da cadeia transportadora de elétrons (ATP5a, Uqcrc2, MTCO1, SDHB e NDUF8b), no músculo esquelético de camundongos Swiss obesos após 4 semanas de treinamento físico em esteira.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Fizemos uso de camundongos Swiss machos, com 8 semanas de idade, oriundos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Previamente foi feita a mensuração da massa corporal dos animais e então alocados em gaiolas individuais, com temperatura de 22°C \pm 2°C, passando por ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, onde receberam água e ração padrão para roedores (da marca Nuvilab) (grupo controle) *ad libitum*, ou dieta hiperlipídica (grupo HFD) por 8 semanas, conforme descrito (MARINHO et al., 2018). O projeto foi previamente submetido, analisado e aprovado pelo comitê de ética da UNICAMP.

5.2 Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício utilizado se consiste na submissão a quatro semanas de treinamento dos animais (grupo Treinado) em esteira ergométrica, sendo exercitados em intensidade correspondente a máxima fase estável de lactato, conforme proposto por Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2007).

Com o intuito de minimizar o possível estresse induzido pelo equipamento de treinamento, os camundongos foram adaptados previamente ao ergômetro. Após esse período, foi realizado um teste de exaustão para definirmos a intensidade de esforço dos animais durante o período de treinamento. Depois disso, os animais iniciaram o protocolo de exercício em esteira com volume diário de 1 hora, 5 dias na semana em intensidade correspondente a 60% da velocidade pico atingida no teste de exaustão.

5.3 Reagentes e anticorpos

Foram fornecidos pela empresa Bio-Rad (Richmond, CA) os reagentes e os aparelhos utilizados para o gel Sódio Dodecil Sulfato (SDS- PAGE). Foram fornecidos pela empresa Sigma ChemicalCo os compostos: Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditiotreitól (DTT). (St. Louis, MO). Foi fornecido pela empresa Biorad: a membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2 μ m). Foram utilizados os anticorpos anti-OXPHOS (MS604-300) (coquetel de subunidades mitocondriais), fornecido pela empresa ABCAM; anti-

ClpP (ab124822) fornecido pela empresa ABCAM; anti-YME1L (11510-AP) fornecido pela empresa Proteintech; anti-LONP1(bs-4245R) fornecido pela empresa BLOSS (Boston, MA); anti-Hsp60 (sc-13115) e anti-GAPDH (sc-47724) fornecido pela empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

5.4 Procedimentos de extração

Foram extraídas amostras do músculo do gastrocnêmio, que posteriormente foram homogeneizadas em tampão de extração (contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris - pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, reagentes da marca Sigma-Aldrich). Os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical, após os experimentos. O homogenato foi centrifugado a 11.000 RPM por 30 minutos. Foi determinada a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra, utilizando o método de BCA. Em seguida, foi acrescentado o tampão de Laemmli a cada uma das amostras, que foram fervidas por 5 minutos e armazenadas a -80° C para as análises de Western blotting.

5.5 Análise proteica por Western blotting

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no aparelho para minigel (MiniProtean®). A separação das proteínas aconteceu com aumento gradual da voltagem do equipamento com início em 30 Volts até atingir o valor máximo de 120 Volts, como descrito por Towbin et al. (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores pré-estabelecidos da BIO-RAD (Cat. #1610375).

A transferência das proteínas do gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad. Essa etapa teve a duração de aproximadamente 2 horas. As membranas contendo as proteínas e o marcador de peso molecular, foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,02%) por 1 hora, reduzindo assim as possíveis ligações inespecíficas do anticorpo na membrana de

nitrocelulose. As membranas foram posteriormente lavadas e incubadas com anticorpo primário, seguindo as diluições conforme sugestão do fabricante, por 12 horas (overnight) a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas e incubadas com 2 µL de anticorpo secundário por 120 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente lavadas e incubadas com 2 mL de solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada por meio de um fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

5.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) (caso tenha passado no teste de normalidade) ou Kruskal-Wallis, seguida por análise de significância (Tukey), quando apropriado, para comparação dos grupos experimentais. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. O processamento e análise dos dados foi feita com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos a partir de experimentos realizados com camundongos Swiss alimentados com HFD. Para isso, os animais foram distribuídos em 3 grupos (Figura 2A), o *High Fat Diet* (HFD), que recebeu dieta rica em gordura saturada durante as 12 semanas, o obeso treinado (TR), que recebeu o mesmo tempo de dieta do HFD, porém foi exposto ao treinamento em esteira ergométrica a partir da semana 8, e o grupo controle (CT), que apenas recebeu dieta padrão, não havendo outra intervenção.

Podemos observar que o peso corporal inicial dos animais ao serem distribuídos para os grupos aleatoriamente não havia diferença (Figura 2B). Após os animais serem tratados com a dieta e treino em seus respectivos grupos foi observado que houve diferença estatística entre os grupos CT vs HFD e HFD vs TR (Figura 2C). Demonstrando que a dieta rica em gordura saturada foi capaz de aumentar o peso do grupo HFD em relação ao CTL e a ele mesmo antes de começarem a ingestão da

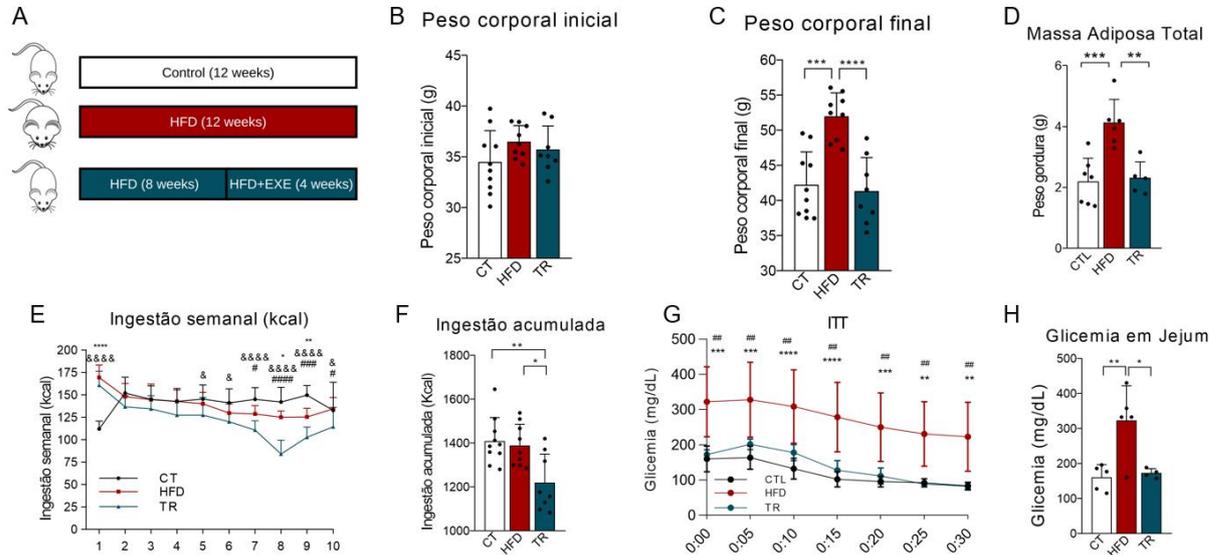
dieta. Porém o grupo treinado, por conta do exercício, conseguiu se equiparar ao CTL e apresentar peso significativamente menor do que o grupo obeso (HFD).

Quando analisamos a massa adiposa total (mesentérica, epididimal e retroperitoneal) (Figura 2D), observamos que o grupo treinado apresentou redução do peso total da gordura se comparado ao HFD, se equiparando ao grupo CTL. Gorduras essas que fazem parte do tecido adiposo visceral, que está relacionado com o desenvolvimento de diversas outras doenças metabólicas, como a resistência à insulina que pode evoluir para o diabetes mellitus tipo 2, por exemplo. Logo sendo um resultado interessante que foi ocasionado pelo exercício.

Observamos que a ingestão semanal em kcal no grupo controle se manteve ao longo do tempo (Figura 2E), assim como a do grupo obeso, que teve uma tendência de leve queda. O interessante é que o grupo treinado que apresentava o mesmo padrão que o grupo obeso, por ter o mesmo tratamento até o final da semana 6, que foi quando começou a adaptação dos animais a esteira, na semana 7. O treino de fato começou a partir da semana 8, porém desde a adaptação foi possível observar o efeito do exercício sobre a ingestão, ocorrendo a diminuição da mesma no grupo treinado quando comparado ao grupo obeso. O grupo TR ingeriu menos em kcal em relação ao grupo HFD e CT (Figura 2F), sendo observável o efeito central que o exercício teve em suprimir a ingestão dos animais mesmo aumentando o nível de atividade dos animais.

Após as 4 semanas de treinamento foi realizado o ITT (teste de tolerância a insulina). Podemos observar a glicemia elevada no ITT do grupo HFD em relação ao grupo CT e TR, assim como sua glicemia em jejum (Figura 2 G-H). Havendo então diferença entre os grupos CTL vs HFD e HFD vs TR, demonstrando que a dieta rica em gordura saturada foi capaz de além de alterar o peso dos animais, elevar a glicemia deles em relação ao CTL e que ainda o exercício físico foi capaz de ter efeito protetor mesmo sob a dieta rica em gordura, pois os animais treinados conseguiram manter a glicemia mais próxima do CTL.

Figura 2

**Figura 2. Efeito do exercício físico sobre o metabolismo em camundongos obesos.**

(A) Desenho experimental. (B) Peso corporal inicial. (n=8-10). (C) Peso corporal final. (n=8-10). *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (D) Massa adiposa total. (n=5-7). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (E) Ingestão semanal em kcal (quilocaloria). (n=8-10). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; “*”: CTL vs HFD; “&”: CTL vs TR; “#”: HFD vs TR. (F) Ingestão acumulada em kcal. (n=8-10). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. (G) ITT (Teste de tolerância a insulina). (n=5). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; “*”: CTL vs HFD; “&”: CTL vs TR; “#”: HFD vs TR. (H) Glicemia em Jejum. (n=5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Analisando parâmetros moleculares como o conteúdo de proteínas relacionadas ao mecanismo de UPRmt na musculatura esquelética (amostras de gastrocnêmio) dos camundongos. Nossos resultados mostram que houve aumento de marcadores da UPRmt, como na LONP1, YME1L1 e HSP60 no grupo treinado (Figura 3 A-E), o que não ocorreu com a CLPP (Figura 3 F-G), que apresentou redução significativa de sua expressão no grupo HFD. Portanto, observamos que o exercício aumentou o conteúdo de proteínas marcadoras da UPRmt na musculatura esquelética dos animais, o que pode ter contribuído para as melhoras metabólicas observadas anteriormente.

Figura 3

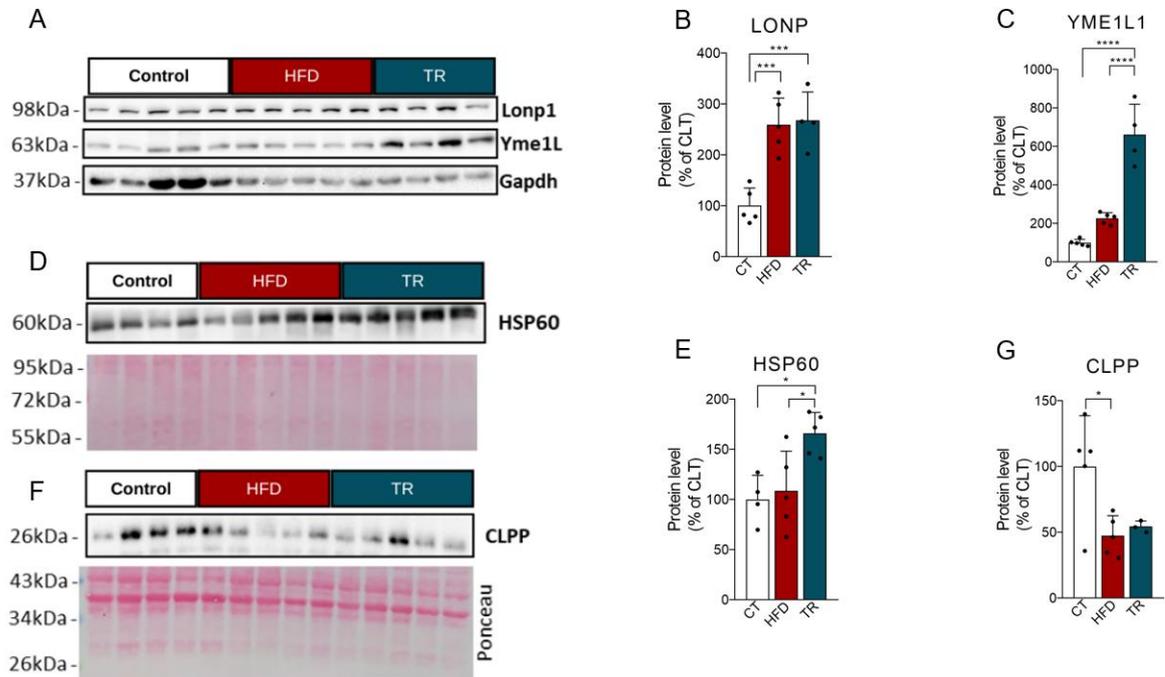


Figura 3. Efeito do exercício físico sobre marcadores da UPRmt no músculo de camundongos obesos. (A-B-C) Conteúdo proteico da LONP1 e Yme1L. (n=4-5). ***p<0,001 e ****p<0,0001. (D-E). Conteúdo proteico da HSP60. (n=4-5). *p<0,05. (F-G). Conteúdo proteico da CLPP. (n=4-5). *p<0,05.

Também foi analisado a expressão das proteínas marcadoras dos complexos da CTE na musculatura esquelética dos animais (Figura 4A-F). Foi observado aumento na expressão de ATP5A, UQCRC2 E MTCO1 (Figura 4A-D) no grupo treinado se comparado com o grupo controle, e apenas aumento no grupo treinado comparado com o grupo obeso na UQCRC2, não havendo diferença na expressão da SDHB e NDUFB8 entre os grupos (Figura 4E-F).

Figura 4

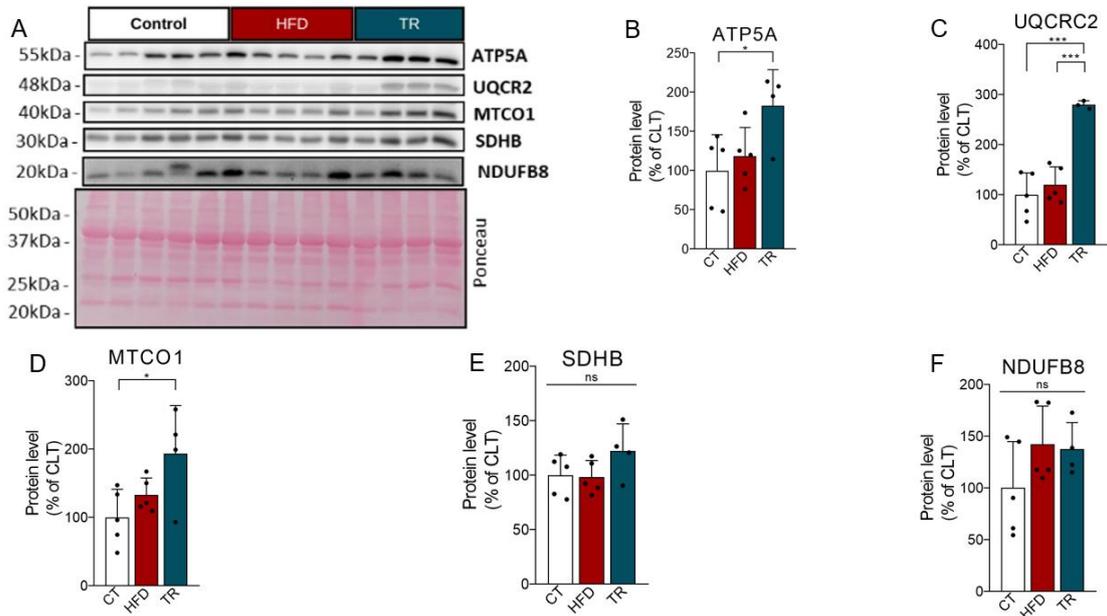


Figura 4. Análise da cadeia transportadora de elétrons na musculatura esquelética de camundongos alimentados com HFD submetidos ao exercício físico. (A) Imagens da membrana utilizada para quantificar o conteúdo das proteínas marcadoras da OXPHOS. (n=4-5). (B). Conteúdo proteico de ATP5A. (n=4-5). (C) Conteúdo proteico de UQCRC2. (n=3-5). (D) Conteúdo proteico de MTCO1. (n=4-5). (E) Conteúdo proteico de SDHB. (n=4-5). (F). Conteúdo proteico de NDUFB8. (n=4-5). *p<0,05.

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados apresentados, podemos concluir que o exercício físico foi capaz de desencadear a UPRmt na musculatura esquelética dos camundongos obesos, estabelecendo uma relação com o metabolismo mitocondrial, e que também o exercício foi eficaz no tratamento da fisiologia geral de animais com deficiências associadas ao consumo de dieta hiperlipídica. Também foi observado que o exercício físico desempenha um papel importante no aumento de marcadores da UPRmt e no aumento do conteúdo de proteínas responsáveis pelo reparo mitocondrial. Foi observado aumento no conteúdo de algumas proteínas da CTE (cadeia transportadora de elétrons) no grupo treinado, sugerindo que o desencadeamento da UPRmt possa melhorar a atividade mitocondrial na musculatura esquelética. Portanto, com esses resultados podemos concluir que o exercício físico é uma excelente estratégia não-farmacológica no tratamento e/ou prevenção da obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e outras doenças metabólicas associadas, tendo em vista a eficácia do protocolo de treinamento utilizada em reduzir os efeitos

secundários da obesidade, como a massa adiposa e peso corporal, aumento da sensibilidade a insulina e glicose, e o efeito em suprimir a ingestão, também como seu efeito em aumentar marcadores mitocondriais no músculo esquelético da UPRmt e da cadeia transportadora de elétrons.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, J. E.; HORIBE, T.; HOOGENRAAD, N. J. Discovery of Genes Activated by the Mitochondrial Unfolded Protein Response (mtUPR) and Cognate Promoter Elements. **PLOS ONE**, v. 2, n. 9, p. e874, 12 set. 2007.
- BRAGA, R. R. et al. Exercise alters the mitochondrial proteostasis and induces the mitonuclear imbalance and UPR mt in the hypothalamus of mice. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature** **2009 458:7241**, v. 458, n. 7241, p. 1056–1060, 4 mar. 2009.
- CANTÓ, C. et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 11, n. 3, p. 213, 3 mar. 2010.
- CANTÓ, C. et al. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. **Cell metabolism**, v. 15, n. 6, p. 838–847, 6 jun. 2012.
- CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Unfolded protein response. **Current biology : CB**, v. 22, n. 16, 21 ago. 2012.
- CHAN, D. C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 265–287, 2012.
- CHUNG, H. K. et al. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 1, p. 149–165, 2 jan. 2017.
- CORDEIRO, A. V. et al. High-intensity exercise training induces mitonuclear imbalance and activates the mitochondrial unfolded protein response in the skeletal muscle of aged mice. **GeroScience**, v. 43, n. 3, p. 1513–1518, 1 jun. 2021.
- CORDEIRO, A. V. et al. Aerobic Exercise Training Induces the Mitonuclear Imbalance and UPR_{mt} in the Skeletal Muscle of Aged Mice. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 75, n. 12, p. 2258–2261, 13 nov. 2020.
- DILLIN, A.; CRAWFORD, D. K.; KENYON, C. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 830–834, 25 out. 2002.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 5 fev. 2013.
- FERREIRA, A. P. DE S.; SZWARCOWALD, C. L.; DAMACENA, G. N. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, p. e190024, 1 abr. 2019.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, ago. 2007.

FISCHER, F.; HAMANN, A.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. **Trends in biochemical sciences**, v. 37, n. 7, p. 284–292, jul. 2012.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014.

GAN, Z. et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases. **Cell research**, v. 28, n. 10, p. 969–980, 1 out. 2018.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; FRANZ LANG, B. The origin and early evolution of mitochondria. **Genome biology**, v. 2, n. 6, 2001.

HARBAUER, A. B. et al. The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. **Cell metabolism**, v. 19, n. 3, p. 357–372, 4 mar. 2014.

HOUTKOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 225, abr. 2012.

HOWALD, H. et al. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 403, n. 4, p. 369–376, 1985.

HÜTTEMANN, M. et al. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 12, p. 1701–1720, 1 dez. 2007.

IKEZAKI, H. et al. Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS): a large prospective cohort study in Japan. **BMJ open**, v. 11, n. 12, p. e053763, 21 dez. 2021.

KLEINRIDDER, A. et al. Leptin regulation of Hsp60 impacts hypothalamic insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4667–4680, 1 nov. 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 1970 227:5259, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, J. H. et al. Expression of LONP1 Is High in Visceral Adipose Tissue in Obesity, and Is Associated with Glucose and Lipid Metabolism. **Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)**, v. 36, n. 3, p. 661–671, 1 jun. 2021.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797–801, 15 ago. 2002.

MARINHO, R. et al. Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 1, p. 880–890, 1 jan. 2018.

MAYORAL, L. P. C. et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 1, p. 11, 1 jan. 2020.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics** 2003 34:3, v. 34, n. 3, p. 267–273, 15 jun. 2003.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145–1159, 16 mar. 2012.

OWUSU-ANSAH, E.; SONG, W.; PERRIMON, N. XMuscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 699, 24 out. 2013.

PERKS, K. L. et al. Adult-onset obesity is triggered by impaired mitochondrial gene expression. **Science Advances**, v. 3, n. 8, 1 ago. 2017.

PETERSEN, K. F. et al. Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance. **Science**, v. 300, n. 5622, p. 1140–1142, 16 maio 2003.

PETERSEN, K. F. et al. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa031314>, v. 350, n. 7, p. 664–671, 8 out. 2009.

PIRINEN, E. et al. Pharmacological Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 19, n. 6, p. 1034–1041, 3 jun. 2014.

RUEGSEGGER, G. N.; BOOTH, F. W. Health Benefits of Exercise. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2018.

RUGARLI, E. I.; LANGER, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 6, p. 1336, 21 mar. 2012.

SPARKS, L. M. et al. A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 1926–1933, 1 jul. 2005.

SREEKUMAR, R. et al. Gene Expression Profile in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetes and the Effect of Insulin Treatment. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1913–1920, 1 jun. 2002.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

WALLIN, I. E. Symbioticism in the light of recent cytological investigations — Ivan E. Wallin, 1969. **Biosystems**, v. 31, n. 2–3, p. 181–183, 1 jan. 1993.

WANG, Y. Higher fasting triglyceride predicts higher risks of diabetes mortality in US adults. **Lipids in health and disease**, v. 20, n. 1, p. 181, 20 dez. 2021.

YI, H. S.; CHANG, J. Y.; SHONG, M. The mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis: a perspective on metabolic diseases. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 61, n. 3, p. R91–R105, 1 out. 2018.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 31 ago. 2012.

ZHANG, H. et al. Hsp70 in Redox Homeostasis. **Cells**, v. 11, n. 5, 1 mar. 2022.

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas

CERTIFICADO CEUA nº 114/2022



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico sobre a expressão de Parp1 e do perfil de parilação de proteínas no tecido hipotalâmico**, registrada com o nº **5978-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle e Matheus Biscaro Rocha**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/04/2022**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	30/04/2022 a 16/12/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/04/2022 a 16/12/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / 129S2/Sv/Pas
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / 129S2/Sv/Pas
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Origem:	CEMIB (Centro multidisciplinar de investigação biológica na área de ciência em animais de laboratório)
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Ciências do Esporte, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **10 de maio de 2022**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 12/05/2022, às 20:32 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 12/05/2022, às 09:53 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
C27930E7 734D45F8 93F0318F 036CC35A

