



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Departamento de Ciências Biológicas - DCB



THALISSA YUKIE GRABOSKI UMEMURA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA
HIPERLIPÍDICA

BAURU

2022

THALISSA YUKIE GRABOSKI UMEMURA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA
HIPERLIPÍDICA

Orientação: Prof. Dr. Heloísa Aparecida Barbosa
da Silva Pereira

Supervisor: Prof. Dr. Sergio Pereira

Bauru, Março de 2022.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte das exigências para a obtenção
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

U49a

Umemura, Thalissa Yukie Graboski

Análise proteômica do tecido hepático de camundongos com diabetes mellitus induzidos por estreptozotocina e dieta hiperlipídica

/ Thalissa Yukie Graboski Umemura. -- Bauru, 2022

67 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientadora: Heloísa Aparecida Barbosa da Silva Pereira

1. Proteoma. 2. Diabetes mellitus. 3. Obesidade. 4. Fígado. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

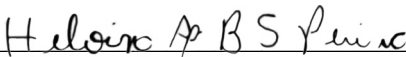
THALISSA YUKIE GRABOSKI UMEMURA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS COM
DIABETES MELLITUS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA
HIPERLIPÍDICA

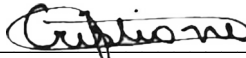
Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte das exigências para a obtenção
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 08/03/2022

BANCA EXAMINADORA


Prof. Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira - FOB, USP


Prof. Sérgio Pereira - FC, UNESP


Prof. Cristiane Figueiredo Pinho - FC, UNESP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a:

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2018/24073-0, por financiar este projeto, e muitas outras pesquisas inovadoras.

A USP, em especial, ao grupo do Laboratório de Bioquímica da FOB, que me proporcionou a oportunidade de participar e acessar novos conhecimentos e pesquisas excepcionais, essenciais para minha formação.

A UNESP, pela proporção de um ambiente construtivo. Especialmente, ao grupo do Laboratório de Desreguladores Endócrinos, que abriu novos horizontes para minha formação.

Ao meu supervisor, Sérgio Pereira, que acompanhou toda minha trajetória acadêmica, e me ofereceu suporte em todos os momentos.

A minha orientadora, Heloisa Aparecida, pela oportunidade e suporte durante o projeto, e por me inspirar cotidianamente.

A minha família e amigos, por me estimularem diariamente a me esforçar ao máximo e sempre evoluir.

Aos meus professores, principalmente à Cristiane Pinho, por despertarem minha admiração e serem grandes exemplos de sucesso na Academia.

RESUMO

O diabetes mellitus afeta milhões de pessoas, e pode causar graves complicações, como ataques cardíacos, AVC, falha renal entre outros. As análises proteômicas fornecem uma visão metabólica mais clara dos processos mecanísticos por trás das patologias analisadas permitindo revelar novas formas de diagnósticos, tratamentos e prevenções. O diabetes mellitus é uma doença complexa, e controversa. Muitas das vias metabólicas, processos biológicos e proteínas alteradas ainda não são compreendidas e variam entre as pesquisas, desse modo é essencial a utilização de métodos mais sensíveis para sua análise. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações de expressão das proteínas hepáticas, por meio da análise proteômica do fígado de camundongos com ou sem diabetes mellitus tipo 2. Para isso foram utilizados 18 camundongos divididos em 3 grupos (n=6). O primeiro foi de animais que receberam a dieta padrão e injeções de SZT (CD1), o segundo foram animais que receberam dieta hiperlipídica e injeções de SZT (CD2) e em terceiro, o grupo que recebeu dieta padrão (CND), este último é o controle. O modelo utilizado foi implantado com sucesso e revelou alterações significativas no metabolismo do DM2, relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A dieta hiperlipídica se mostrou uma potencializadora dos efeitos adversos do DM2 no fígado. Esse projeto ainda propôs novos alvos para a compreensão dessa patologia.

Palavras-Chave: Metabolismo, Fígado, Diabetes, Obesidade.

ABSTRACT

Diabetes mellitus affects millions of people, and can cause serious complications such as heart attacks, strokes, kidney failure, among others. Proteomics research provides a clearer metabolic view of mechanistic processes that reveal new ways of treatments, preventions and diagnosing. Diabetes mellitus is a complex and controversial disease. Many metabolic pathways, biological processes and protein alterations are not completely understood and can vary among researches, hence is essential the use of even more precise methods for its analysis. Thus the objective of this study was to evaluate how hepatic protein expression changes, through proteomic analysis of the functioning of mice with or type 2 diabetes mellitus. Thereunto, 18 mice were divided into 3 groups (n=6). The first is formed by animals that received standard diet and SZT injections (CD1), the second are animals that received high fat diet and STZ injections (CD2), and the third group received standard diet (CND), the latter is the control group. The model used was successfully implanted and revealed significant changes in the metabolism of DM2, related to the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. The high-fat diet proved to be a potentiator of the adverse effects of DM2 on the liver. This project also proposed new targets for the understanding of this pathology.

Keywords: Metabolism, Liver, Diabetes, Obesity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Patologia	11
1.1.1 Função das células β	12
1.1.2 Estreptozotocina	12
1.1.3 Resistência à Insulina	13
1.1.4. Metabolismo do Fígado	13
2 OBJETIVO	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Obtenção e tratamento dos animais	16
3.2 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	17
3.3 Análise proteômica do tecido hepático	17
3.3.1 Preparo da amostra	17
3.3.2 Análise por nano HPLC acoplado a espectrometria de massas	18
3.3.3 Análise dos dados através da bioinformática	18
4 RESULTADOS	20
4.1 CD1 vs. CND	20
4.1.1 Processos Biológicos da Comparação CD1 e CND	21
4.1.2 Subnetworks da Comparação CD1 e CND	22
4.1.2.1 Subnetwork 1	22
4.1.2.2 Subnetwork 2	24
4.1.2.3 Subnetwork 3	26
4.1.2.4 Subnetwork 4	28
4.2 CD2 vs. CND	29
4.2.1 Processos Biológicos da Comparação CD2 e CND	30
4.2.2 Subnetworks da Comparação CD2 e CND	31
4.2.2.1 Subnetwork 1	31
4.2.2.1 Subnetwork 2	35
4.2.2.1 Subnetwork 3	36

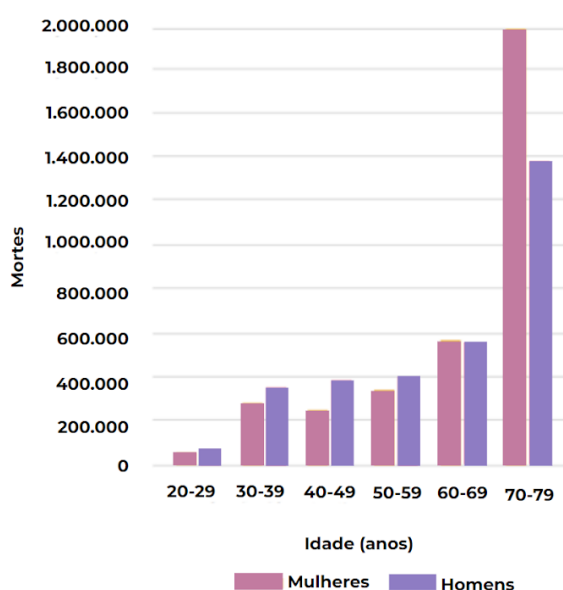
4.3 CD2 vs. CD1	37
4.3.1 <i>Processos Biológicos da Comparação CD2 e CD1</i>	37
4.3.2 <i>Subnetworks da Comparação CD2 e CD1</i>	39
4.3.2.1 Subnetwork 1	39
4.3.2.2 Subnetwork 2	41
4.4 Visão Geral	43
5 DISCUSSÃO	44
5.1 <i>Proteínas do Metabolismo Energético Hepático</i>	45
5.2 <i>Hiperglicemia</i>	46
5.3 <i>Estresse Oxidativo</i>	47
5.4 <i>Dieta Hiperlipídica</i>	49
5.5 <i>Novos Aminoácidos de Interesse</i>	51
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo aumento persistente dos níveis de glicose no sangue (glicemia em jejum ≥ 126 mg/dl, glicemia aleatória ≥ 200 mg/dl). Ao longo do tempo, isso acarreta danos ao coração, vasculatura, olhos, rins e nervos; Problemas que representam sérias ameaças à saúde humana. A prevalência de diabetes, em 2010, foi de 6,4% (285 milhões de pessoas) dos adultos do mundo, espera-se que até 2038 aumente para 7,7%. Entre 1980 e 2014, o número de adultos com diabetes aumentou de 108 milhões para 422 milhões (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020; KHAWANDANAH, 2019; LONG *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2015).

Mais de 90% dos casos de diabetes mellitus são de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), globalmente, cerca de 6,7 milhões de pessoas com idades entre 20 e 79 anos morreram de DM no ano de 2021 (Fig. 1), no Brasil o número de mortes foi de 214 mil. Pacientes com DM2 têm um risco 15% maior de mortalidade por todas as causas, sendo associada ao aumento de 28% na mortalidade pela doença cardiovascular (DCV), em comparação com pacientes saudáveis (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020; KHAWANDANAH, 2019; LONG *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2015).

Figura 1- Mortes por Diabetes em adultos (20-79 anos), por idade e sexo biológico em 2021.



Fonte: Adaptado de IDF (2021)

Os principais impulsionadores da epidemia de DM2, que quadruplicaram a incidência e prevalência da DM2, são o aumento global da obesidade, estilos de vida sedentários, dietas com alto teor calórico e envelhecimento da população. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que em 2045 cerca de 700 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos viverão com diabetes (IDF, 2021). Estudos epidemiológicos sugerem que muitos casos de DM2 podem ser evitados, melhorando os principais fatores de risco modificáveis, como obesidade, baixa atividade física e dieta pouco saudável. A atividade física melhora a captação de glicose, pois estimula o consumo de energia pelo tecido muscular, além de preservar a sensibilidade à insulina, por meio da redução da gordura intra-abdominal, ainda melhora ou até mesmo reverte a inflamação e o estresse oxidativo, que são fatores predisponentes do DM2 (IDF, 2021; GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020).

Outro fator de risco, além da obesidade e estilo de vida, associado à grande prevalência do DM2, é a predisposição genética que desempenha um papel importante no risco de desenvolver DM2. Nas últimas décadas, vários estudos de associação do genoma de DM2 mostraram a natureza poligênica complexa do DM2, em que a maioria desses loci aumenta o risco de DM2 por alterar a secreção de insulina, e uma minoria reduz a ação da insulina. As interações entre os loci e os fatores ambientais dependem da herdabilidade do DM2, portanto, o impacto de uma determinada variante genética pode ser modulado pelos fatores ambientais (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2020).

O desenvolvimento do diabetes envolve essencialmente a desregulação metabólica da homeostase da glicose, principal causa de morbidade e mortalidade diabética. O fígado é o centro do metabolismo da glicose e lipídios, portanto é um órgão essencial para o desenvolvimento do DM, sendo o principal centro de ação do glucagon e da insulina. O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é caracterizado pela secreção insuficiente de insulina e liberação excessiva de glucagon, que promove a lipólise, cetogênese hepática e neutraliza o anabolismo hepático. Já o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é o tipo mais comum de DM e é caracterizado por níveis indetectáveis de insulina, aumento do teor de gordura no fígado, diminuição da depuração de insulina e resistência hepática à insulina (WANG; RONIS; MEHENDALE, 2007).

Na última década novas revelações sobre o funcionamento do DM vieram à tona fornecendo *insights* sobre possíveis tratamentos e origens dessa patologia. Sendo assim, a utilização de análises ômicas, como metabolômica e proteômica permitem a identificação de

metabólitos e proteínas biomarcadores que podem ser úteis para o diagnóstico ou tratamento do diabetes. A partir do fim do século 20 a espectrometria de massa passou a ser usada para detectar metabólitos em quantidades anômalas causadas por erros inatos do metabolismo, a adoção dessa técnica em conjunto com análises eficazes pode apontar biomarcadores efetivos e econômicos. Os indicadores padrões para diagnóstico são a glicemia e a hemoglobina A1c (HbA1c). O triptofano e os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), como a valina, leucina e isoleucina podem representar biomarcadores potencialmente úteis de DM2 porque suas concentrações séricas são maiores em indivíduos diabéticos, além de relacionarem-se com a resistência à insulina e à obesidade (CHEN; GERSZTEN, 2020; LONG *et al.*, 2020).

Portanto, devido à grande prevalência global e nacional da diabetes mellitus, os altos investimentos em saúde pública, incurabilidade, e a possível prevenção e tratamento da patologia, considerando a evolução das tecnologias disponíveis para análises, explica-se a importância de pesquisas a seu respeito. Em adição, por se tratar de um trabalho que visa investigar as alterações associadas à dieta hipercalórica mimetiza-se a redução na produção da insulina pela aplicação de pequenas doses de estreptozotocina aliado ao processo de obesidade, aspectos mais próximos a patologia de DM2, assim validando a identificação de vias e marcadores que possam ajudar em seu melhor entendimento e desenvolvimento de novos caminhos para tratamentos mais eficazes.

1.1 Patologia

O DM1 é uma doença autoimune crônica que ocorre quando o corpo não é capaz de produzir insulina devido à destruição das células produtoras de insulina no pâncreas. Em outras palavras, o DM1 é caracterizado pela incapacidade do corpo de produzir insulina suficiente para a demanda metabólica (KHAWANDANAH, 2019).

Já o DM2, também chamada de independente de insulina, é caracterizada pela secreção deficiente de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas, resistência à insulina do tecido (RI) e uma resposta inadequada de secreção de insulina compensatória. A progressão da doença torna a secreção de insulina incapaz de manter a homeostase da glicose, produzindo hiperglicemia (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020; KHAWANDANAH, 2019; LONG *et al.*, 2020).

1.1.1 Função das células β

As células β são responsáveis pela produção de insulina por meio da pré-pró-insulina. No processo de maturação, a pré-pró-insulina é conformacionalmente alterada por várias proteínas do retículo endoplasmático (RE). Posteriormente, a pró-insulina é translocada do RE para o aparelho de Golgi (GA), entrando em vesículas secretoras imaturas, onde é clivada em peptídeo C e insulina. Depois de maturada, a insulina é armazenada em grânulos até que a liberação de insulina seja desencadeada por altas concentrações de glicose (BAESHEN *et al.*, 2014; DEWIDAR *et al.*, 2020).

As células β absorvem a glicose principalmente por meio do transportador de glicose 2 (Glut2), proteína transportadora de soluto sensível à glicose para as células β . Uma vez que a glicose é absorvida, seu catabolismo é ativado, aumentando a razão ATP/ADP intracelular, induzindo o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP na membrana plasmática. Isso leva à despolarização da membrana e à abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{2+} na célula. O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular desencadeia o priming e a fusão dos grânulos secretores contendo insulina à membrana plasmática, resultando em exocitose de insulina (BAESHEN *et al.*, 2014; DEWIDAR *et al.*, 2020).

1.1.2 Estreptozotocina

Um dos modelos mais comuns para simulação do diabetes é pela indução com estreptozotocina (STZ). A estreptozotocina tem propriedades diabetogênicas, identificados a partir de 1963 devido a sua capacidade de destruir as ilhotas de células- β no pâncreas causando sintomas da diabetes mellitus tipo 1, como deficiência insulínica, hiperglicemia, polidipsia e poliúria. Essa substância tem vida curta dentro do organismo, e se liga diretamente à Glut2, receptor encontrado principalmente no pâncreas, ao atingir a célula alvo induz a quebra de fitas de DNA, que ativa a poli (ADP-ribose) polimerase nuclear, que converte nicotina adenina dinucleotídeo (NAD) em polímeros de ADP-ribose nos locais das quebras de fitas de DNA, diminuindo os níveis celulares de NAD. A deficiência de NAD causa perda de viabilidade celular, inibindo assim a síntese de pró-insulina. Além disso, foi demonstrado que a fragmentação de DNA induzida por STZ é mediada pelo radical livre- H_2O_2 (WANG; RONIS; MEHENDALE, 2007).

As células atingidas pela STZ sofrem necrose e são eliminadas pelos macrófagos, as células- β restantes produzem insulina insuficiente, portanto essa perturbação inicial desencadeia a hiperglicemia, e esta sim causará os sintomas sistêmicos. O STZ é rapidamente eliminado do corpo e sua toxicidade no fígado e rins pode ser ignorada, o impacto observado nesses órgãos é o reflexo da deficiência causada no pâncreas, principalmente decorrido da hiperglicemia (FURMAN, 2021; YAN; WU , 2015). Portanto, o papel da estreptozotocina é causar a disfunção das células- β via glicotoxicidade, e quando associada com dietas específicas simula o diabetes tipo 2 (LIKE; ROSSINI, 1976; YAN; WU, 2015).

1.1.3 Resistência à Insulina

A Resistência à Insulina (RI) refere-se à deficiência na resposta metabólica das células responsivas à insulina, em nível sistêmico causada pelos níveis de glicose no sangue ou deficiência de insulina. Existem três grandes categorias de condições de RI. A diminuição da secreção de insulina pelas células β , presença de antagonistas da insulina no plasma, devido a hormônios contrarreguladores ou corpos não hormonais que prejudicam os receptores ou a sinalização da insulina, ou resposta de insulina prejudicada nos tecidos-alvo (DEWIDAR, 2020).

1.1.4. Metabolismo do Fígado

No estado basal, o fígado representa o principal local de RI, e isso se reflete na superprodução de glicose. Em indivíduos saudáveis, o fígado é o centro de utilização da glicose durante o período pós-prandial. O fígado recebe carboidratos da dieta diretamente do intestino, por meio da veia porta, para ser utilizada, a glicose é fosforilada pela glicocinase (GK) em glicose-6-fosfato (G6P), a GK só sintetiza G6P quando os níveis de glicose no sangue são maiores que 90 mg/dl. A G6P só é transformada em excesso de glicogênio quando os níveis de insulina são altos o suficiente para ativar a glicogênio sintase (GSb) e inativar a glicogênio fosforilase (GP_a ou Pygl). Durante o período pós refeição, a maior parte da **G6P** é usada para sintetizar glicogênio por meio da formação de glicose 1-fosfato e UDP-glicose. Primeiro, quantidades menores de UDP-glicose são usadas para formar UDP-glucuronato e UDP-galactose, que são doadores de unidades de monossacarídeo usadas na glicosilação

(ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; ATHYROS *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2020; SOLIS-HERRERA *et al.*, 2008).

Uma segunda via do metabolismo da G6P é a formação de frutose-6-fosfato, que pode iniciar a via da hexosamina para produzir UDP-N-acetilglucosamina ou seguir a via glicolítica para gerar piruvato e depois acetil-CoA. O acetil-CoA pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para ser oxidado ou pode ser exportado para o citosol, onde sintetiza ácidos graxos, quando há excesso de glicose no hepatócito. Finalmente, a G6P pode produzir NADPH e ribose-5-fosfato através da via da pentose fosfato. O metabolismo da glicose fornece intermediários para a glicosilação. Além de metabolizar carboidratos, o fígado produz glicose para ser usada por outros tecidos, a partir da quebra de glicogênio ou da síntese de novo usando principalmente lactato e alanina (gliconeogênese). Níveis elevados de G6P promovem a regulação positiva da G6P fosfatase (G6Pase) e de enzimas lipogênicas, como a piruvato quinase hepática (L-PK), ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (ACC) (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; ATHYROS *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2020).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações de expressão das proteínas hepáticas, por meio da análise proteômica do fígado de camundongos com ou sem diabetes tipo mellitus tipo 2, induzidos pela administração de estreptozotocina associada ou não à dieta hiperlipídica. Adicionalmente, busca-se verificar a efetividade do modelo experimental e identificar biomarcadores da patologia nesse órgão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e tratamento dos animais

Os camundongos adultos machos da linhagem C57BL/6J e C57BL/6 foram obtidos, junto ao CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP. Após aprovação do comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Os mesmos foram levados e alojados no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, sendo adaptados por 7 dias e tratados por um período de dias mediante condição de luz, temperatura e umidade controladas. Foram utilizados 12 animais da linhagem C57BL/6J, divididos em dois grupos, CD1 e CD2, de acordo com a dieta administrada. O grupo CD2 recebeu a ração hiperlipídica adquirida da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências© seguindo as especificações encontradas na literatura (GILBERT *et al*, 2011) por 8 semanas, durante o mesmo período o grupo CD1 recebeu dieta normocalórica. Ao final de 8 ou mais semanas os mesmos receberam doses de estreptozotocina de 40 a 50 mg/kg, por 3 dias, porém se observou a necessidade de aumentar as aplicações para alguns animais que chegaram de 5 a 7 doses para então desenvolver a diabetes constatadas pela análise da glicemia periódica maior que 200mg/dl de glicemia. Após a constatação os mesmos permaneceram por 21 dias recebendo alimentação padrão, e o grupo CD2 continuou recebendo a dieta hipercalórica até a eutanásia.

Um grupo de camundongos com 6 animais da linhagem C57BL/6 foi utilizado como controle em relação aos experimentais recebendo ração normocalórica e sem administração de STZ, chamado CND. A linhagem C57BL/6J foi escolhida para o grupo experimental por ter alterações genéticas que geram uma predisposição ao ganho de peso e desenvolvimento da resistência insulínica, em relação a C57BL/6 que é uma linhagem utilizada como background para camundongos transgênicos e mutantes. Os animais de cada grupo foram mantidos em grupos de 3 por caixa até a eutanásia (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007).

3.2 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Para os procedimentos de eutanásia e obtenção das amostras, a princípio se tinha indicado a utilização do Tiopental sódico (Thiopentax 3%, 5 mg/100 mg p.c.). Porém, o procedimento foi alterado e aprovado pelo comitê de ética. Assim, ao término do período experimental, os animais foram expostos à câmara de CO₂ seguindo a Resolução Normativa 37 de Prática de Eutanásia do CONCEA, utilizando uma câmara específica que mensura o fluxo de CO₂ por meio do fluxômetro. O método tem a vantagem de não interferir nos parâmetros bioquímicos, especialmente na glicemia. É relatado na literatura que a administração de dose letal de anestésicos provoca aumento da glicemia e uma possível desregulação na homeostase das ilhotas (WINDELOV; PEDERSEN *et al.* 2016). Após a eutanásia, foi exposta a cavidade peritoneal e realizada a punção cardíaca para a coleta de sangue. As amostras de sangue foram transferidas para tubos plásticos heparinizados e mantidas a 4°C até a centrifugação a 1.300 g (4°C, 5 min). Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o dia da quantificação da glicemia, insulinemia. Em seguida à retirada de sangue, foram retiradas amostras de tecido hepático para análise proteômica (amostras armazenadas a -80°C).

3.3 Análise proteômica do tecido hepático

3.3.1 Preparo da amostra

Para extração das proteínas hepáticas, 50 mg do tecido foram transferidos para um microtubo, onde foram adicionados 100 µL de tampão de extração contendo uréia 5 M, tiouréia 2M, CHAPS 2% e ditioneitol (DTT) 1%. Após 1 h de incubação em gelo, com agitação em vórtex a cada 10 min, o homogenato foi submetido à centrifugação a 8000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi em seguida coletado. Após a extração, as proteínas foram quantificadas com auxílio do Kit Quick Start Bradford (Bio-Rad) que está baseado no método de (Bradford 1976). As amostras de proteína (50 µg) foram então transferidas para um microtubo, no qual adicionou-se 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e 25 µL de RapiGest® 0,2% (Waters). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com DTT 100 mM. Em seguida, adicionou-se Iodoacetamida (IAA) 300 mM por 30 min em temperatura ambiente, para devida alquilação das amostras. Após a alquilação foi

realizada a digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) e incubação a 37°C por 14 h. Ao fim das 14h, a ação da enzima foi paralisada pela adição de 5 µL de ácido fórmico 3%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 10 minutos. O sobrenadante contendo os peptídeos foi então destinado à análise por UPLC -MS.

3.3.2 *Análise por nano HPLC acoplado a espectrometria de massas*

Todos os experimentos foram realizados no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo QToF G2 (Waters). Inicialmente foi realizada uma separação em nanoescala com o sistema UPLC nanoACQUITY equipado com uma coluna C18 do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 2,1 mm50 mm; 1,8 m, Waters). Inicialmente a coluna foi pré-equilibrada com a fase móvel B (Acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1%) e em seguida os peptídeos foram separados por gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,4 µL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C. A análise de peptídeos trípticos foi realizada no espectrômetro de massas Xevo G2 QToF, operando no modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 minutos. Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software, que foi buscado no banco de dados da espécie *Mus musculus* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource). As alterações quantitativas em níveis protéicos foram analisadas utilizando-se o software PLGS Expression, de acordo com as intensidades de pico dos íons peptídicos medidos.

3.3.3 *Análise dos dados através da bioinformática*

Com o objetivo de compreender o significado biológico dos resultados quantitativos da análise proteômica, as listas de proteínas diferencialmente expressas ou exclusivas nas comparações entre os diferentes grupos experimentais foram submetidas à análise de classificação funcional. Para cada uma das comparações relevantes (CD2 vs. CD1; CD2 vs. CND; CD1 vs. CND), foi feita a anotação de Processos Biológicos Amplos do Gene Ontology (GO; 18/10/2021), utilizando o Cluego v2.5.8 + Clupedia v1.5.8 (BINDEA, MELNIK *et al.* 2009, BINDEA, GALON *et al.* 2013), plugins do Cytoscape (Version 3.9.0)

(BAUER-MEHREN 2013, MILLAN, 2013). As tabelas geradas pelo PLGS identificadas pelo UniProt foram analisadas com parâmetros padrão, compreendendo um método de correção do Enriquecimento (teste hipergeométrico right-sided) usando Bonferroni, modo de análise “Função” e lista de cluster de genes para *Mus musculus* (10090), Códigos de Evidência “All”, especificidade de networking “medium” (GO levels 3 to 8), Use GO Term Fusion, GO Term/Pathway Selection Cluster #1 (“4 Min #Genes; 15% Genes”) e Kappa Score Threshold 0.4. As networks de interação proteína-proteína foram baixadas do ClusterMaker 2, versão 2.0, um plugin do Cytoscape e construídas como proposto por Millan (2013) para cada uma das comparações acima descritas.

4 RESULTADOS

Nesta seção espera-se observar a super regulação de proteínas envolvidas na lipogênese, lipólise, estresse oxidativo, gliconeogênese, glicogenólise e a sub-regulação de proteínas da glicogênese, já as proteínas antioxidantes podem ter regulações diferentes segundo a resposta aos níveis de estresse oxidativos, nos grupos diabéticos em relação aos não diabéticos. Outro fator importante é observar os efeitos da dieta hiperlipídica determinante na diabetes mellitus tipo 2. Para tanto os resultados foram organizados em tópicos de acordo com cada comparação (CD2 vs. CD1; CD2 vs. CND; CD1 vs. CND) com o intuito de avaliar as alterações para cada uma delas.

As definições das proteínas, representadas neste trabalho pelo nome dos genes que as codificam, foram retiradas do banco de dados UniProtKB utilizando o código de identificação (*accession*).

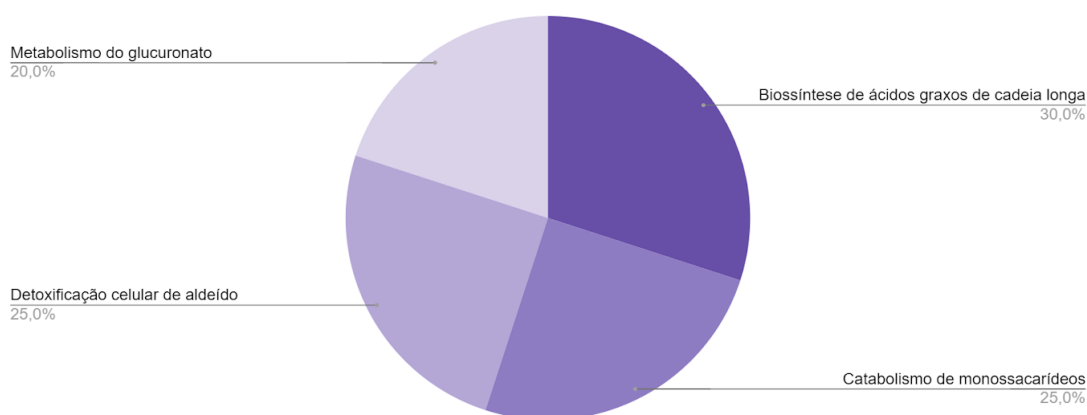
4.1 CD1 vs. CND

Nessa comparação foram registradas 150 proteínas com alteração de expressão entre o grupo CD1 em relação ao controle. Destas, 48 estão subexpressas e 102 superexpressas. A análise de processos biológicos mostra a superexpressão da detoxificação celular de aldeído e do catabolismo de monossacarídeos, acompanhados pela subexpressão do metabolismo de glucuronato (descrito no item 4.1.1.) Além disso, a análise das subnetworks (descrito no item 4.1.2.) aponta para alteração do metabolismo de lipídios, principalmente da superregulação da β -oxidação e das enzimas que degradam derivados tóxicos da oxidação lipídica, ainda há indicações do comprometimento do efluxo de ácidos graxos. Outras alterações observadas nas subnetworks foi no metabolismo de carboidratos e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e transporte de elétrons na cadeia respiratória.

4.1.1 Processos Biológicos da Comparação CD1 e CND

A comparação entre o grupo CD1 e controle (CND), essa razão mostra os efeitos da STZ em relação ao grupo controle. Os processos biológicos alterados estão representados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos CD1 e o grupo com CND. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.



Biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (30% - GO:0042759), catabolismo de monossacarídeos (25% - GO:0046365), detoxificação celular de aldeído (25% - GO:0110095), metabolismo do glucuronato (20% - GO:0019585).

A biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa se refere à lipogênese, compreende as glutationa-S-transferases [Gstm1, Gstm2, Gstm4, Gstm7, Gstp1, Gstp2], normalmente associadas à atividade antioxidante. Duas isoformas foram encontradas, a isoforma *Mu* estava super-regulada (Gstm1, Gstm2, Gstm4 e Gstm7), enquanto a isoforma *Pi* (Gstp1 e Gstp2) estava subregulada. Dastidar *et al.* (2018) sugeriram que a Gstp inibe a ativação de c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), via reguladora da gliconeogênese hepática dependente de JNK. Portanto a isoforma *Pi* é fundamental no manuseio da glicose, sendo a sub regulação destas proteínas e consequente superexpressão da via JNK, característica do diabetes. Já a isoforma *mu* é geralmente sub regulada no diabetes (BEKRIS *et al.*, 2009; DASTIDAR *et al.*, 2018). Esses dados, portanto, corroboram com os observados no presente trabalho, indicando alterações características da patologia.

O catabolismo de monossacarídeos se refere às reações e vias que resultam na quebra de monossacarídeos, álcoois poli-hídricos contendo um aldeído ou um grupo ceto com três ou mais átomos de carbono. Esse processo contém aldolases e enolase da via glicolítica, desidrogenases tanto do metabolismo de xenobióticos quanto de carboidratos (frutose e lactato - fermentação) e quinases da glicólise e do metabolismo da frutose, todas as proteínas deste grupo estavam super reguladas, [Aldob, Dhdh, Eno1b, Ldha, Tkfc]. Esse processo biológico ainda pode estar relacionado à gliconeogênese (PIROVICH *et al.*, 2021).

A detoxificação celular de aldeído apresenta proteínas de qualquer processo que reduz ou remove a toxicidade de um aldeído, incluindo o transporte de aldeídos para fora de áreas sensíveis e para compartimentos ou complexos preparados para o sequestro de substâncias tóxicas. Esse processo biológico contém aldo-ceto redutases, aldeído desidrogenases e serina hidrolase, todas estavam super reguladas [Akr1a1, Aldh1a1, Aldh1a7, Aldh2, Esd] (MAKIA *et al.*, 2011).

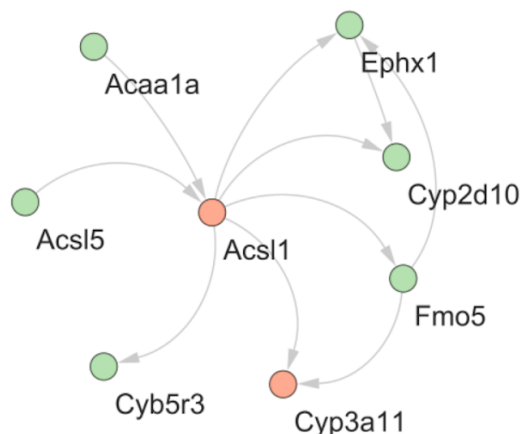
O metabolismo do glucuronato, compreende a aldo-ceto redutase família 1 membro A1, que se encontra super regulada, e as UDP-glucuronosiltransferases sub reguladas [Akr1a1, Ugt1a2, Ugt1a7c, Ugt1a9]. A via do ácido glicurônico é uma via quantitativamente menor do metabolismo da glicose. Assim como a via das pentoses fosfato, ela fornece precursores biossintéticos e interconverte alguns açúcares menos comuns em açúcares que podem ser metabolizados (BHAGAVAN, 2002).

4.1.2 Subnetworks da Comparação CDI e CND

4.1.2.1 Subnetwork 1

A subnetwork apresentada na figura 2 possui 8 nodos, e mostra interações entre proteínas do metabolismo de ácidos graxos e xenobiótico.

Figura 2 - Subnetwork 1 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD1 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo CD1 em relação ao controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Acaa1a	Q921H8	3-ketoacyl-CoA thiolase A	1,28
Acs11	P41216	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	0,83
Acs15	Q8JZR0	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5	2,86
Cyb5r3	Q9DCN2	NADH-cytochrome b5 reductase 3	1,73
Cyp2d10	P24456	Cytochrome P450 2D10	1,23
Cyp3a11	Q64459	Cytochrome P450 3A11	0,55
Ephx1	Q9D379	Epoxide hydrolase 1	1,49
Fmo5	P97872	Flavin-containing monooxygenase 5	1,35

A proteína com maior número de interações é a ácido graxo de cadeia longa-CoA ligase 1 (Acs11), que estava sub regulada, catalisa a conversão de ácidos graxos de cadeia longa em sua forma ativa de acil-CoAs tanto para síntese de lipídios celulares quanto para degradação via β -oxidação. Essa proteína é abundantemente expresso em macrófagos atuando ácidos graxos insaturados e saturados. Segundo Kanter e colaboradores (2012), a Acs11 medeia a degradação por ácidos graxos e a subsequente redução do efluxo de colesterol, os pesquisadores ainda obtiveram a mesma sub regulação dessa proteína em ratos diabéticos tipo 1. A sub regulação da Acs11 associada às 6 das 7 proteínas em torno da Acs11, que estão super reguladas e são relacionadas ao metabolismo de lipídios e ao metabolismo detoxificante, pode-se indicar o comprometimento do efluxo de ácidos graxos e o aumento dessas vias induzidos pela STZ.

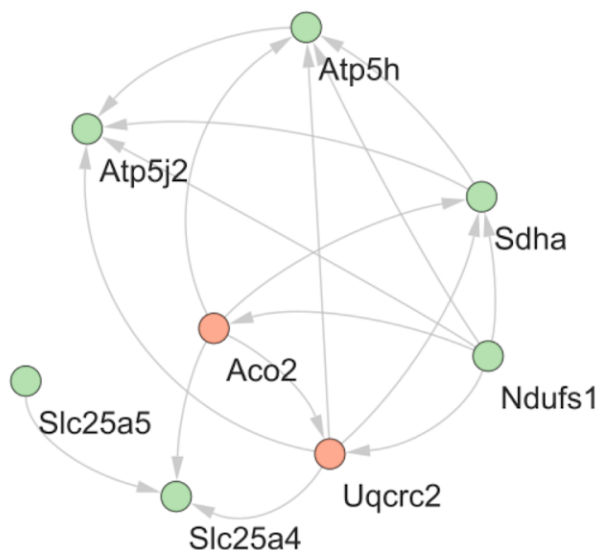
Visto isso, a degradação de xenobióticos ocorre em duas fases. A fase 1 do metabolismo é a funcionalização, que consiste na introdução ou exposição de grupos funcionais na estrutura química de um composto, preparando-o para a fase 2. A fase 2 é a conjugação que nem sempre é necessária. Muitos xenobióticos são lipofílicos e quase quimicamente inertes (por exemplo, PAHs), então não necessariamente sofrem uma reação de fase 2, desse modo diminui-se a chance de danificar o DNA. Portanto pode-se indicar que como no presente trabalho foi observado alterações em proteínas da fase 1 que há um bom equilíbrio entre a produção de um metabólito mais reativo e reações de conjugação. Podemos citar assim dois grupos de enzimas na fase 1 que há as oxidorredutases (Cyb5r3) e hidrolases (Ephx1). As oxidorredutases introduzem um átomo de oxigênio ou removem elétrons de seus substratos e as hidrolases hidrolisam ésteres, amidas, epóxidos e glicuronídeos. O principal sistema enzimático oxidorredutase é chamado de monooxigenases P450 (Cyp2d10, Cyp3a11). Outros sistemas incluem monooxigenases contendo flavina (Fmo5), ciclooxigenases (Cox) e monoamina oxidases (Fmo5) (JOHNSON *et al.*, 2012).

Esse processo de degradação de xenobióticos pode explicar a alteração nas proteínas observadas nesta subnetwork, como as Cyps, Ephx1 e Fmo5. É importante indicar que o fígado é o órgão central de processamento de xenobióticos, assim, alterações no seu metabolismo como o estresse oxidativo provocado por alterações metabólicas provenientes do diabetes podem levar ao aumento da expressão deste grupo de proteínas. Sendo assim, é possível que o acúmulo ou comprometimento do metabolismo lipídico representado pela alteração em Acaa1a, Acs11, Acs15, esteja associado de forma causal para as alterações em proteínas essenciais no metabolismo xenobiótico, representado pelas proteínas Cyb5r3, Cyps, Ephx1 e Fmo5 (BEGRICHE *et al.*, 2011).

4.1.2.2 Subnetwork 2

Essa subnetwork (Fig. 3), com 8 nodos, apresenta de modo geral, proteínas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e do transporte de elétrons na cadeia respiratória.

Figura 3 - Subnetwork 2 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD1 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo diabético em relação ao controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação



Gene	ID	Nome	Razão
Aco2	Q99KI0	<i>Aconitate hydratase</i>	0,57
Atp5pd	Q9DCX2	<i>ATP synthase subunit d</i>	1,68
Atp5j2	P56135	<i>ATP synthase subunit f, mitochondrial</i>	1,43
Ndufs1	Q91VD9	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit</i>	2,92
Sdha	Q8K2B3	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit</i>	2,20
Slc25a4	P48962	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	1,80
Slc25a5	P51881	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	1,77
Uqcrc2	Q9DB77	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2</i>	0,31

Duas proteínas estavam com a sua expressão reduzida, sendo uma delas a aconitato hidratase (Aco2) envolvida na segunda etapa da síntese de isocitrato a partir do oxalacetato, parte do ciclo do ácido tricarboxílico, do metabolismo de carboidratos. Responsável por gerar metabólitos e precursores de energia, possivelmente a sua redução pode indicar problemas nesta geração de energia. A outra proteína é a Complexo citocromo b-c1 subunidade 2 do (Uqcrc2), que é um complexo transmembranar integrante da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial que impulsiona a fosforilação oxidativa (oxphos). O Uqcrc2 catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c, ligando essa reação redox à translocação de prótons através da membrana interna mitocondrial. A sua redução pode indicar uma tentativa de conter o aumento exacerbado na produção de energia, que pode ser

indicado a seguir pelo aumento das outras proteínas encontradas nesta mesma rede de interação.

A fosforilação oxidativa é bem representada nesta subnetwork, sendo o responsável pela produção aeróbica de ATP na membrana interna mitocondrial. O complexo I é representado pela *Ndufs1*, complexo II pela *Sdha*, o complexo III pelo *Uqcrc2* e o complexo V pelas *Atp5j2* e *Atp5dp*. Além disso a *Mtco2*, representante do complexo IV, obteve razão de 1,95 na comparação CD1 em relação ao CND, mas esta proteína não foi apresentada em nenhuma subnetwork (SOUSA *et al.*, 2018). Estas proteínas, exceto a *Uqcrc2*, estavam com aumento na sua expressão o que pode indicar o aumento ou disfunção na produção de energia. Além disso, o complexo-I e o III são os principais geradores de estresse oxidativo, coincidentemente o primeiro foi o mais super regulado, enquanto o C-III foi o único dessa via sub-regulado (YANG *et al.*, 2021).

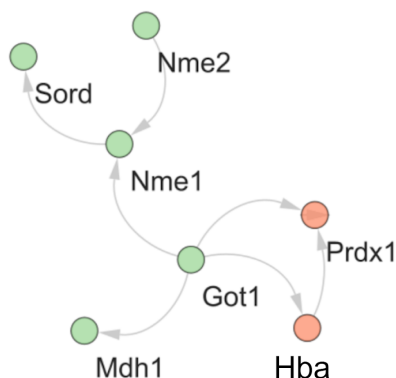
A ADP/ATP translocase 1 (*Slc25a4*) e a ADP/ATP translocase 2 (*Slc25a5*) medeiam a importação de ADP para a matriz mitocondrial para a síntese de ATP e a exportação de ATP para abastecer a célula. Atua como transportador de prótons, desacoplando os fluxos de prótons através da cadeia de transporte de elétrons e da ATP sintase para produção de ATP e indução da termogênese mitocondrial mantendo o equilíbrio entre esses dois processos. A sua superregulação parece uma resposta ao aumento de produção de energia, com o intuito de manter o fluxo de substrato (ADP) para a conversão do produto (ATP). Sendo assim, a super expressão destas proteínas pode apontar para o aumento do aporte de ADP para a mitocôndria, ou para o desencadeamento da termogênese mitocondrial, que ocorre pelo desequilíbrio entre ADP e ATP. Essa hipótese é corroborada pela alteração nas proteínas da Oxphos e do ciclo do ácido cítrico. Outra indicação desse desequilíbrio é apontada pela subnetwork 1 que mostra alterações no metabolismo de lipídios, sendo a termogênese um resultado não só da produção de ROS, como uma estratégia metabólica para evitar o acúmulo lipídico nas células (RUEGSEGGER *et al.*, 2018).

4.1.2.3 Subnetwork 3

Essa subnetwork (Fig. 4), com 7 nodos, apresenta proteínas majoritariamente do metabolismo de carboidratos (*Got1*, *Mdh1* e *Sord*). As nucleosídeo difosfato quinase atuam na interconversão de nucleotídeos di- e trifosfatos, essenciais para geração de energia. Além

disso, a Prdx1 e Nmes são antioxidantes e podem desencadear a apoptose. Outra possível observação é a superexpressão do TCA e a ativação de vias alternativas da glicose, como a via do polioli, ao mesmo passo em que se aumenta a produção de ROS na célula e são desencadeados mecanismos antioxidantes como observado anteriormente. A via do polioli é desencadeada pela saturação da enzima hexoquinase (via tradicional da glicose), o excedente de glicose é metabolizado em sorbitol para formação de frutose, todavia o sorbitol não é facilmente metabolizado na célula causando danos celulares (LORENZI, 2007; STEELE; STEEL; WAINE, 2008).

Figura 4 - Subnetwork 3 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD1 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo diabético em relação ao controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação



Gene	ID	Nome	Razão
Got1	P05201	<i>Aspartate aminotransferase</i>	1,49
Hba	P01942	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	0,78
Mdh1	P14152	<i>Malate dehydrogenase</i>	1,12
Nme1	P15532	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	1,48
Nme2	Q01768	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	1,43
Prdx1	P35700	<i>Peroxiredoxin-1</i>	0,83
Sord	Q64442	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	1,36

A Aspartato aminotransferase (Got1) atua na biossíntese de L-glutamato, e sua atividade está envolvida na síntese hepática de glicose (HGP), via geralmente super regulada no DM. A Malato desidrogenase (Mdh1) catalisa a redução de alfa-cetoácidos aromáticos na presença de NADH, e auxilia o transporte malato-aspartato e no ciclo do ácido tricarboxílico, importante no fornecimento de NADH mitocondrial para a fosforilação oxidativa, esse dado

vem de encontro com aumento na atividade da cadeia de fosforilação oxidativa o que necessita de mais substrato para continuar a produção de ATP.

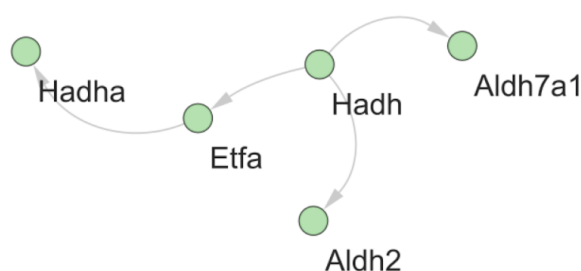
Já a Sorbitol desidrogenase (Sord) catalisa a oxidação reversível dependente de NAD⁺ de vários álcoois de açúcar, interconverte glicose e frutose via sorbitol, logo é uma enzima chave na via do polioliol e constitui uma importante rota alternativa para o metabolismo da glicose, sendo um ponto relevante já que neste caso se tem uma redução da disponibilidade de glicose.

A Peroxirredoxina-1 (Prdx1) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos a água e álcoois. Dessa forma, protege a célula contra o estresse oxidativo por meio de peróxidos desintoxicantes e pela sinalização mediada por peróxido de hidrogênio. A sua redução pode indicar uma menor proteção ao estresse oxidativo presente na diabetes.

4.1.2.4 Subnetwork 4

Essa subnetwork (Fig. 5), com 5 nodos, retrata essencialmente a β -oxidação (Hadh, Hadha, Etf) e enzimas que degradam metabólitos derivados da oxidação lipídica (Aldh2, Aldh7a1). Todas se encontram super expressas, indicando a super ativação dessas vias.

Figura 5 - Subnetwork 4 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD1e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo diabético em relação ao controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Aldh2	P47738	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	1,38
Aldh7a1	Q9DBF1	<i>Alpha-aminoacidipic semialdehyde dehydrogenase</i>	1,43
Etf	Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>	1,16
Hadh	Q61425	<i>Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase</i>	1,40

A Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase (Hadh) catalisa duas das quatro reações da via de β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia longa. A Enzima trifuncional subunidade alfa (Hadha) catalisa as três últimas das quatro reações da via da β -oxidação mitocondrial. A via de β -oxidação mitocondrial é o principal processo de produção de energia nos tecidos e é realizada através de quatro reações consecutivas que quebram os ácidos graxos em acetil-CoA. Independentemente da subunidade beta, a subunidade enzimática trifuncional alfa/Hadha também possui atividade de monolisocardiopina aciltransferase, fundamental na apoptose e suporta os complexos da cadeia respiratória mitocondrial na geração de ATP, incluindo a EtfA.

A Aldeído desidrogenase (Aldh2) está envolvida na etapa 2 da subvia que sintetiza o acetato a partir do etanol, responsável por reduzir a toxicidade de aldeídos. A Semialdeído desidrogenase alfa-aminoadípico (Aldh7a1) é uma enzima multifuncional mediadora de importantes efeitos protetores. Protege as células do estresse oxidativo metabolizando vários aldeídos derivados da peroxidação lipídica.

Então, essa rede de interação reforça o aumento da via β -oxidação, e do estresse oxidativo, possivelmente causado pela hiperglicemia induzidos pela STZ em relação ao grupo controle.

De modo geral, foram observadas nas subnetworks, alterações em proteínas do metabolismo de carboidratos (Aco2, Got1, Mdh1 e Sord), oxidação de lipídios (Acaa1a, Acs11, Acs15, Hadh, Hadha, EtfA), metabolismo xenobiótico (Cyb5r3, Cyps, Ephx1 e Fmo5), fosforilação oxidativa (Ndufs1, Sdha, Uqcrc2, Atp5j2 e Atp5dp), transporte de ADP/ATP (Slc25a4, Slc25a5) e antioxidante (Prdx1 e Nmes, Aldh2, Aldh7a1).

4.2 CD2 vs. CND

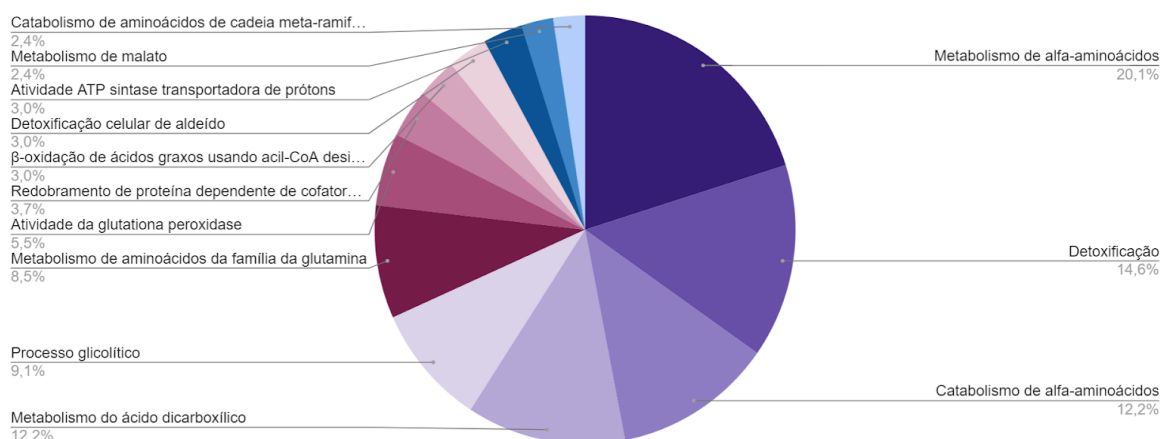
A comparação entre o grupo CD2 e CND, mostra os efeitos da diabetes mellitus tipo 2 induzida por STZ e dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle. Foram registradas 232 proteínas com alteração de expressão nesta comparação, das quais 44 foram subexpressas e 188 superexpressas. Na análise de processos biológicos (item 4.2.1.) foi registrado alterações no metabolismo de aminoácidos (alfa-aa e família da glutamina), principalmente da via

catabólica (alfa-aa e cadeia meta-ramificada de malato), e metabolismo detoxificante e antioxidante. A análise de networks (item 4.2.2.) suportou os sistemas antioxidantes de choque térmico e responsivas ao estresse, além destes, apresentou alterações do metabolismo de lipídio, principalmente da β -oxidação, além metabolismo do oxaloacetato e da degradação da isoleucina, leucina e valina, e algumas proteínas da resposta à insulina e da gliconeogênese. Também foram alterados o ciclo do ácido tricarbóxico e a cadeia de transporte de elétrons.

4.2.1 Processos Biológicos da Comparação CD2 e CND

A comparação entre o grupo CD2 e controle (CND) mostra os efeitos do diabetes tipo 2, STZ e dieta hiperlipídica, em relação ao grupo controle. Os processos biológicos alterados estão representados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos CD2 e o grupo com CND. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.



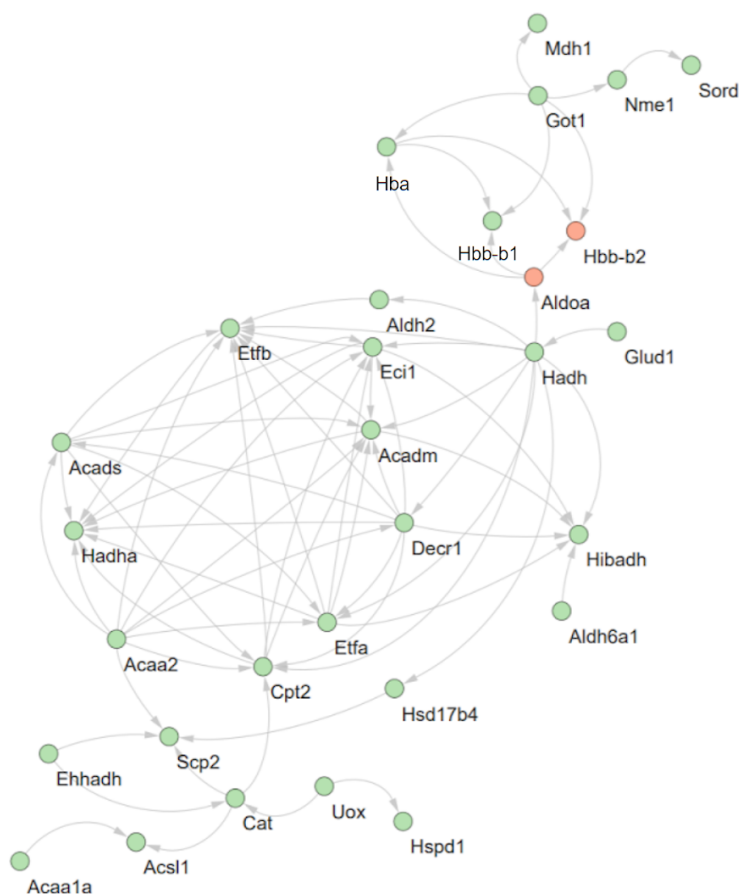
Metabolismo de alfa-aminoácidos (20,12% - GO:1901605), detoxificação (14,63% - GO:0098754), catabolismo de alfa-aminoácidos (12,19% - GO:1901606), metabolismo do ácido dicarbóxico (12,19% - GO:0043648), processo glicolítico (9,146% - GO:0006096), metabolismo de aminoácidos da família da glutamina (8,53% - GO:0009064), atividade da glutatona peroxidase (5,48% - GO:0004602), redobramento de proteína dependente de cofator de chaperona (3,65% - GO:0051085), β -oxidação de ácidos graxos usando acil-CoA desidrogenase (3,04% - GO:0033539), detoxificação celular de aldeído (3,05% - GO:0110095), atividade ATP sintase transportadora de prótons, mecanismo rotacional (3,05% - GO:0046933), metabolismo do malato (2,43% - GO:0006108), catabolismo de aminoácidos de cadeia meta-ramificada de malato (2,43% - GO:0009083).

O metabolismo de aminoácidos foi muito presente nesses resultados (43,27%) - metabolismo de alfa-aminoácidos, catabolismo de alfa-aminoácidos, metabolismo de aminoácidos da família da glutamina, catabolismo de aminoácidos de cadeia meta-ramificada de malato. E o metabolismo detoxificante e antioxidante (26,81%) - detoxificação, atividade da glutathione peroxidase, redobramento de proteína dependente de cofator de chaperona, e detoxificação celular de aldeído. Isso pode ser resultante da depleção da glicose exógena acarretando no consumo de substratos intracelulares, o que conseqüentemente causa o aumento da produção de ROS e ativa os mecanismos antioxidantes.

4.2.2 Subnetworks da Comparação CD2 e CND

4.2.2.1 Subnetwork 1

Figura 6 - Subnetwork 1 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD2 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo tratado com dieta hiperlipídica e STZ em relação ao controle em relação ao grupo controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Acaa1a	Q921H8	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase A</i>	2,32
Acaa2	Q8BWT1	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	1,35
Acadm	P45952	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</i>	1,95
Acads	Q07417	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</i>	1,52
Acsl1	P41216	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i>	1,31
Aldh2	P47738	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	1,34
Aldh6a1	Q9EQ20	<i>Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]</i>	1,13
Aldoa	P05064	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	0,74
Cat	P24270	<i>Catalase</i>	1,35
Cpt2	P52825	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 2</i>	1,54
Decr1	Q9CQ62	<i>2,4-dienoyl-CoA reductase</i>	1,95
Eci1	P42125	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 1</i>	1,86
Ehhadh	Q9DBM2	<i>Peroxisomal bifunctional enzyme</i>	1,95

Etfa	Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>	1,43
Etfb	Q9DCW4	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	1,48
Glud1	P26443	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	1,34
Got1	P05201	<i>Aspartate aminotransferase</i>	2,27
Hadh	Q61425	<i>Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase</i>	1,90
Hadha	Q8BMS1	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha</i>	1,86
Hba	P01942	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	1,73
Hbb-b1	P02088	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	1,86
Hbb-b2	P02089	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	0,85
Hibadh	Q99L13	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase</i>	1,39
Hsd17b4	P51660	<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	1,32
Hspd1	P63038	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	1,19
Mdh1	P14152	<i>Malate dehydrogenase</i>	1,32
Nme1	P15532	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	2,01
Scp2	P32020	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	2,59
Sord	Q64442	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	1,46
Uox	P25688	<i>Uricase</i>	1,16

A subnetwork, apresentada na Figura 6, foi majoritariamente super regulada e apresenta muitas proteínas do metabolismo de lipídio, 16 das 30 proteínas participam da β -oxidação (Etfa, Etfb, Hibadh, Eci, Decr1, Acads, Acadm, Cpt2, Hadh, Ehhadh, Acaa1a, Acaa2, Hsd17b4, Acs11, Scp2, Aldh6a1). São proteínas da degradação da isoleucina, leucina e valina: Hadh, Hadha, Acadm, Acads, Acaa2, Hibadh, Aldh2, Acaa1a, Ehhadh, Aldh6a1. Ainda há proteínas de metabolismo do oxalacetato (Etfa, Etfb, Hibadh, Eci, Decr1, Acads, Acadm, Cpt2, Hadh, Ehhadh, Acaa1a, Acaa2, Hsd17b4, Acs11, Scp2, Aldh6a1, Got1, Mdh1). A Got1, Cat, Hadha e Hadh fazem parte da resposta à insulina. A Got1, Mdh1 e AldoA realizam a gliconeogênese. A Hibadh e Aldh6a1 são proteínas do catabolismo da valina. É possível observar ainda proteínas do catabolismo do glutamato (Glud1, Got1), do metabolismo da frutose (Sord e AldoA).

Outras enzimas da β -oxidação são, a 2,4-dienoil-CoA redutase (Decr1), a Enoil-CoA delta isomerase 1 (Eci1), a enzima bifuncional peroxissomal (Ehhadh), a Enzima multifuncional peroxissomal tipo 2 (Hsd17b4), a proteína de transferência de lipídios não específica (Scp2). A carnitina O-palmitoil transferase 2 (Cpt2) atua na absorção mitocondrial de ácidos graxos, essencial para β -oxidação. Todas estavam com a expressão aumentada indicando um aumento nesta via metabólica.

A Etf α e a subunidade beta de flavoproteína de transferência de elétrons (Etf β) aceitam elétrons de várias desidrogenases mitocondriais, estes transferem os elétrons para a principal cadeia respiratória mitocondrial via ETF-ubiquinona oxidorreductase, necessário para oxidação normal de ácidos graxos mitocondriais e metabolismo normal de aminoácidos. A Hadha, também é importante na transferência de elétrons na cadeia respiratória. Assim como observado para as outras proteínas essas também estavam com expressão aumentada.

As enzimas que auxiliam a produção da glicose são a Aspartato aminotransferase (Got1) atua na biossíntese de L-glutamato, envolvida na síntese hepática de glicose estava com uma aumentada consideravelmente em contrapartida a aldolase A de frutose-bifosfato (Aldoa), fundamental na glicólise e na gliconeogênese apresentou redução em sua expressão.

Algumas proteínas alteradas com atividade antioxidante foram Aldh2, Hadha, e a catalase (Cat), enzima antioxidante chave na defesa do organismo contra o estresse oxidativo, presente no peroxissomo de quase todas as células aeróbicas apresentaram aumento de expressão, indicativo de estresse oxidativo. A proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial (Hspd1), também com expressão aumentada, ainda previne o dobramento incorreto e promove o redobramento e a montagem adequada de polipeptídeos desdobrados gerados sob condições de estresse na matriz mitocondrial, organela mais afetada nesta patologia (SIVITZ; YOREK, 2010).

Essa subnetwork possui proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. A metilmalonato semialdeído desidrogenase [acilante] (Aldh6a1) e a 3-hidroxiisobutirato desidrogenase (Hibadh) desempenham papel no metabolismo da valina e da pirimidina. E a uricase (Uox) faz parte da via de degradação do urato, que faz parte do metabolismo das purinas. O aumento da sua expressão está ligado ao aumento no metabolismo de aminoácidos.

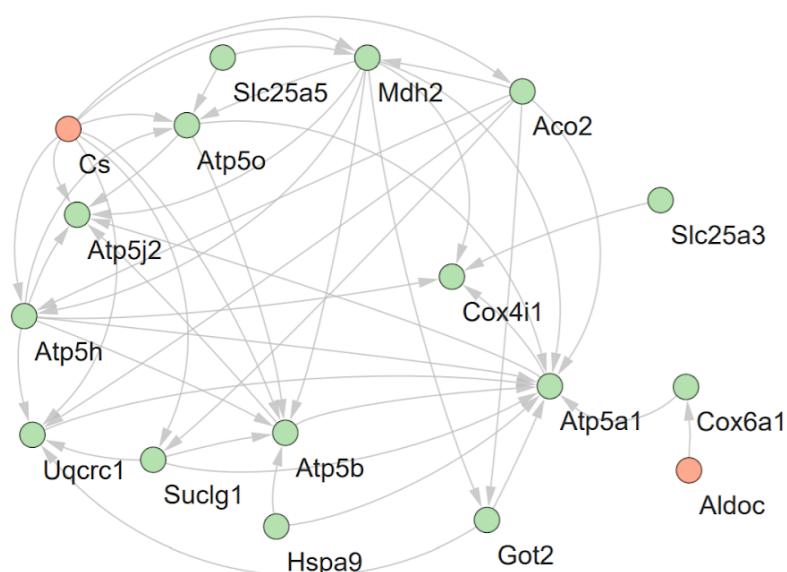
A Sorbitol desidrogenase (Sord) é uma enzima chave na via do polioliol, rota alternativa para o metabolismo da glicose.

Portanto, essa rede de interação evidencia claramente o aumento da oxidação lipídica, alteração característica do DM2. Explicada pela demanda por energia e a insuficiência de glicose exógena aumentaram o consumo dos substratos internos como os lipídios e proteína acarretando a superregulação da produção de glicose hepática, cadeia respiratória e dos intermediários do TCA, ao mesmo passo que essa sobrecarga metabólica causa o dobramento

incorreto de proteínas e aumento da produção de ROS, consequentemente elevam-se os mecanismos de defesa.

4.2.2.1 Subnetwork 2

Figura 7: Subnetwork 2 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD2 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo tratado com dieta hiperlipídica e STZ em relação ao controle em relação ao grupo controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Aco2	Q99KI0	<i>Aconitate hydratase</i>	1,30
Aldoc	P05063	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	0,50
Atp5f1a	Q03265	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	1,43
Atp5f1b	P56480	<i>ATP synthase subunit beta</i>	1,39
Atp5pd	Q9DCX2	<i>ATP synthase subunit d</i>	1,88
Atp5mf	P56135	<i>ATP synthase subunit f mitochondrial</i>	1,39
Atp5o	Q9DB20	<i>ATP synthase subunit O</i>	1,35
Cox4i1	P19783	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform</i>	1,31
Cox6a1	P43024	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6A1</i>	1,35
Cs	Q9CZU6	<i>Citrate synthase</i>	0,44
Got2	P05202	<i>Aspartate aminotransferase</i>	1,25
Hsp90ab1	P11499	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	1,17
Hspa9	P38647	<i>Stress-70 protein mitochondrial</i>	1,58
Mdh2	P08249	<i>Malate dehydrogenase</i>	1,38

Slc25a3	Q8VEM8	<i>Phosphate carrier protein</i>	1,88
Slc25a5	P51881	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	1,65
Suclg1	Q9WUM5	<i>Succinate-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha</i>	1,49
Uqcrc1	Q9CZ13	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1</i>	1,27

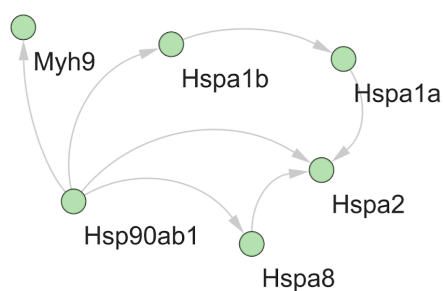
Essa subnetwork (Fig. 7) possui 18 nodos, cujas proteínas pertencem majoritariamente ao Ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia de transporte de elétrons (Atp5a1, Atp5b, Aco2, Uqcrc1, Mdh2, Cox6a1, Atp5h, Cs, Cox4i1, Suclg1, Atp5o, Atp5j2, Slc25a5). A Got2, Aldoc, Mdh2 auxiliam na gliconeogênese. Essa subnetwork reforça os resultados anteriores acerca da super ativação dessas vias e sobrecarga metabólica.

A Aldolase C de frutose-bifosfato (Aldoc) participa da glicólise, que no presente trabalho se encontra sub regulada, assim como a citrato sintase (Cs) essencial para a síntese de novo de colesterol e ácidos graxos. A sub-regulação da Citrato sintase tem sido consistentemente associada ao DM2, já que sua atividade indica o conteúdo proteico mitocondrial (YURRE, *et al.*, 2020).

4.2.2.1 Subnetwork 3

Cinco das seis proteínas deste cluster são de choque térmico (Fig. 8) atuam no “redobramento” de proteínas. São proteínas responsivas ao estresse e ao mal dobramento de proteínas. Além disso são ativadas em resposta à inflamação, geralmente superexpressas tanto no DM1 e DM2, efeito esperado nessa patologia reforçando o sucesso do modelo em simular a inflamação no fígado (BELINI *et al.*, 2017).

Figura 8 - Subnetwork 3 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD2 e CND. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo tratado com dieta hiperlipídica e STZ em relação ao controle em relação ao grupo controle. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Hspa1a	Q61696	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	1,38
Hspa1b	P17879	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	1,38
Hspa2	P17156	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	1,32
Hspa8	P63017	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	1,40
Myh9	Q8VDD5	<i>Myosin-9</i>	4,14

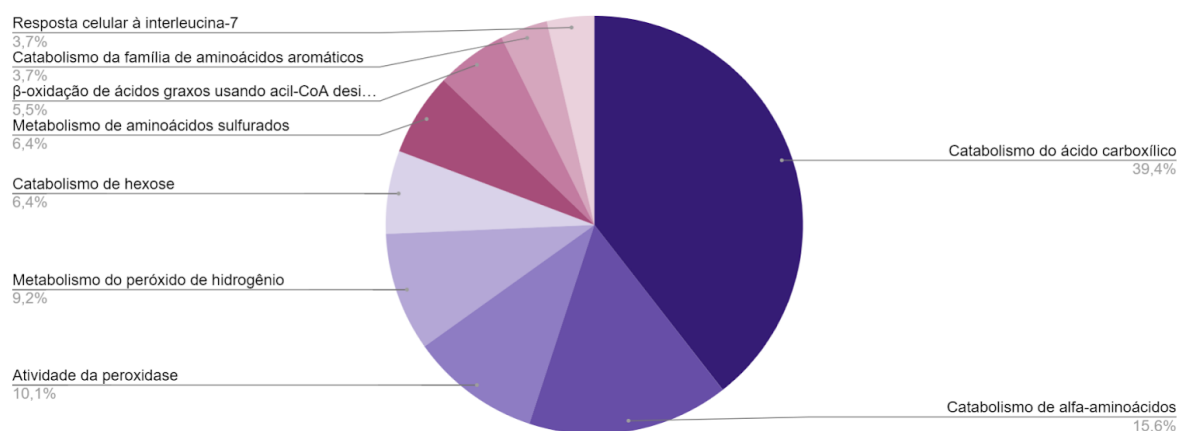
4.3 CD2 vs. CD1

A comparação entre o grupo CD2 e CD1 mostra os efeitos da dieta hiperlipídica apesar da administração da STZ. Foram alteradas 174 proteínas, das quais 35 estavam subreguladas e 139 superreguladas. Os processos biológicos (item 4.3.1.) com mais proteínas alteradas foram o catabolismo do ácido carboxílico (lipídios), principalmente na β -oxidação, o catabolismo de aminoácidos, e a atividade antioxidante. A análise das subnetworks (item 4.3.2.) reforça as alterações dos processos biológicos, sendo a maior parte das proteínas superreguladas relacionadas à β -oxidação, e muito associadas à degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, lisina e triptofano. Ainda se observa a superexpressão do TCA e fosforilação oxidativa.

4.3.1 Processos Biológicos da Comparação CD2 e CD1

Os processos biológicos com maior número de genes associados na comparação entre o grupo CD2 em relação ao CD1, ressaltando os efeitos da dieta hiperlipídica, estão apresentados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Análise funcional da comparação entre os animais dos grupos CD2 e o grupo com CD1. As categorias estão apresentadas com base na ontologia gênica, de acordo com a função biológica de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0. Somente termos significativos foram utilizados ($\kappa = 0,04$) e a distribuição foi feita de acordo com a porcentagem do número de genes associados a cada termo.



Catabolismo do ácido carboxílico (39,45% - GO:0046395), catabolismo de alfa-aminoácidos (15,60% - GO:1901606), atividade da peroxidase (10,09% - GO:0004601), metabolismo do peróxido de hidrogênio (9,17% - GO:0042743), catabolismo de hexose (6,42% - GO:0019320), Metabolismo de aminoácidos sulfurados (6,42% - GO:0000096), β-oxidação de ácidos graxos usando acil-CoA desidrogenase (5,50% - GO:0033539), processo catabólico da família de aminoácidos aromáticos (3,67% - GO:0009074), resposta celular à interleucina-7 (3,67% - GO:0098761).

O catabolismo do ácido carboxílico e β-oxidação de ácidos graxos usando acil-CoA desidrogenase tem a maior porcentagem de genes associados (44,95%) [Acaa1a, Acaa1b, Acaa2, Acadl, Acadm, Acads, Acat1, Acat2, Acox1, Acsl5, Ahcy, Akr1d1, Aldh1l1, Aldh4a1, Aldh6a1, Arg1, Ces1d, Dbi, Decr1, Echs1, Eci1, Ehhadh, Etfa, Etfb, Fabp1, Ftcd, Gcdh, Glud1, Got1, Got2, Haao, Hadha, Hadhb, Hgd, Hibadh, Hpd, Hsd17b4, Mat1a, Oat, Otc, Pah, Sardh, Scp2].

O catabolismo de aminoácidos - alfa-aminoácidos e da família de aminoácidos aromáticos - contém 19,27% dos genes associados. [Acat1, Ahcy, Aldh4a1, Aldh6a1, Arg1, Glud1, Got1, Got2, Haao, Hgd, Hibadh, Hpd, Mat1a, Oat, Otc, Pah, Sardh].

A atividade antioxidante - atividade da peroxidase e metabolismo do peróxido de hidrogênio - somaram 19,26% dos genes associado [Acox1, Cat, Gpx1, Gstm7, Gstp1, Gstp2, Hba-a1, Hbb-b2, Hbb-bs, Hbb-y, Prdx1, Prdx6, Sod1].

O catabolismo de hexose, é constituído por proteínas superreguladas envolvidas na degradação de carboidratos [Aldob, Eno1b, Eno2, Gpi1, Khk, Ldha, Tkfc].

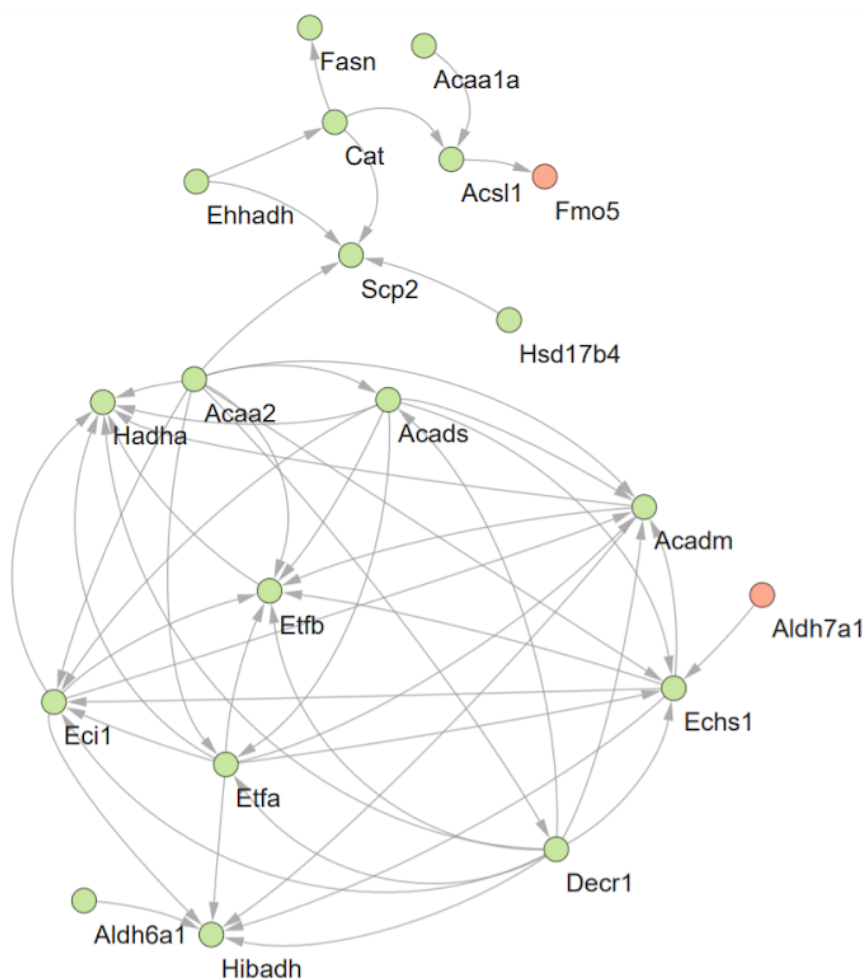
Metabolismo de aminoácidos sulfurados [Bhmt, Bhmt2, Cps1, Cth, Gnm1, Mat1a, Tst]. A resposta celular à interleucina-7, se refere à inflamação, característica do diabetes. As proteínas associadas a esse processo estão todas superreguladas [Atp5b, Eno1b, Hspd1, P4hb] (SCHREIBER *et al.*, 2019).

4.3.2 Subnetworks da Comparação CD2 e CD1

4.3.2.1 Subnetwork 1

Essa subnetwork (Fig. 9) possui 20 nodos, dos quais 18 são super regulados e apenas 2 sub regulados (Aldh7a1 e Fmo5). A maior parte das proteínas relacionadas à β -oxidação (Acaa1a, Aldh6a1, Decr1, Acadm, Hsd17b4, Echs1, Hibadh, Hadha, Eci1, Etfb, Etf, Scp2, Ehhadh, Acads, Acaa2, Fasn). Ainda há grande interação com a degradação de isoleucina, valina e leucina, também conhecido como aminoácidos de cadeia ramificada (Acaa2, Acads, Acadm, Aldh6a1, Hadha, Echs1, Ehhadh, Acaa1a, Hibadh, Aldh7a1). Algumas das proteínas desse cluster ainda auxiliam a degradação da lisina e triptofano (Hadha, Echs1, Ehhadh, Aldh7a1, Cat). Portanto, essa subnetwork mostra a superregulação da degradação de lipídios e aminoácidos.

Figura 9 - Subnetwork 1 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD2 e CD1. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo tratado com dieta hiperlipídica e STZ em relação ao controle em relação ao grupo tratado apenas com STZ. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Acaa1a	Q921H8	3-ketoacyl-CoA thiolase A	1,72
Acaa2	Q8BWT1	3-ketoacyl-CoA thiolase	1,30
Acadm	P45952	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	1,39
Acads	Q07417	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	1,52
Acsl1	P41216	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	1,60
Aldh6a1	Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	1,13
Aldh7a1	Q9DBF1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	0,79
Cat	P24270	Catalase	1,34
Decr1	Q9CQ62	2,4-dienoyl-CoA reductase	1,90

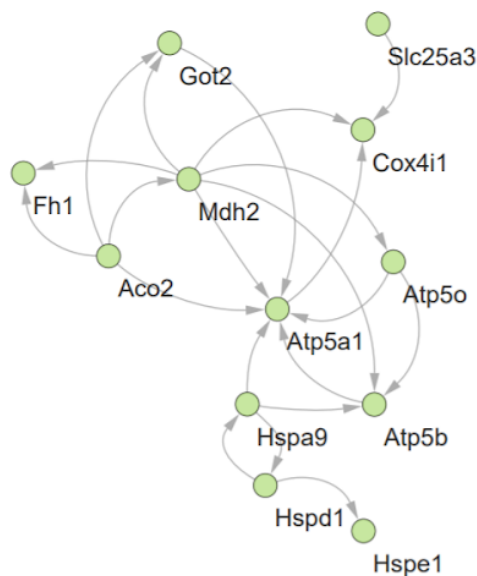
Echs1	Q8BH95	<i>Enoyl-CoA hydratase</i>	1,90
Eci1	P42125	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 1</i>	2,10
Ehhadh	Q9DBM2	<i>Peroxisomal bifunctional enzyme</i>	1,75
Etfa	Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>	1,22
Etfb	Q9DCW4	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	1,48
Fasn	P19096	<i>Fatty acid synthase</i>	1,63
Fmo5	P97872	<i>Flavin-containing monooxygenase 5</i>	0,65
Hadha	Q8BMS1	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha</i>	1,51
Hibadh	Q99L13	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase</i>	1,57
Hsd17b4	P51660	<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	1,70
Scp2	P32020	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	2,05

A Ácido graxo sintase (**Fasn**) que estava com sua expressão aumentada é uma enzima multifuncional que catalisa a biossíntese de novo de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir de acetil-CoA e malonil-CoA na presença de NADPH. Reforçando a ideia do aumento da lipogênese durante o DM.

4.3.2.2 Subnetwork 2

Essa subnetwork contém 12 nodos, todos super regulados (Fig. 10) cujas proteínas participam do TCA (Mdh2, Aco2, Fh1), de dobramento correto de proteínas (Hspd1, Hspa9, Hspe1), metabolismo de glioxilato e dicarboxilato (Aco2, Mdh2), fosforilação oxidativa (Cox4i1, Atp5b, Atp5a1, Atp5o) e metabolismo de cisteína e metionina (Mdh2, Got2).

Figura 10 - Subnetwork 2 gerada pelo plugin ClusterMaker® mostrando as interações entre as proteínas com diferença de expressão entre os grupos CD2 e CD1. As cores indicam a subregulação (rosa) ou super-regulação (verde claro) do grupo tratado com dieta hiperlipídica e STZ em relação ao controle em relação ao grupo tratado apenas com STZ. Razão >1 indica superregulação e <1 sub regulação.



Gene	ID	Nome	Razão
Aco2	Q99KI0	<i>Aconitate hydratase</i>	2,12
Atp5f1a/ Atp5a1	Q03265	<i>ATP synthase subunit alpha</i>	1,26
Atp5f1b	P56480	<i>ATP synthase subunit beta</i>	1,25
Atp5po	Q9DB20	<i>ATP synthase subunit O</i>	1,42
Cox4i1	P19783	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform</i>	1,39
Fh	P97807	<i>Fumarate hydratase</i>	1,32
Got2	P05202	<i>Aspartate aminotransferase</i>	1,45
Hspa9	P38647	<i>Stress-70 protein mitochondrial</i>	1,13
Hspd1	P63038	<i>60 kDa heat shock protein mitochondrial</i>	1,13
Hspe1	Q64433	<i>10 kDa heat shock protein</i>	1,79
Mdh2	P08249	<i>Malate dehydrogenase</i>	1,32
Slc25a3	Q8VEM8	<i>Phosphate carrier protein</i>	2,12

A Proteína de choque térmico de 10 kDa (**Hspe1**) é uma co-chaperona na importação de proteínas mitocondriais e na montagem macromolecular. Juntamente com a Hsp60, facilita o dobramento correto de proteínas importadas. Também pode prevenir o dobramento

incorreto e promover o redobramento e a montagem adequada de polipeptídeos desdobrados gerados sob condições de estresse na matriz mitocondrial.

4.4 Visão Geral

Além dessas análises, se observam proteínas com alterações no Apêndice. Ao todo foram analisadas 320 proteínas com alteração de expressão em pelo menos uma comparação, dentre elas, 57 foram alteradas em todas as comparações. 13 dessas proteínas foram sub reguladas em CD2 vs. CD1, com a predominância de metabolismo de aminoácidos alterados, especificamente da glutatona. A outras 44 proteínas foram super reguladas, principalmente do metabolismo do piruvato relacionada ao catabolismo de lipídios, glicólise e gliconeogênese. 16 proteínas tiveram expressão $<1,5$ tanto em CD1:CND, quanto em CD2:CND, voltada para o metabolismo da glicólise, gliconeogênese e TCA (Bhmt, Eno1, Atp5pd, Esd, Hadh, Bhmt2, Slc25a5, Ces2e, Me1, Mtco2, Aldh1b1, Slc25a31, Rida, Ldhc, Gsta2, Gstm5).

De modo resumido, o grupo CD1 e CD2 apresentaram alteração no metabolismo de carboidratos e a superregulação da detoxificação, β -oxidação, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e transporte de elétrons na cadeia respiratória. De acordo com a análise comparativa entre o CD2 e o CD1, a dieta hiperlipídica parece potencializar as alterações metabólicas observadas no grupo que apenas recebeu a injeção de STZ e dieta padrão, adicionalmente afeta de forma significativa o catabolismo de aminoácidos, e a resposta ao estresse celular. Long e colaboradores (2020) exaltaram a importância e consistência da alteração em aminoácidos, principalmente os aromáticos e de cadeia ramificadas no DM2.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho aplicou um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2, neste modelo foi preconizado dois pontos importantes primeiro a indução de uma obesidade que levasse a uma resistência insulínica e depois a aplicação de pequenas doses de SZT para gerar a predisposição a diabetes com a redução das ilhotas e conseqüentemente a redução da produção de insulina. Em contrapartida um grupo com uma dieta padrão também foi utilizado, esse por sua vez não teve a indução da resistência inicial e apenas a aplicação de doses de SZT (CD1). Neste contexto se buscou entender a importância da presença da dieta hipercalórica para gerar um quadro padrão de diabetes tipo 2 mais próximo ao que ocorre naturalmente. A análise proteômica do fígado pode identificar e embasar esse modelo visto que os resultados das alterações demonstram um perfil compatível com a literatura e outros trabalhos com animais induzidos a DM2.

Dois trabalhos com induções de DM2 diferentes e análise proteômica do fígado com composição de proteínas detectadas parecidas foram utilizados para comparação com o presente estudo, o Guo *et al.* (2013) e Deng *et al.* (2010), as pesquisas apresentaram alterações proteômicas semelhantes a estes resultados. O trabalho de Guo *et al.* (2013) com mitocôndrias, também obteve a superexpressão da β -oxidação, da Oxphos, via apoptótica, proteínas envolvidas na importação de proteínas para as mitocôndrias, biogênese mitocondrial, e do ciclo do ácido cítrico (Acadm, Ehhadh, Hadh, Hadha, Hadhb, Aldh1b1, Aldh2, Aldh7a1, Cpt1a, Cpt2, Acaa2, Acsl6 e Dci). As proteínas registradas por Guo e colaboradores e suas expressões correspondem com o encontrado neste trabalho, em relação ao DM2. Eles, também relataram o aumento na expressão da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (Aldh1b1, Aldh2, Aldh6a1, Aldh7a1, Acadm, Ehhadh, Hadh, Hadha, Ivd, Hadhb, Hmgcs2, Auh, Acaa2 e Pcca). Outro metabolismo superexpresso é o do piruvato (Pdha1, Pdhb, Dlat, Pcx, Mdh2, Aldh1b1, Aldh2 e Aldh7a1) (GUO *et al.*, 2013).

Desse modo infere-se que as alterações aqui observadas correspondem com o sucesso da implementação do modelo de indução da DM2 com a presença de várias alterações comuns no presente trabalho com relatos da literatura. Contudo, vamos detalhar melhor estas alterações, colocando subtópicos que possam descrever melhor quais são estas alterações e os pontos mais relevantes destas alterações para metabolismo hepático.

5.1 Proteínas do Metabolismo Energético Hepático

Zhang e colaboradores (2013) ainda apontaram algumas enzimas chave no metabolismo do glicogênio no fígado, como a glicogênio fosforilase (Pygl ou GPa). Para a glicogenólise foi indicado a frutose1,6-bisfosfatase (Fbp1) e glicose-6-fosfatase (G6pase, G6pc); na via da gliconeogênese e glucoquinase (GK/HK, Gck). No presente trabalho, a Pygl foi levemente super regulada no CD2 em relação ao CND (1,17) e na comparação entre CD2 e CD1 (1,22), já a Fbp1 foi super expressa em todas as comparações com maior diferença no CD2 *versus* CND (42,52). Algumas enzimas glicolíticas e lipogênicas como a piruvato quinase Pkm e Pklr foram super reguladas, a Pkm apenas no CD2:CND (2,25), e o Pklr em CD2:CND (2,83) e CD2:CD1 (2,56). Outra enzima glicolítica super expressa é a Glicose-6-fosfato isomerase (Gpi) no CD2:CND (2,75), e CD2:CD1 (1,97). A enzima lipogênica FASN, também foi super regulada em CD1:CND (1,30), CD2:CND (1,63) e em CD2:CD1 (2,23). Portanto, essas proteínas integrantes tanto da via glicolítica quanto da gliconeogênica mostram alterações consistentes com o metabolismo diabético, devido ao contexto da patologia infere-se que houve aumento do processo da gliconeogênese.

Em condições de resistência à insulina, o piruvato é usado para gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, em vez de geração de ATP, que é promovida pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), resultando em hiperglicemia e esteatose hepática. O ciclo do TCA é afetado pelo DM, já que a atividade glicolítica é enfraquecida durante o desenvolvimento do DM. A ativação do complexo piruvato desidrogenase promove a conversão do piruvato em acetil-CoA (CAPPEL *et al.*, 2019). Neste experimento, a piruvato carboxilase (Pc), enzima importante na via anaplerótica pela reposição de alanina e lactato no ciclo do TCA, foi super expressa em todas as comparações, CD1:CND (1,28), CD2:CND (1,65), e em CD2:CD1 (2,16), caracterizando o acentuamento da gliconeogênese.

Durante a DM2 a hiperglicemia é agravada pelo aumento tanto da lipogênese e da gliconeogênese. Uma explicação para esse desbalanço entre a gliconeogênese e a lipogênese é a resistência à insulina hepática seletiva, esta postula que apenas um braço da sinalização da insulina é defeituoso, ou seja, a falta de insulina inibe a via do Akt/FOXO1 estimulando a gliconeogênese, enquanto a via SREBP-1C/mTORC1 ativada pela insulina permanece intacta e ativa a lipogênese. O aumento da geração de acetil-CoA a partir da β -oxidação ativa a enzima piruvato carboxilase (Pc), levando a gliconeogênese exacerbada (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; ATHYROS *et al.*, 2018). Isso é claramente refletido nos resultados deste

trabalho, observado pela grande superexpressão da via β -oxidativa e de enzimas da gliconeogênese. Algumas enzimas promotoras da FoxO1 e AKT são a Peptidil-prolil cis-trans isomerase A (Ppia), superexpressa em CD1:CND (1,46) e CD2:CND (1,67) e o receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (Fgfr3) superregulado em CD2:CND (2,66), a enzima Serina/treonina-proteína quinase (Nek2), também pode ativar a via AKT, esta é superregulada em CD1:CND (2,46).

Desse modo, o metabolismo energético hepático sofreu alterações evidentes, como foram apresentadas, de acordo com o apontado na literatura, pelo aumento da degradação de substratos alternativos como proteínas e lipídios, além da elevação da gliconeogênese.

5.2 Hiperglicemia

O fígado humano produz glicose (HGP), seja a partir de glicogênio previamente armazenado por meio da glicogenólise (ciclo G/G6P) ou gerando glicose a partir de precursores como alanina, lactato e glicerol (gliconeogênese). A HGP ainda é associada ao aumento da lipólise, causadora da redução na utilização periférica da glicose e do comprometimento da função das células- β , isso eleva os níveis de AGL, juntamente com o acúmulo de metabólitos lipídicos intermediários (SOLIS-HERRERA *et al.*, 2008). Durante o jejum a taxa acelerada de HPG é o principal determinante da hiperglicemia (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; ATHYROS *et al.*, 2018). O aumento da produção de glicose hepática é uma característica consistente do DM e grande contribuinte para hiperglicemia, esta é atribuída principalmente ao aumento da gliconeogênese em contrapartida às taxas normais de glicogenólise. (JIANG *et al.*, 2020).

A hiperglicemia estimula o aumento da razão NADH/NAD⁺, a superregulação da via da hexosamina, a ativação da proteína quinase C, a via do poliol (Sord) causando acúmulo de frutose (Fbp1, Gpi), sorbitol e metilglioxal, ainda eleva os produtos de glicação avançada (AGEs), formação de enodiol e estresse de retículo endoplasmático (RE). A alteração dessas vias culmina na geração de espécies reativas de oxigênio e aumento do estresse oxidativo levando a danos nas células- β (FURMAN, 2021; YAN; WU, 2015). A ATPase do retículo endoplasmático de transição (Vcp) exerce muitas funções no RE, além disso atua no sistema ubiquitina-proteassoma e na homeostase do cálcio, nesta análise, essa proteína foi significativamente sub expressa em CD1:CND (0,46) e superexpressa em CD2:CND (1,70)

(SUN; QIU, 2020). A VCP ainda é considerada uma proteína supressora de tumor, que quando sub regulada induz apoptose, e quando super regulada induz a produção de defeituosas (CONSTANTINI *et al.*, 2021). Logo, considera-se que a superexpressão dessa proteína, VCP, no grupo CD2 suporta a ideia do aumento de proteínas danificadas e possivelmente da presença de lesões hepáticas neste grupo.

O aumento da geração de AGEs, formados pela glicação (associação com açúcar) de proteínas ou lipídios, também contribui para glicotoxicidade da hiperglicemia, pois são conhecidos como glicotoxinas por apresentarem alto potencial oxidativo, estimulando o estresse oxidativo e inflamação, muitas vezes associados ao diabetes. Alguns substratos que podem ser glicosilados são a albumina, colágeno, fibrinogênio e imunoglobulina (MANNA; GHOSH; SIL, 2010; SINGH *et al.*, 2014; URIBARRI *et al.*, 2010). Algumas proteínas associadas a esses substratos, neste trabalho, são as proteínas de adesão neurexin-1-beta (Nrxn1) (CD2:CND=2,83), também podem ser glicadas as proteínas estimulantes de imunoglobulina, como a alfa-enolase (Eno1) superregulada em todas as comparações (CD1:CND=1,60; CD2:CND=1,77; CD2:CD1=1,13) e a colágeno alfa (Col4a1), CD1:CND = 9,58. Dessa forma, a alteração dessas proteínas que são substratos da glicação indica o aumento da glicotoxicidade nos grupos diabéticos em relação ao controle pelo possível aumento do processo de produção de AGES.

Portanto, a hiperglicemia está extremamente relacionada ao comprometimento do metabolismo hepático, com indicações da glicotoxicidade e provável lesão nesse órgão.

5.3 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio redox, ou seja, a produção de estresse oxidativo (ROS), é o principal causador da glicotoxicidade da hiperglicemia, e se origina principalmente no complexo I pela superprodução de NADH, e FADH₂ e no complexo III da cadeia transportadora de elétrons (ETC). O excesso de elétrons é transferido para o oxigênio gerando O₂⁻ e subsequente peróxido de hidrogênio. As espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas nas mitocôndrias oxidam os resíduos de cisteína e metionina nas proteínas, danificando a estrutura das proteínas, isso prejudica sua função e eventualmente causa a morte celular. As EROs ainda danificam o DNA e os lipídios da membrana, assim promove a disfunção mitocondrial. O desequilíbrio também ocorre pelo esgotamento de NAD⁺. O NADH e FADH₂ são formados pela ativação da via do poliol, ou pela conversão do piruvato em CO₂, na qual são gerados acetil-CoA e

oxaloacetato que alimentam o ciclo do ácido cítrico (DEWIDAR *et al*, 2020; FURMAN, 2021; MANNA; GHOSH; SIL, 2010; YAN; WU, 2015). A alteração no metabolismo mitocondrial é bem evidente ocupando grande parte das enzimas alteradas, que em sua maioria estão super reguladas neste trabalho, alguns exemplos são: Acaa2; Acadl; Acadm; Acads, Acat1, Aco2, Acsml, Agmat, Aldh1b1, Aldh1l2, Aldh2, Aldh4a1, Aldh6a1, Aralar2, Atp5fla, Atp5flb, Atp5mf, Atp5pd, Atp5po, Bdh1, Cox4i1, Cox6a1, Cps1, Cpt2, Cs, Decr1, Dmgdh, Echs1, Eci1, Etf, Etfb, Fh, Gcdh, Glud1, Got 2, Hadh, Hadha, Hadhb, Hibadh, Hmgcl, Hmgcs2, Hspa9, Hspd1, Hspe1, Mdh2, Mtco2, Ndufs1, Oat, Otc, Pc, Pcca, Prdx5, Sardh, Sdha, Slc25a3, Suclg1, Trap1, Uqcrc1, Uqcrc2. Deng e colaboradores (2010) também observaram a superexpressão em todos os 5 complexos enzimáticos da fosforilação oxidativa Ndufs, Sadh, Uqcr, Cox, Atp5a, Scl25. Já no presente trabalho foi observada a superregulação em 4 dos 5 complexos em todas as comparações, sendo o C-III sub regulado apenas na comparação CD2:CND. Os autores hipotetizaram que o aumento da oxidação de carboidratos e ácidos graxos induz o elevado fluxo através do TCA, este gera os equivalentes redutores (elétrons ou equivalentes) e ATP. Uma vez que a oxidação é aumentada ocorre a ativação coordenada da via fosforilação oxidativa impulsionada pelas demandas do aumento do fluxo para reduzir os equivalentes gerados no TCA (DENG *et al.*, 2010). Portanto, observa-se claramente a alteração do metabolismo mitocondrial.

O aumento da razão NADH/NAD⁺ observada no diabetes associada à deficiência de insulina sem diminuição da pressão parcial de oxigênio (po₂) tecidual é chamada de pseudo-hipóxia hiperglicêmica. Evidências sugerem que a glicoxidação, a pseudohipóxia hiperglicêmica ou ambas prejudicam a Aldh, que neste trabalho foram majoritariamente super reguladas, e levam ao acúmulo de peróxidos lipídicos no fígado de ratos diabéticos com deficiência de insulina, o que também foi corroborado por diversas proteínas alteradas já citadas (Acad, Etf, Aldh) (SIVITZ; YOREK, 2010). As Acil-CoA desidrogenases (Acad) de cadeia curta (Acads), média (Acadm), longa (Acadl) e muito longa (Acadvl) possuem pares redox que auxiliam na catálise de diferentes etapas da β-oxidação, são eles, as flavoproteína de transferência de elétrons (ETFs). A partir das flavoproteínas, os elétrons são transferidos à ubiquinona. As flavoproteínas são as principais geradoras de peróxido de hidrogênio durante esse processo, então quanto maior a atividade dessas enzimas, maior o estresse oxidativo causado (ZHANG *et al.*, 2019). Nesta pesquisa, essas proteínas foram superexpressos indicando esse aumento no estresse oxidativo.

O conteúdo de GSH também é reduzido nas mitocôndrias hepáticas de ratos diabéticos com STZ com deficiência de insulina. A redução de GSH foi associada ao aumento na expressão de glutathione peroxidase (GPx) aparentemente em compensação ao estresse oxidativo, a Gpx1 foi super expressa em CD2:CND. Curiosamente, as mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos obesos demonstraram aumento de GSH. Isso provavelmente mostra a diferença fisiopatologia diferente da deficiência de insulina em comparação com a obesidade e a resistência à insulina (SIVITZ; YOREK, 2010). Neste trabalho foi observado alterações variáveis das enzimas Gst, a Gstp1 e 2 e Gsta3 foram sub reguladas, com maior diferença no CD2:CND, já Gstm1, 2, 4 e 7 foram superexpressas em CD1:CND e em CD2:CND. A Gsta1, Gsta2 e Gstm5 estão super reguladas, principalmente em CD2:CND. Sendo assim, a regulação das enzimas glutathionas é alterada pela DM, e ainda é observado a acentuação dessas alterações no DM2.

5.4 Dieta Hiperlipídica

Em geral, tanto a hiperglicemia quanto os lipídios tóxicos como ceramidas, diacilgliceróis (DAG), AGL e colesterol podem induzir efeitos deletérios nas células hepáticas (glicolipotoxicidade), que estimulam a morte celular, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático (RE) e distúrbios mitocondriais (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2016; ATHYROS *et al.*, 2018; DEWIDAR, 2020). Randle *et al.* (1963) descreveu a relação competitiva de AGs e glicose para o ciclo oxidativo e propôs que a oxidação excessiva de ácidos graxos contribuiu para o comprometimento da homeostase da glicose e da resistência à insulina. O acúmulo intracelular de produtos de oxidação de AG, como diacilgliceróis, triacilgliceróis e ceramidas, também foi associado à resistência à insulina relacionados ao DM2 (CHEN; GERSZTEN, 2020; SOLIS-HERRERA *et al.*, 2008). A apolipoproteína A-I (Apoa1), é responsável pela captação de colesterol provindo de outros órgãos para o fígado e foi super regulada em CD2:CND (2,86). Associado a isso, aponta-se, também, a super regulação da regucalcina em 1,77 vezes no grupo CD2 em relação ao controle. Yamaguchi e Murata (2013) apontaram que a superexpressão de regucalcina endógena (Rgn) demonstrou diminuir os teores de triglicerídeos, colesterol total e glicogênio no fígado de ratos, induzindo hiperlipidemia. Wei e colaboradores (2019) apontaram que o excesso dessa proteína no sangue é um indicador de dano hepático, em pacientes com hepatite B, sendo sua concentração aumentada de acordo com a severidade da injúria no fígado, possivelmente

explicando sua superexpressão no fígado. Essa dinâmica da super regulação da Apoal e da Rgn pode sugerir um mecanismo compensatório da célula para “limpeza” do excesso de lipídios intracelulares.

Os subprodutos do metabolismo de AGL perturbam o fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória mitocondrial. Os AGLs, também, são incorporados nas membranas mitocondriais, favorecendo o vazamento de elétrons (SOLIS-HERRERA *et al.*, 2008). À medida que os níveis de nutrientes aumentam, a atividade da Sirt1 diminui e os processos oxidativos xenobióticos aumentam com o dobramento incorreto de proteínas relacionado à resistência à insulina, a Sirt1 foi exclusiva no grupo CD2 na comparação com CD2:CND e CD2:CD1 (*e.g.* Cyp2e1 aumentado em 1,55 na comparação CD2:CND) (KAKIZAKI *et al.*, 2008).

Outro importante fator é a formação de corpos cetônicos no fígado, observado no perfil do DM2, e resultado do comprometimento do metabolismo energético. Neste trabalho constataram-se 3 superexpressas em CD2:CND, a D-beta-hidroxiacetil-CoA desidrogenase (Bdh1) com razão igual a 1,90; a hidroximetilglutaril-CoA sintase (Hmgcs2) com razão igual a (2,53) e, a adenosilhomocisteínase (Ahecy) com razão igual a 1,28 (KOMOROWSKI *et al.*, 2021). A D-β-hidroxiacetil-CoA desidrogenase (Bdh1), é responsável pela produção de energia a partir do corpo cetônico β-hidroxiacetil-CoA, e o seu aumento pode estar associado a redução na sensibilidade à insulina comum a esta patologia (CHEN; GERSZTEN, 2020; ZAKARIA; KAMID; KHAYAT, 2021; STOJANOVIC; IHLE, 2011). O aumento da expressão dessas proteínas no grupo diabético tipo 2 ratifica que o excesso de ácidos graxos provindos da dieta e a depleção de glicose intracelular levam à utilização dos Acs como fonte primordial de energia, causando a produção e acúmulo de corpos cetônicos, e eventualmente, a acidose metabólica, característica do DM2.

Visto isso, o excesso de ácidos graxos intervém no metabolismo hepático sobrecarregando o fluxo oxidativo e acentuando a geração de estresse oxidativo e produtos tóxicos, como corpos cetônicos, além de agravar a resistência à insulina, como o esperado nessa patologia.

5.5 Novos Aminoácidos de Interesse

A S-adenosilmetionina sintase isoforma tipo-1 é a etapa limitante da taxa do ciclo da metionina e catalisa a formação de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de metionina e ATP. No contexto do metabolismo, SAM tem sido implicado no desenvolvimento de obesidade e diabetes e é o doador de metil na síntese de carnitina, que é necessária para transportar grupos acil de cadeia longa para as mitocôndrias para β -oxidação. Portanto, durante o diabetes, níveis suficientes de carnitina seriam necessários para atender às demandas metabólicas do fígado (PEDERSEN *et al.*, 2015). Consistente com isso foi registrado neste trabalho a superexpressão significativa da S-adenosilmetionina sintase isoforma tipo-1 (Mat1a) e tipo-2, (Mat2a) no grupo CD2 em relação ao controle, com as razões respectivas de 2,66 e 2,80, ainda na mesma comparação (CD2:CND), foi super regulada a Carnitina O-palmitoil transferase 2 - Cpt2 (1,54), responsável pela síntese de acilcarnitinas. Logo essas proteínas ainda ressaltam a alteração na β -oxidação.

O acúmulo de acilcarnitina (ACs) e de metabólitos da oxidação incompleta de BCAAs e de AG induzem IR, a Cpt2-enzima que sintetiza acilcarnitinas é super expressa em CD2:CND. O transporte de AGs na mitocôndria para a β -oxidação celular é facilitado pela formação de acilcarnitinas, logo o catabolismo de BCAA também leva à produção de espécies específicas de acilcarnitina (CHEN; GERSZTEN, 2020; LERIN *et al.*, 2016).

O glutamato e a glutamina são 2 aminoácidos centrais para o ciclo do nitrogênio (uréia), do carbono e ligados ao metabolismo do BCAA. O glutamato, sintetizado a partir do ciclo do ácido cítrico, e intermediário na geração do antioxidante glutatona foi positivamente associado à DM2. Nesta análise, o receptor ionotrópico de glutamato delta-1 foi (Grid1) 12,55 vezes mais expresso em CD2 em relação ao grupo controle, indicando o aumento na produção desse aminoácido. O glutamato, foi positivamente associado ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, já que a superregulação do TCA pelo excesso de ácidos graxos, causa o aumento de produção e acúmulo de glutamato e alanina (CHEN; GERSZTEN, 2020; FERRANNINI *et al.*, 2013; ZAKARIA; KAMID; KHAYAT, 2021). Uma proteína conectora do TCA e ciclo da ureia, que sintetiza o glutamato é a Delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (Aldh4a1), formimidoil transferase-ciclo deaminase (Ftcd), Got1 superexpressas em CD2:CND. Essas alterações corroboram a superregulação do glutamato.

Alguns BCAA como a serina, glicina, glutamina, acetoacetato apresentaram diferenças indiretas, por exemplo, a acilação da glicina pode ser relacionada à detoxificação

de xenobióticos, a glicina N-aciltransferase (Glyat) 2,61 vezes aumentado em CD2:CND. Outros BCAAs, como os aminoácidos aromáticos (AAAs), como a tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp) são conhecidos por estarem elevados no plasma sanguíneo e positivamente associados com RI e diabéticos e com a incidência de DM2, todavia estudos sobre os BCAAs ainda são escassos (ZAKARIA; KAMID; KHAYAT, 2021).

6 CONCLUSÃO

Por fim, observa-se a alteração de muitos processos biológicos e proteínas relevantes. Sendo as alterações mais claras no metabolismo energético, principalmente do metabolismo do piruvato relacionada ao catabolismo de lipídios, glicólise e gliconeogênese, além das alterações no TCA e oxidação fosforilativa, o grupo CD2 ainda mostrou grande alteração no metabolismo de aminoácidos. O modelo utilizado apresentou grande compatibilidade com outros trabalhos de indução de DM2. A dieta hiperlipídica foi um fator determinante para alterações características da diabetes mellitus tipo 2. Essa análise apresentou novos alvos para a compreensão do diabetes mellitus, principalmente relacionados aos aminoácidos de cadeia ramificada, além de iluminar possíveis novos protagonistas no metabolismo desta patologia, como as vias associadas à metionina, o glutamato e a regucalcina.

7 REFERÊNCIAS

- Acaa1a acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A [*Mus musculus* (house mouse)] - Gene - NCBI.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=113868>>
- ADEVA-ANDANY, M. M. *et al.* Liver glucose metabolism in humans. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, 2016.
- ADIGA, U.; P, K.; P.B, N. Association of Insulin Based Insulin Resistance with Liver Biomarkers in Type 2 Diabetes mellitus. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 1199–1205, 2019.
- ANDANA, J. Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. **Nutrition & Diabetes**, v. 9, n. 1, 2019.
- ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H.. Proteomics: Technologies and Their Applications, **Journal of Chromatographic Science**, Volume 55, Issue 2, 1 February 2017, Pages 182–196, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- ATHYROS, V. G. *et al.* Diabetes and lipid metabolism. **Hormones**, v. 17, n. 1, p. 61–67, 2018.
- BAESHEN, N. A. *et al.* Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.
- BEGRICHE, K. *et al.* Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 773–794, 2011.
- BEKRIS, L. M. *et al.* Glutathione-s-transferase M1 and T1 polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset. **Autoimmunity**, v. 38, n. 8, p. 567–575, 2005. doi:10.1080/08916930500407238
- BELLINI, S. *et al.* Heat Shock Proteins in Vascular Diabetic Complications: Review and Future Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2709, 2017.
- BENEDETTI, M. S.; WHOMSLEY, R.; BALTES, E. Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 6, p. 895–921, 2006.
- BHAGAVAN, N. V. Medical biochemistry. Tradução. [s.l.] **Harcourt/Academic Press**, 2002.
- BRADLEY, B. H. R. “Dietary Fat and Risk for Type 2 Diabetes: a Review of Recent Research.” **Current nutrition reports** vol. 7,4 (2018): 214-226. doi:10.1007/s13668-018-0244-z
- CABALLERO, B. Encyclopedia of food sciences and nutrition. Tradução. [s.l.] Acad. Press, 2003.
- CAPPEL, D. A. *et al.* Pyruvate-Carboxylase-Mediated Anaplerosis Promotes Antioxidant Capacity by Sustaining TCA Cycle and Redox Metabolism in Liver. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 6, 2019.. doi:10.1016/j.cmet.2019.03.014
- CHEN, X.; WEI, S.; YANG, F. Mitochondria in the pathogenesis of diabetes: a proteomic view. **Protein & Cell**, v. 3, n. 9, p. 648–660, 2012. doi:10.1007/s13238-012-2043-4
- CHEN, Z. *et al.* Bioinformatics analysis of hepatic gene expression profiles in type 2 diabetes mellitus. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2019
- CHEN, Z.-Z.; GERSZTEN, R. E. Metabolomics and Proteomics in Type 2 Diabetes. **Circulation Research**, v. 126, n. 11, p. 1613–1627, 2020.
- COEN, P. M.; GOODPASTER, B. H. (2012). Role of intramyocellular lipids in human health. **Trends in endocrinology and metabolism**: TEM, 23(8), 391–398. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.009>
- COSTANTINI, S. *et al.* Valosin-Containing Protein (VCP)/p97: A Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10177, 2021. doi:10.3390/ijms221810177

- DANIELSON, B. S. P. P. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561–597, 2002.
- DASTIDAR, S. G. *et al.* Glutathione S-transferase P deficiency induces glucose intolerance via JNK-dependent enhancement of hepatic gluconeogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 5, 2018. doi:10.1152/ajpendo.00345.2017
- DEWIDAR, B. *et al.* Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials. **Metabolism**, v. 111, p. 154299, 2020.
- ETTEN-JAMALUDIN, F. V.; DEURENBERG, R. Hoe zoekt PubMed? (vervolg). **Praktische handleiding PubMed**, p. 42–56, 2012.
- ETTEN-JAMALUDIN, F. V.; DEURENBERG, R. Hoe zoekt PubMed? **Praktische handleiding PubMed**, p. 26–41, 2012.
- FERRANNINI, E. *et al.* Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. **Diabetes** 62, 1730–1737 (2013).
- FONTAINE, E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 2018
- FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, 9(1), 25–53.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, v. 1, n. 4, 2021.
- GALICIA-GARCIA, U. *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6275, 2020.
- GERST, F. *et al.* The Expression of Aldolase B in Islets Is Negatively Associated With Insulin Secretion in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 12, p. 4373–4383, 2018. doi:10.1210/jc.2018-00791
- GILBERT, E. R.; FU, Z.; LIU, D. Development of a Nongenetic Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, p. 1–12, 2011.
- GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 1, 2006.
- HAYES, D. Nutritional hormesis. **Eur J Clin Nutr** 61, 147–159 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602507>
- HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 13–17, 2010. doi:10.1016/j.clnu.2009.09.001
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 10th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.
- JAIN, R. *et al.* Liver nucleotide biosynthesis is linked to protection from vascular complications in individuals with long-term type 1 diabetes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- JAMALUDIN, F. V. E.-; DEURENBERG, R. Hoe zoekt PubMed? **Praktische handleiding PubMed**, p. 28–47, 2008
- JIANG, S. *et al.* Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 2, p. 603–611, 2020
- JOHNSON, C. H. *et al.* Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 37–56, 2012. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134748
- KAHN, B. B. Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance. **Cell**, v. 92, n. 5, p. 593–596, 1998. doi:10.1016/s0092-8674(00)81125-3

- KAKIZAKI, S. *et al.* New Insights on the Xenobiotic-Sensing Nuclear Receptors in Liver Diseases – CAR and PXR-. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 7, p. 614–621, 2008. doi:10.2174/138920008785821666
- KANTER, J. E. *et al.* Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 3, p. 358–364, 2012
- KELLEY D. E.; HE J.; MENSHIKOVA E. V.; RITOV V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**. 2002;51(10):2944-2950. doi:10.2337/diabetes.51.10.2944
- KHAWANDANAH, J. Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. **Nutrition & Diabetes**, v. 9, n. 1, 2019.
- KIM, G.-H. *et al.* Proteomic and bioinformatic analysis of membrane proteome in type 2 diabetic mouse liver. **Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1164–1179, 2013.
- KORONOWSKI, K. B. *et al.* Ketogenesis impact on liver metabolism revealed by proteomics of lysine β -hydroxybutyrylation. **Cell Reports**, v. 36, n. 5, p. 109487, 2021. doi:10.1016/j.celrep.2021.109487
- LORENZI, M. The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive, and Resilient. **Experimental Diabetes Research**, v. 2007, p. 1–10, 2007.
- LERIN, C. *et al.* Defects in muscle branched-chain amino acid oxidation contribute to impaired lipid metabolism. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 10, p. 926–936, 2016. doi:10.1016/j.molmet.2016.08.001
- LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulinitis: New Model of Diabetes Mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415–417, 1976.
- LIU, M. *et al.* Network-Based Analysis of Affected Biological Processes in Type 2 Diabetes Models. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 6, 200
- LONG, J. *et al.* Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: a systematic review and meta-analysis. **BMC Endocrine Disorders**, v. 20, n. 1, 2020.
- MAKIA, N. L. *et al.* Murine hepatic aldehyde dehydrogenase 1a1 is a major contributor to oxidation of aldehydes formed by lipid peroxidation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 191, n. 1-3, p. 278–287, 2011. doi:10.1016/j.cbi.2011.01.013
- MANNA, P. *et al.* Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I κ B α /NF- κ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 11, p. 1465–1484, 2010
- MCLAUGHLIN, K. L. *et al.* Subcellular proteomics combined with bioenergetic phenotyping reveals protein biomarkers of respiratory insufficiency in the setting of proofreading-deficient mitochondrial polymerase. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. doi:10.1038/s41598-020-60536-y
- OLIVEIRA, D. S. D. *et al.* Glycogen levels and energy status of the liver of fasting rats with diabetes types 1 and 2. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 785–791, 2007. doi:10.1590/s1516-89132007000500006
- PEDERSEN, B. A. *et al.* Hepatic proteomic analysis revealed altered metabolic pathways in insulin resistant Akt1 $-/-$ /Akt2 $-/-$ mice. **Metabolism**, v. 64, n. 12, p. 1694–1703, 2015. doi:10.1016/j.metabol.2015.09.008
- PENDLETON, A. L. *et al.* Dimming the Powerhouse: Mitochondrial Dysfunction in the Liver and Skeletal Muscle of Intrauterine Growth Restricted Fetuses. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 2021. doi:10.3389/fendo.2021.61288
- PIROVICH, D. B.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. Multifunctional Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase as a Therapeutic Target. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 2021. doi:10.3389/fmolb.2021.719678
- POURAHMAD, J., & HOSSEINI, M. J. (2012). Application of isolated mitochondria in toxicological and clinical studies. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, 11(3), 703–704.

RANDLE, P. *et al.* The Glucose Fatty-Acid Cycle Its Role In Insulin Sensitivity And The Metabolic Disturbances Of Diabetes Mellitus. **The Lancet**, v. 281, n. 7285, p. 785–789, 1963. doi:10.1016/s0140-6736(63)91500-9

RUEGSEGGER, G. N. *et al.* Altered mitochondrial function in insulin-deficient and insulin-resistant states. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 9, p. 3671–3681, 2018.

SCHREIBER, M. *et al.* Inducible IL-7 Hyperexpression Influences Lymphocyte Homeostasis and Function and Increases Allograft Rejection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

SHANTHAKUMARI, D; SRINIVASALU. S; SUBRAMANIAN. S., *et al.* Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. **Toxicology**. 2004.

SINGH, V. P. *et al.* Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1, 2014. doi:10.4196/kjpp.2014.18.1.1

SOUSA, J. S.; D'IMPRIMA, E.; VONCK, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. **Subcellular Biochemistry Membrane Protein Complexes: Structure and Function**, p. 167–227, 2018. doi:10.1007/978-981-10-7757-9_7

SOUZA, R. J. D. *et al.* Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Bmj**, 2015.

SPINELLI, J. B.; HAIGIS, M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 7, p. 745–754, 2018. doi:10.1038/s41556-018-0124-1

SRINIVASAN K, RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian J Med Res**. 2007;125(3):451-472

SUN, X.; QIU, H. Valosin-Containing Protein, a Calcium-Associated ATPase Protein, in Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Function and Its Implications for Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3842, 2020. doi:10.3390/ijms21113842

STEELE, C.; STEEL, D.; WAINE, C. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Diabetes and the Eye*, p. 59–70, 2008.

IHLESTOJANOVIC, V.; IHLE, S. (2011). Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review. **The Canadian veterinary journal** = La revue veterinaire canadienne, 52(4), 426–430.

URIBARRI, J. *et al.* Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, 2010.

VAGUE, P. *et al.* C-peptide, Na, K -ATPase, and Diabetes. *Experimental Diabetes Research*, v. 5, n. 1, p. 37–50, 2004.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 378–455, 2012.

WANG, T. *et al.* Mechanisms and Outcomes of Drug- and Toxicant-Induced Liver Toxicity in Diabetes. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 5, p. 413–459, 2007.

WEI, X., YU, H., ZHAO, P., XIE, L., LI, L., & ZHANG, J. (2019). Serum regucalcin is a useful indicator of liver injury severity in patients with hepatitis B virus-related liver diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 52(10). doi:10.1590/1414-431x20198845

WHITFORD, GM. Determinants and mechanisms of enamel fluorosis.1997.

WHITFORD, GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Oral Sci*.1996.

WIŚNIEWSKI, J., ZOUGMAN, A., NAGARAJ, N. *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods** 6, 359–362 (2009). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>

YAMAGUCHI, M.; MURATA, T. Involvement of regucalcin in lipid metabolism and diabetes. **Metabolism**, v. 62, n. 8, p. 1045–1051, 2013. doi:10.1016/j.metabol.2013.01.023

YAN, L.-J.; WU, J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, p. 181, 2015.

YANG, Q. *et al.* Targeting the complex I and III of mitochondrial electron transport chain as a potentially viable option in liver cancer management. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, 2021.

YUNG, J. H. M.; GIACCA, A. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 706, 2020. doi:10.3390/cells9030706

YURRE, A. R. D. *et al.* Type 2 diabetes mellitus alters cardiac mitochondrial content and function in a non-obese mice model. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 2, 2020.

ZAKARIA, N. F.; HAMID, M.; KHAYAT, M. E. Amino Acid-Induced Impairment of Insulin Signaling and Involvement of G-Protein Coupling Receptor. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2229, 2021. doi:10.3390/nu13072229

ZHANG, X. *et al.* Fasting induces hepatic lipid accumulation by stimulating peroxisomal dicarboxylic acid oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100622, 2021.

APÊNDICE

APÊNDICE - Tabela de proteínas hepáticas com alteração em pelo menos uma das comparações CD1:CND; CD2:CND; CD2:CD1.

Accession	Nome	Gene	CD1:CND	CD2:CNE	CD2:CD1
Q921H8	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase A peroxisomal</i>	Acaa1a	1,28	2,32	1,72
Q8VCH0	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase B peroxisomal</i>	Acaa1b	1,32	2,23	1,54
Q8BWT1	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase mitochondrial</i>	Acaa2		1,35	1,30
P51174	<i>Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenas mitochondrial</i>	Acadl	0,39	1,92	5,16
P45952	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenas mitochondrial</i>	Acadm		1,95	1,39
Q07417	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenas mitochondrial</i>	Acads		1,52	1,52
Q8QZT1	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase mitochondrial</i>	Acat1	1,27	2,25	1,79
Q8CAY6	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase cytosolic</i>	Acat2	1,51		0,69
Q91V92	<i>ATP-citrate synthase</i>	Acly			1,62
P28271	<i>Cytoplasmic aconitate hydratase</i>	Aco1		1,49	
Q99KI0	<i>Aconitate hydratase mitochondrial</i>	Aco2	0,57	1,30	2,12
Q9R0H0	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1</i>	Acox1		1,77	1,55
P41216	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i>	Acs11	0,83	1,31	1,60
Q8JZR0	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5</i>	Acs15	2,86		0,17
Q91VA0	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1 mitochondrial</i>	Acsm1			0,72
P68134	<i>Actin alpha skeletal muscle</i>	Acta1		0,87	4,35
P62737	<i>Actin aortic smooth muscle</i>	Acta2		0,88	3,97
P60710	<i>Actin cytoplasmic 1</i>	Actb		1,15	
P68033	<i>Actin alpha cardiac muscle 1</i>	Actc1		1,21	
P63260	<i>Actin cytoplasmic 2</i>	Actg1	1,07	1,22	
P63268	<i>Actin gamma-enteric smooth muscle</i>	Actg2		0,88	
P00329	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	Adh1			0,90
P55264	<i>Adenosine kinase</i>	Adk		1,27	1,20
A2AS89	<i>Agmatinase mitochondrial</i>	Agmat		2,48	2,61
P50247	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	Ahcy		1,28	1,35
E9Q394	<i>A-kinase anchor protein 13</i>	Akap13		1,86	
Q9JII6	<i>Aldo-keto reductase family 1 member A1</i>	Akr1a1	1,22		
Q8K023	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C18</i>	Akr1c18		1,93	2,34
P70694	<i>Estradiol 17 beta-dehydrogenase 5</i>	Akr1c6		1,46	1,58
Q8VCX1	<i>Aldo-keto reductase family 1 member D1</i>	Akr1d1	1,75		2,12
P07724	<i>Albumin</i>	Alb	1,08	1,27	1,15
P24549	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	Aldh1a1	1,09	1,28	1,12
Q62148	<i>Retinal dehydrogenase 2</i>	Aldh1a2		1,84	2,14
Q9JHW9	<i>Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3</i>	Aldh1a3			2,14
O35945	<i>Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1</i>	Aldh1a7	1,15	1,34	1,12

Q9CZS1	<i>Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial</i>	Aldh1b1	2,18	1,79	
Q8R0Y6	<i>Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase</i>	Aldh1I1	1,09		0,86
Q8K009	<i>Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase</i>	Aldh1I2		1,17	
P47738	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	Aldh2	1,38	1,34	
Q8CHT0	<i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Aldh4a1		1,28	1,34
Q9EQ20	<i>Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating mitochondrial]</i>	Aldh6a1		1,13	1,13
Q9DBF1	<i>Alpha-amino adipic semialdehyde dehydrogenase</i>	Aldh7a1	1,43		0,79
Q8BH00	<i>2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase</i>	Aldh8a1	1,26	1,42	
P05064	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Aldoa	CND	0,74	CD2
Q91Y97	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	Aldob	1,23	1,99	1,40
P05063	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	Aldoc	CND	0,50	CD2
Q02357	<i>Ankyrin-1</i>	Ank1	CND	3,86	
Q8C8R3	<i>Ankyrin-2</i>	Ank2	6,17	CND	CD1
Q00623	<i>Apolipoprotein A-I</i>	Apoa1	CND	2,86	CD2
Q9QXX4	<i>Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2</i>	Aralar2	1,35		0,77
Q61176	<i>Arginase-1</i>	Arg1		0,87	0,79
Q91YI0	<i>Argininosuccinate lyase</i>	Asl	1,14	1,31	
P16460	<i>Argininosuccinate synthase</i>	Ass1		1,36	
Q8BZ32	<i>Putative Polycomb group protein ASXL2</i>	Asxl2	CND	1,79	
Q5XF90	<i>Probable cation-transporting ATPase 13A4</i>	Atp13a4	CD1	CD2	1,46
Q8R429	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	Atp2a1	CND	0,54	
O55143	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>	Atp2a2	CND	0,53	
Q03265	<i>ATP synthase subunit alpha mitochondrial</i>	Atp5f1a		1,43	1,26
P56480	<i>ATP synthase subunit beta mitochondrial</i>	Atp5f1b		1,39	1,25
P56135	<i>ATP synthase subunit f mitochondrial</i>	Atp5mf	1,43	1,39	
Q9DCX2	<i>ATP synthase subunit d mitochondrial</i>	Atp5pd	1,68	1,88	
Q9DB20	<i>ATP synthase subunit O mitochondrial</i>	Atp5po		1,35	1,42
Q91X34	<i>Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase</i>	Baat	2,14	CND	CD1
Q80XN0	<i>D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial</i>	Bdh1		1,90	
O35490	<i>Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1</i>	Bhmt	1,55	2,03	1,32
Q91WS4	<i>S-methylmethionine-homocysteine S-methyltransferase BHMT2</i>	Bhmt2	1,77	1,90	1,17
P16015	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	Ca3	0,58	0,72	
B2RQC6	<i>CAD protein</i>	Cad	CND	1,93	CD2
O09165	<i>Calsequestrin-1</i>	Casq1	CND	0,29	CD2
P24270	<i>Catalase</i>	Cat		1,35	1,34
Q8VCT4	<i>Carboxylesterase 1D</i>	Ces1d		0,83	0,73
Q91WU0	<i>Carboxylesterase 1F</i>	Ces1f	1,26		
Q8QZR3	<i>Pyrethroid hydrolase Ces2a</i>	Ces2a	1,30	CND	
Q8BK48	<i>Pyrethroid hydrolase Ces2e</i>	Ces2e	1,88	2,36	
Q8VCU1	<i>Carboxylesterase 3B</i>	Ces3b	0,80	0,83	
P07310	<i>Creatine kinase M-type</i>	Ckm	CND	0,64	CD2

P02463	<i>Collagen alpha-1(IV) chain</i>	Col4a1	9,58		
P19783	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 mitochondrial</i>	Cox4i1		1,31	1,39
P43024	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6A1 mitochondrial</i>	Cox6a1		1,35	
Q8C196	<i>Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] mitochondria</i>	Cps1	0,84	0,89	0,86
P52825	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 2 mitochondrial</i>	Cpt2		1,54	
Q9CZU6	<i>Citrate synthase mitochondrial</i>	Cs		0,44	
Q8VCN5	<i>Cystathionine gamma-lyase</i>	Cth	1,60	1,32	0,77
P56395	<i>Cytochrome b5</i>	Cyb5a		1,75	1,86
Q9DCN2	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	Cyb5r3	1,73	CND	CD1
Q64458	<i>Cytochrome P450 2C29</i>	Cyp2c29	0,49	CND	
P24456	<i>Cytochrome P450 2D10</i>	Cyp2d10	1,23		
Q05421	<i>Cytochrome P450 2E1</i>	Cyp2e1		1,55	1,45
Q64459	<i>Cytochrome P450 3A11</i>	Cyp3a11	0,55	CND	CD1
P31786	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	Dbi	0,75	0,66	0,83
O35215	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	Ddt		1,88	
Q9CQ62	<i>2-4-dienoyl-CoA reductase mitochondrial</i>	Decr1		1,95	1,90
Q9WV68	<i>Peroxisomal 2-4-dienoyl-CoA reductase</i>	Decr2		2,39	
Q9DBB8	<i>Trans-1 2-dihydrobenzene-1 2-diol dehydrogenase</i>	Dhdh	1,60		
Q9DBT9	<i>Dimethylglycine dehydrogenase mitochondrial</i>	Dmgdh	1,23		1,15
Q9EQF5	<i>Dihydropyrimidinase</i>	Dpys	CND	2,08	CD2
Q8BH95	<i>Enoyl-CoA hydratase mitochondrial</i>	Echs1			1,90
P42125	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 1 mitochondrial</i>	Eci1		1,86	2,10
P10126	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	Eef1a1			1,14
P62631	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	Eef1a2		0,84	
P58252	<i>Elongation factor 2</i>	Eef2		1,52	
Q9DBM2	<i>Peroxisomal bifunctional enzyme</i>	Ehhadh	1,40	1,95	1,75
P10630	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-II</i>	Eif4a2	1,42		
P17182	<i>Alpha-enolase</i>	Eno1	1,60	1,77	1,13
P17183	<i>Gamma-enolase</i>	Eno2		4,71	6,55
P21550	<i>Beta-enolase</i>	Eno3	1,45	2,23	1,55
Q9D379	<i>Epoxide hydrolase 1</i>	Ephx1	1,49		
P34914	<i>Bifunctional epoxide hydrolase 2</i>	Ephx2		1,49	1,46
Q9R0P3	<i>S-formylglutathione hydrolase</i>	Esd	1,73	2,10	
Q99LC5	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha mitochondrial</i>	Etfa	1,16	1,43	1,22
Q9DCW4	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	Etfb		1,48	1,48
P12710	<i>Fatty acid-binding protein liver</i>	Fabp1	1,23	42,52	27,66
P35505	<i>Fumarylacetoacetase</i>	Fah	1,12	1,11	
P19096	<i>Fatty acid synthase</i>	Fasn	1,30	2,23	1,63
Q9QXD6	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	Fbp1	1,21	1,58	1,25
Q61851	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>	Fgfr3	CND	2,66	CD2
P97807	<i>Fumarate hydratase mitochondrial</i>	Fh		1,72	1,32
P50285	<i>Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1</i>	Fmo1		5,16	
P97872	<i>Flavin-containing monooxygenase 5</i>	Fmo5	1,35		0,65

E9Q8I9	<i>Protein furry homolog</i>	Fry	CND	0,42	
Q91XD4	<i>Formimidoyltransferase-cyclodeaminase</i>	Ftcd		1,39	1,31
Q8VDC1	<i>FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1</i>	Fyco1	4,39	CND	
P16858	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Gapdh	0,88	1,22	1,35
Q64467	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific</i>	Gapdhs			2,56
Q60759	<i>Glutaryl-CoA dehydrogenase mitochondrial</i>	Gcdh	0,49		1,95
P26443	<i>Glutamate dehydrogenase 1 mitochondrial</i>	Glud1	0,79	1,34	1,52
P15105	<i>Glutamine synthetase</i>	Glul		1,45	1,65
Q91XE0	<i>Glycine N-acyltransferase</i>	Glyat	1,43	2,61	
Q9QXF8	<i>Glycine N-methyltransferase</i>	Gnmt	0,87	0,82	0,90
Q91VW5	<i>Golgin subfamily A member 4</i>	Golga4	CND	0,68	
P05201	<i>Aspartate aminotransferase cytoplasmic</i>	Got1	1,49	2,27	1,36
P05202	<i>Aspartate aminotransferase mitochondrial</i>	Got2		1,25	1,45
P06745	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	Gpi		1,97	2,75
P11352	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	Gpx1		1,23	1,14
Q91Z53	<i>Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase</i>	Grhpr	CND	4,10	CD2
Q61627	<i>Glutamate receptor ionotropic delta-1</i>	Grid1	CND	12,55	CD2
P13745	<i>Glutathione S-transferase A1</i>	Gsta1		8,41	
P10648	<i>Glutathione S-transferase A2</i>	Gsta2	8,00	8,41	
P30115	<i>Glutathione S-transferase A3</i>	Gsta3	0,82	0,75	0,73
P10649	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	Gstm1	1,27	0,87	0,62
P15626	<i>Glutathione S-transferase Mu 2</i>	Gstm2	1,26	0,84	0,58
P19639	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	Gstm3		0,76	0,64
Q8R5I6	<i>Glutathione S-transferase Mu 4</i>	Gstm4	1,54		0,58
P48774	<i>Glutathione S-transferase Mu 5</i>	Gstm5	10,18	12,55	
O35660	<i>Glutathione S-transferase Mu 6</i>	Gstm6		0,66	0,34
Q80W21	<i>Glutathione S-transferase Mu 7</i>	Gstm7	1,22	0,84	0,60
P19157	<i>Glutathione S-transferase P 1</i>	Gstp1	0,57	0,34	0,57
P46425	<i>Glutathione S-transferase P 2</i>	Gstp2	0,57	0,33	0,57
Q9WVL0	<i>Maleylacetoacetate isomerase</i>	Gstz1		1,38	
Q8CGP6	<i>Histone H2A type 1-H</i>	H2ac12			1,34
C0HKE6	<i>Histone H2A type 1-I</i>	H2ac13		1,12	1,36
Q8CGP7	<i>Histone H2A type 1-K</i>	H2ac15			1,34
Q64523	<i>Histone H2A type 2-C</i>	H2ac20			1,34
Q64522	<i>Histone H2A type 2-B</i>	H2ac21	0,71		1,28
C0HKE1	<i>Histone H2A type 1-B</i>	H2ac4	0,74	1,09	
C0HKE2	<i>Histone H2A type 1-C</i>	H2ac6	0,78		1,35
C0HKE3	<i>Histone H2A type 1-D</i>	H2ac7	0,76		1,36
C0HKE4	<i>Histone H2A type 1-E</i>	H2ac8	0,80	1,12	
Q8R1M2	<i>Histone H2A.J</i>	H2aj			1,35
Q8BFU2	<i>Histone H2A type 3</i>	H2aw		1,12	
P27661	<i>Histone H2AX</i>	H2ax			1,27
P0C0S6	<i>Histone H2A.Z</i>	H2az1	0,76		

Q3THW5	<i>Histone H2A.V</i>	H2az2	0,67		
P70696	<i>Histone H2B type 1-A</i>	H2bc1		1,17	
Q8CGP1	<i>Histone H2B type 1-K</i>	H2bc12		1,21	
P10854	<i>Histone H2B type 1-M</i>	H2bc14		1,21	
Q64524	<i>Histone H2B type 2-E</i>	H2bc21		1,23	
Q64475	<i>Histone H2B type 1-B</i>	H2bc3		1,21	
Q6ZWY9	<i>Histone H2B type 1-C/E/G</i>	H2bc4		1,26	
P10853	<i>Histone H2B type 1-F/J/L</i>	H2bc7		1,23	
Q64478	<i>Histone H2B type 1-H</i>	H2bc9		1,20	
Q8CGP0	<i>Histone H2B type 3-B</i>	H2bu1		1,27	
P84244	<i>Histone H3.3</i>	H3-3a		3,29	2,01
P02301	<i>Histone H3.3C</i>	H3-5		3,16	1,95
P68433	<i>Histone H3.1</i>	H3c1		3,13	1,90
P84228	<i>Histone H3.2</i>	H3c2		3,16	1,97
P62806	<i>Histone H4</i>	H4c1	0,78	1,11	1,42
Q78JT3	<i>3-hydroxyanthranilate 3, 4-dioxygenase</i>	Haa0		2,77	2,27
Q61425	<i>Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase mitochondrial</i>	Hadh	1,73	1,90	
Q8BMS1	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha mitochondrial</i>	Hadha	1,19	1,86	1,51
Q99JY0	<i>Trifunctional enzyme subunit beta mitochondrial</i>	Hadhb	1,32	1,68	1,28
P01942	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	Hba	0,74	1,73	1,95
P02088	<i>Hemoglobin subunit beta-1</i>	Hbb-b1		1,86	1,63
P02089	<i>Hemoglobin subunit beta-2</i>	Hbb-b2		0,85	1,79
P02104	<i>Hemoglobin subunit epsilon-Y2</i>	Hbb-y		1,90	1,63
O09173	<i>Homogentisate 1, 2-dioxygenase</i>	Hgd		1,34	1,40
Q99L13	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase mitochondrial</i>	Hibadh		1,39	1,57
P70349	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>	Hint1		1,36	1,36
Q8CGP5	<i>Histone H2A type 1-F</i>	Hist1h2af	0,76		1,35
C0HKE7	<i>Histone H2A type 1-N</i>	Hist1h2an			1,31
C0HKE8	<i>Histone H2A type 1-O</i>	Hist1h2ao			1,34
C0HKE9	<i>Histone H2A type 1-P</i>	Hist1h2ap			1,35
Q8CGP2	<i>Histone H2B type 1-P</i>	Hist1h2bp		1,21	
Q6GSS7	<i>Histone H2A type 2-A</i>	Hist2h2aa1	0,79		1,35
Q64525	<i>Histone H2B type 2-B</i>	Hist2h2bb		1,22	
Q9D2U9	<i>Histone H2B type 3-A</i>	Hist3h2ba		1,21	
P38060	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase mitochondrial</i>	Hmgcl	1,68		
Q8JZK9	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase cytoplasmic</i>	Hmgcs1	CD1	CD2	2,29
P54869	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase mitochondrial</i>	Hmgcs2		2,53	2,18
P49429	<i>4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase</i>	Hpd	0,79	1,23	1,49
O08756	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	Hsd17b10		1,32	
P51660	<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	Hsd17b4		1,80	1,70
P07901	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	Hsp90aa1	0,74		1,36
P11499	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Hsp90ab1	0,76	1,17	1,40
Q61696	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	Hspa1a		1,38	

P17879	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	Hspa1b		1,38	
P16627	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>	Hspa11		1,43	
P17156	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	Hspa2		1,32	1,42
P20029	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	Hspa5	0,76		1,14
P63017	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Hspa8		1,40	1,35
P38647	<i>Stress-70 protein mitochondrial</i>	Hspa9	1,38	1,58	1,13
P63038	<i>60 kDa heat shock protein mitochondrial</i>	Hspd1		1,19	1,13
Q64433	<i>10 kDa heat shock protein mitochondrial</i>	Hspe1			1,79
O88844	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	Idh1			0,88
P40936	<i>Indolethylamine N-methyltransferase</i>	Inmt	0,55		2,64
P85094	<i>Isochorismatase domain-containing protein 2A</i>	Isoc2a	2,10	1,45	0,65
P97328	<i>Ketohexokinase</i>	Khk	CD1	CD2	1,77
P05784	<i>Keratin type I cytoskeletal 18</i>	Krt18	1,28		
P19001	<i>Keratin type I cytoskeletal 19</i>	Krt19	1,72	CND	CD1
P11679	<i>Keratin type II cytoskeletal 8</i>	Krt8	1,25	1,20	
Q61595	<i>Kinectin</i>	Ktn1	CND	0,41	
Q9CPY7	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	Lap3		1,17	
P06151	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	Ldha	1,21	1,99	1,95
P16125	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	Ldhb	CD1	CD2	2,12
P00342	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	Ldhc	4,48	5,87	2,14
Q91X83	<i>S-adenosylmethionine synthase isoform type-1</i>	Mat1a		2,66	1,68
Q3THS6	<i>S-adenosylmethionine synthase isoform type-2</i>	Mat2a		2,80	3,35
P14152	<i>Malate dehydrogenase cytoplasmic</i>	Mdh1	1,12	1,32	1,20
P08249	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial</i>	Mdh2		1,38	1,32
P06801	<i>NADP-dependent malic enzyme</i>	Me1	1,90	2,23	
Q9DD20	<i>Methyltransferase-like protein 7B</i>	Mettl7b	1,48		
Q91VS7	<i>Microsomal glutathione S-transferase 1</i>	Mgst1		1,63	
P97434	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	Mprp		3,16	
P00405	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	Mtco2	1,95	1,52	
Q922D8	<i>C-1-tetrahydrofolate synthase cytoplasmic</i>	Mthfd1		2,08	
Q5SX40	<i>Myosin-1</i>	Myh1	0,06	0,77	14,15
P13541	<i>Myosin-3</i>	Myh3	CND	0,79	CD2
Q5SX39	<i>Myosin-4</i>	Myh4	0,05	0,73	14,59
Q02566	<i>Myosin-6</i>	Myh6	CND	0,68	CD2
Q91Z83	<i>Myosin-7</i>	Myh7	CND	0,72	CD2
P13542	<i>Myosin-8</i>	Myh8	0,06	0,73	
Q8VDD5	<i>Myosin-9</i>	Myh9		4,14	
P97457	<i>Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform</i>	Mylpf	CND	0,18	CD2
Q91VD9	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial</i>	Ndufs1		2,92	
O35942	<i>Serine/threonine-protein kinase Nek2</i>	Nek2	2,46		
P15532	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	Nme1	1,48	2,01	1,26
Q01768	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	Nme2	1,43	1,88	1,23
P0DI97	<i>Neurexin-1-beta</i>	Nrxn1		2,97	

Q9CS84	<i>Neurexin-1</i>	Nrxn1	CND	2,83	CD2
P29758	<i>Ornithine aminotransferase mitochondrial</i>	Oat			1,51
B9EJ86	<i>Oxysterol-binding protein-related protein 8</i>	Osbpl8	0,25	CND	
P11725	<i>Ornithine carbamoyltransferase mitochondrial</i>	Otc	0,90	0,90	
P09103	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	P4hb		1,30	1,40
P16331	<i>Phenylalanine-4-hydroxylase</i>	Pah		1,35	1,22
Q05920	<i>Pyruvate carboxylase mitochondrial</i>	Pc	1,28	2,16	1,65
Q91ZA3	<i>Propionyl-CoA carboxylase alpha chain mitochondrial</i>	Pcca	2,18	CND	
P62962	<i>Profilin-1</i>	Pfn1	1,45	1,46	
P09411	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	Pgk1	1,25	1,27	
P09041	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	Pgk2		1,42	
Q9D0F9	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	Pgm1	1,42	1,46	
P67778	<i>Prohibitin</i>	Phb	1,42		
P53657	<i>Pyruvate kinase PKLR</i>	Pklr		2,83	2,56
P52480	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	Pkm	CND	2,25	
Q9D819	<i>Inorganic pyrophosphatase</i>	Ppa1	CND	1,40	CD2
P17742	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	Ppia	1,46	1,67	
P35700	<i>Peroxiredoxin-1</i>	Prdx1	0,83		1,11
O08807	<i>Peroxiredoxin-4</i>	Prdx4		1,16	
P99029	<i>Peroxiredoxin-5 mitochondrial</i>	Prdx5		1,15	
O08709	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Prdx6		1,26	1,23
Q8CI94	<i>Glycogen phosphorylase brain form</i>	Pygb		2,44	2,80
Q9ET01	<i>Glycogen phosphorylase liver form</i>	Pygl		1,22	1,17
Q9WUB3	<i>Glycogen phosphorylase muscle form</i>	Pygm			1,43
Q91X91	<i>Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]</i>	Qprt	CND	0,59	CD2
Q64374	<i>Regucalcin</i>	Rgn	0,84	1,77	1,86
P52760	<i>2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase</i>	Rida	2,75	2,23	1,84
P47955	<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>	Rplp1	1,80		0,54
P62082	<i>40S ribosomal protein S7</i>	Rps7	1,55	CND	CD1
Q99LB7	<i>Sarcosine dehydrogenase mitochondrial</i>	Sardh	1,45	1,84	1,21
P48962	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	Slc25a4	1,80		
P32020	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	Scp2		2,59	2,05
Q8K2B3	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit mitochondrial</i>	Sdha	2,20	CND	
P17563	<i>Methanethiol oxidase</i>	Selenbp1	0,84	0,82	0,90
Q63836	<i>Selenium-binding protein 2</i>	Selenbp2	0,80	0,79	
Q00896	<i>Alpha-1-antitrypsin 1-3</i>	Serpina1c	CD1	CD2	1,65
Q8VEM8	<i>Phosphate carrier protein mitochondrial</i>	Slc25a3		1,88	2,12
Q3V132	<i>ADP/ATP translocase 4</i>	Slc25a31	2,39	3,53	
P51881	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	Slc25a5	1,77	1,65	
P08228	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Sod1	0,76		1,21
Q64442	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	Sord	1,36	1,46	1,17
Q3UMC0	<i>ATPase family protein 2 homolog</i>	Spata5		2,53	

Q9WUM5	<i>Succinate-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha mitochondrial</i>	Suclg1		1,49	
P52840	<i>Sulfotransferase 1A1</i>	Sult1a1	1,93		
Q8VC30	<i>Triokinase/FMN cyclase</i>	Tkfc	1,45	2,03	1,17
P40142	<i>Transketolase</i>	Tkt	1,16		
P17751	<i>Triosephosphate isomerase</i>	Tpi1		1,23	
P58771	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	Tpm1	CND	0,63	CD2
P58774	<i>Tropomyosin beta chain</i>	Tpm2	CND	0,60	CD2
Q9CQN1	<i>Heat shock protein 75 kDa mitochondrial</i>	Trap1			1,27
P52196	<i>Thiosulfate sulfurtransferase</i>	Tst	0,74		1,20
P68369	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	Tuba1a		1,28	
P05213	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	Tuba1b		1,26	
P68373	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	Tuba1c		1,25	
A2AQ07	<i>Tubulin beta-1 chain</i>	Tubb1	1,51		
Q7TMM9	<i>Tubulin beta-2A chain</i>	Tubb2a	1,26		0,82
Q9CWF2	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	Tubb2b	1,27		
Q9ERD7	<i>Tubulin beta-3 chain</i>	Tubb3	1,40	1,28	
Q9D6F9	<i>Tubulin beta-4A chain</i>	Tubb4a	1,31		0,74
P68372	<i>Tubulin beta-4B chain</i>	Tubb4b	1,28		0,82
P99024	<i>Tubulin beta-5 chain</i>	Tubb5	1,26		
Q922F4	<i>Tubulin beta-6 chain</i>	Tubb6	1,57	1,31	0,80
Q91ZJ5	<i>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	Ugp2	CND	3,56	CD2
P70691	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-2</i>	Ugt1a2	0,84		
Q6ZQM8	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-7C</i>	Ugt1a7c	0,84		
P17717	<i>UDP-glucuronosyltransferase 2B17</i>	Ugt2b17		0,77	
Q62452	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-9</i>	Ugt1a9	0,83		
P25688	<i>Uricase</i>	Uox	1,17	1,16	
Q9CZ13	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial</i>	Uqcrc1		1,27	
Q9DB77	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondria</i>	Uqcrc2	0,31		
Q8VC12	<i>Urocanate hydratase</i>	Uroc1	0,67		
Q01853	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	Vcp	0,46	1,70	5,81