

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Chelsea M. V. B. F. Rodrigues

**ANÁLISE PROTEÔMICA SUGERE ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES TIPO II INDUZIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA HIPERLIPÍDICA**

**BAURU
2022**

Chelsea M. V. B. F. Rodrigues

**ANÁLISE PROTEÔMICA SUGERE ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES TIPO II INDUZIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel, pelo Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” sob orientação da Dra. Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira e coorientação Ma. Tamara Teodoro Araújo.

**BAURU
2022**

R696a

Rodrigues, Chelsea M. V. B. F.

ANÁLISE PROTEÔMICA SUGERE ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES TIPO II
INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA HIPERLIPÍDICA /

Chelsea M. V. B. F. Rodrigues. -- Bauru, 2022

69 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira

1. Diabetes mellitus. 2. Proteômica. 3. Músculo esquelético. 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.

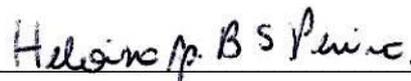
Chelsea M. V. B. F. Rodrigues

**ANÁLISE PROTEÔMICA SUGERE ADAPTAÇÃO DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES TIPO II INDUZIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA E DIETA HIPERLIPÍDICA**

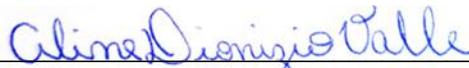
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel, pelo Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" sob orientação da Dra. Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira e coorientação Ma. Tamara Teodoro Araújo.

Aprovado em: 10 / 03 / 2022

BANCA EXAMINADORA



Dra. Heloísa Aparecida Barbosa da Silva Pereira
Universidade de São Paulo



Dra. Aline Dionizio Valle
Universidade de São Paulo



Dr. Sergio Pereira
Universidade Estadual de São Paulo "Júlio de Mesquita Filho"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a mim, que teve forças para sobreviver e chegar ao final da graduação. Não foi fácil, e perdi companheiros pelo caminho, mas permaneci determinada a chegar ao fim; este trabalho representa minha luta e o final desta jornada árdua e tortuosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram durante o caminho e que não me deixaram desistir ao longo do percurso. À Universidade de São Paulo por me acolher e permitir o desenvolvimento deste trabalho em sua extensão. À toda a equipe USP que me acolheu, apoiou, acompanhou e tornou este trabalho possível. Um obrigada especial à Dra. Heloísa Aparecida Barbosa da Silva Pereira por me orientar e permitir fazer parte do seu projeto e conceder os dados para este trabalho. À minha coorientadora Tamara Araújo por acompanhar todo este processo, aconselhar e corrigir todas estas páginas. Aos que aceitaram participar como minha banca avaliadora, Dr. Sérgio Pereira e Dra. Aline Dionizio Valle. Às amigas, parceiras de trabalho e de estudo e pessoas queridas que sempre me incentivaram. Um brinde a todos vocês.

Um agradecimento especial também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2018/24073-0) por apoiar o projeto do qual este trabalho faz parte e permitir que fosse realizado. Um brinde àqueles que tornaram este projeto possível.

Por fim agradeço também a mim, única pessoa que esteve comigo em tempo integral e em todos os momentos da vida: meu mais sincero agradecimento. Você é uma pessoa incrível, não deixe que os percalços te façam esquecer isso. Um brinde a você.

RESUMO

A diabetes *mellitus* tipo II é a mais comum, sua prevalência vêm atingindo níveis globais crescentes que demanda um elevado gasto econômico e aumentar a propensão a doenças vasculares, cardíacos e musculares. Neste cenário a proteômica tem potencial de fornecer informações acerca de alterações metabólicas nos portadores pela identificação de vias e possíveis marcadores envolvidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil proteômico do músculo gastrocnêmio de camundongos induzidos a diabetes tipo 2 para identificar alterações e a influência da dieta hiperlipídica. Dezoito camundongos machos adultos foram divididos em 3 grupos experimentais (n=6/grupo) a saber: controle não diabético (CND), diabético induzido por estreptozotocina (CDD) e diabético induzido por estreptozotocina e dieta hiperlipídica (DHL), os mesmos receberam durante 8 semanas dieta hiperlipídica (grupo DHL) ou normocalórica (CND e CDD), após esse período os grupos DHL e CDD receberam sucessivas injeções intraperitoneais de estreptozotocina (STZ) de 40 a 50mg/kg, durante 3-5 dias. Após constatada a indução da diabetes os animais foram mantidos por mais 21 dias nestas condições, e então ao final foram eutanasiados e o músculo foi coletado. O músculo gastrocnêmio foi submetido à análise proteômica. As seguintes comparações foram analisadas: CDD X CND; DHL X CND e DHL X CDD. A análise de classificação funcional mostrou três categorias com maiores alterações: contração muscular, metabolismo energético e metabolismo de carboidratos. Os resultados da análise quantitativa indicaram que o grupo tratado dieta hiperlipídica mostrou regulação positiva de diversas proteínas, indicando um possível efeito adaptativo desencadeado pela dieta hiperlipídica. Já a comparação CDD X CND demonstrou regulação negativa predominante nas três categorias. Estes resultados podem indicar que a função muscular é afetada pela diabetes e pela dieta hiperlipídica pela ativação de vias adaptativas no músculo. Estes dados têm potencial para ampliar o conhecimento que se tem sobre a diabetes e os mecanismos envolvidos na patologia.

Palavras-chave: diabetes, proteômica, músculo esquelético

ABSTRACT

Type II diabetes *mellitus* is the most common, its prevalence has reached increasing global levels that demand a high economic expense and increase the propensity to vascular, cardiac and muscular diseases. In this scenario, proteomics has the potential to provide information about metabolic changes in carriers by identifying pathways and possible markers involved. Thus, the objective of this work was to analyze the proteomic profile of the gastrocnemius muscle of mice induced with type 2 diabetes to identify alterations and the influence of the high-fat diet. Eighteen adult male mice were divided into 3 experimental groups (n=6/group) namely: non-diabetic control (CND), streptozotocin-induced diabetic (CDD) and streptozotocin-induced diabetic and high-fat diet (DHL), they received 8 weeks high-fat diet (DHL group) or normocaloric diet (CND and CDD), after this period the DHL and CDD groups received successive intraperitoneal injections of streptozotocin (STZ) from 40 to 50mg/kg for 3-5 days. After the induction of diabetes was verified, the animals were kept for another 21 days under these conditions, and then at the end they were euthanized and the muscle was collected. The gastrocnemius muscle was submitted to proteomic analysis. The following comparisons were analyzed: CDD X CND; DHL X CND and DHL X CDD. The functional classification analysis showed three categories with the greatest changes: muscle contraction, energy metabolism and carbohydrate metabolism. The results of the quantitative analysis indicated that the high-fat diet group showed positive regulation of several proteins, indicating a possible adaptive effect triggered by the high-fat diet. The CDD X CND comparison showed predominant negative regulation in the three categories. These results may indicate that muscle function is affected by diabetes and high-fat diet by activating adaptive pathways in the muscle, in addition to identifying the most affected functions. These data have the potential to expand the knowledge we have about diabetes and the mechanisms involved in the pathology.

Keywords: diabetes, proteomics, skeletal muscle

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - esquema representando perfil saudável e diabético. | 18 |
| Figura 2 - esquema representando os grupos de estudo e relação entre eles. As linhas pretas curvas indicam a comparação entre tratamentos. | 25 |
| Figura 3 - subnetworks representando proteínas envolvidas na regulação do cálcio | 40 |
| Figura 4 - Mecanismo de contração muscular | 42 |
| Figura 5 - subnetworks representando proteínas que interagem com F-box-32..... | 36 |
| Figura 6 - subnetworks representando interação entre proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos..... | 44 |
| Figura 7 - esquema representando associação entre diferentes vias metabólicas (metabolismo de carboidratos e metabolismo energético)..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Perfil de expressão das proteínas nas comparações entre os grupos.. | 29 |
| Tabela 2 - Proteínas associadas à contração muscular em cada comparação (DHL X CND; DHL X CDD; CDD X CND)..... | 33 |
| Tabela 3 - Proteínas que interagiram com F-box-32 (Figura 5) referentes à comparação DHL X CDD e razão entre os grupos. | 37 |
| Tabela 4 - Proteínas que interagiram com F-box-32 (Figura 5) referentes à comparação DHL X CND e razão entre os grupos. | 37 |
| Tabela 5 - Proteínas identificadas envolvidas na regulação do cálcio para cada comparação. | 39 |
| Tabela 6 - apresentação das proteínas identificadas envolvidas no metabolismo de carboidratos para os três grupos comparativos. | 43 |
| Tabela 7 - Proteínas identificadas em DHL X CND presentes nas subnetwork (Figura 6) referentes ao metabolismo de carboidratos e razão entre os grupos. | 45 |
| Tabela 8 - Proteínas identificadas em DHL X CDD presentes nas subnetwork (Figura 6) referentes ao metabolismo de carboidratos e razão entre os grupos. | 45 |
| Tabela 9 - Proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons..... | 48 |
| Tabela 10 - Proteínas referentes aos processos metabólicos do peróxido de hidrogênio. | 50 |
| Tabela 11 - Proteínas referentes ao sistema antioxidante. | 51 |
| Tabela 12 - Proteínas identificadas na comparação CDD X CND com diferença de expressão. | 61 |
| Tabela 13 - Proteínas identificadas na comparação DHL X CND com diferença de expressão. | 63 |
| Tabela 14 - Proteínas identificadas na comparação DHL X CDD com diferença de expressão. | 65 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Crescimento na incidência de indivíduos portadores de diabetes 2 no mundo e previsões para as próximas décadas..... | 16 |
| Gráfico 2 - Perfil geral da comparação DHL X CND e termos com mais genes associados.. | 30 |
| Gráfico 3 - Perfil geral da comparação DHL X CDD e termos com mais genes associados.. | 31 |
| Gráfico 4 - Perfil geral da comparação CDD X CND e termos com mais genes associados.. | 32 |

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AC | Anidrase carbônica |
| ACN | Acetonitrila |
| ACTC1 | Alfa-actina do músculo cardíaco 1 |
| ACTG1 | Actina, citoplasmática 2 |
| ACTN (2,3) | Alfa-actinina (isoformas) |
| ADP | Adenosina difosfato |
| AF | Bisfenol |
| AK | Adenosina quinase |
| AK1 | Adenilato quinase 1 |
| AKAP9 | Proteínas de ancoragem da A-cinase |
| AKT | Proteína quinase B |
| ALDO (A, B, C) | Aldolase A/frutose-bisfosfato aldolase (isoformas) |
| AMBIC | Bicarbonato de amônio |
| AMP | Adenosina 3,5-monofosfato |
| AMPK | Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina |
| ANK2 | Anquirina |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ATP2A (1,2) | ATPase 1 de cálcio do retículo sarcoplasmático / endoplasmático |
| ATP5F1 (A, B) | ATP sintase (subunidades) |
| ATP5PO | Subunidade O da ATP sintase, mitocondrial |
| BSA: | Albumina de soro bovino |
| C57BL/6/J | Linhagem de camundongos geneticamente modificados |
| CA ²⁺ | Íons de cálcio |
| CA3 | Anidrase carbônica 3 |
| CALM (1,2,3) | Calmodulina (isoformas/subunidades) |
| CASQ1 | Calsequestrina |
| CAT | Catalase |
| CDD | Grupo controle (C) diabético (D) (estreptozotocina), dieta padrão |
| CKM | Creatina quinase (muscular) |
| CND | Grupo controle (C) não diabético (ND) |
| CYCS | Subunidade do complexo citocromo b-c1 Rieske_ mitocondrial |

| | |
|----------------------------------|--|
| DHL | Camundongos diabéticos (D), com dieta hiperlipídica (HL) |
| DIT | Termogênese induzida pela dieta |
| DM2 | Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNTs | Doenças não transmissíveis |
| DTT | Ditiotreitol |
| ENO (1,2,3) | Enolase (isoformas) |
| ER/RE | Retículo endoplasmático |
| ETC | Cadeia de transporte de elétrons |
| FBXO32/MAFbx | proteína F-box 32/ Gene F-box da atrofia muscular |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| GAPDHS | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (espermatogênica) |
| GIP | Peptídeo insulínico dependente de glicose |
| GLP-1 | Peptídeo semelhante a glucagon 1 |
| GLUT (2,4) | Transportador de glicose (subunidades) |
| HB (A,B1, B2, Y) | Hemoglobina (Subunidades) |
| HFD | Dieta hiperlipídica |
| HSP70 | Proteínas de choque térmico de 70 quilodalton |
| HSPA (2,8) | Proteínas de choque térmico (subunidades) |
| IDF | Federação internacional da diabetes |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 |
| IR | Receptor de insulina |
| LDB3 | Ligação ao domínio LIM 3 |
| LDH (A,B,C) | Lactato desidrogenase (isoformas) |
| MB | Mioglobina |
| MDH2 | Malato desidrogenase 2 (mitocondrial) |
| MRLN | Miorregulina |
| MYBPC2 | A proteína C de ligação à miosina (cardíaca) |
| MYH (1,3,6,7A,7B,8, 9,10,11,14) | Miosina (isoformas/subunidades) |
| MYL(1,3) | Polipeptídeo da miosina leve |
| NAD | Dinucleotídeo de adenina de nicotinamida |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NH ₄ HCO ₃ | Bicarbonato de Amônio |
| NME (1,2) | Nucleosídeo Difosfato Quinase (isoformas) |

| | |
|------------|---|
| PARK7 | Proteína 7 da doença de Parkinson |
| PFKM | Fosfofrutoquinase, muscular |
| PGAM (1,2) | Fosfoglicerato mutase 2/fosfoglicerato muscular específica |
| PGC-1A | Coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma |
| PGK (1,2) | Fosfoglicerato quinase, isoformas |
| P13K | Fosfoinosítido 3-quinase/fosfatidilinositol 3-quinases |
| PKLR | Piruvato-quinase R / L |
| PKM | Piruvato quinase |
| PRDX1 | Peroxirredoxina 1 |
| RE | Retículo endoplasmático |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RS | Retículo sarcoplasmático |
| SBD | Sociedade brasileira de diabetes |
| SERCA | Sarco/retículo endoplasmático Ca(2+)-ATPase |
| SLMAP | Proteína Associada ao Sarcolema (Proteína Associada ao Sarcolema) |
| SLC25A4 | Translocase 1 de ADP / ATP |
| SOD1 | Superóxido dismutase |
| STZ | Estreptozotocina |
| SUS | Sistema único de saúde |
| TCA | Ciclo do ácido tricarboxílico |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TNNC2 | Troponina C |
| TNNI2 | Troponina I (músculo esquelético rápido) |
| TNNT3 | Troponina T (músculo esquelético rápido) |
| TPI1 | Triosefosfato isomerase |
| TPM (1,2) | Cadeia alfa-1 da tropomiosina (isoformas) |
| UQCRC1 | Ubiquinol-Citocromo C Redutase Core Protein 1 |
| VDAC1 | Canal 1 seletivo de ânions dependente de voltagem |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | Epidemiologia da Diabetes | 16 |
| 1.2 | Fisiopatologia da diabetes tipo II | 17 |
| 1.3 | Diabetes <i>mellitus</i> II e o músculo esquelético | 19 |
| 1.4 | Estreptozotocina (STZ) | 20 |
| 1.5 | Dieta Hiperlipídica e resistência insulínica | 20 |
| 1.6 | Proteômica | 21 |
| 1.7 | Justificativa | 22 |
| 2 | OBJETIVO | 23 |
| 3 | METODOLOGIA | 24 |
| 3.1 | Obtenção dos animais | 24 |
| 3.2 | Tratamento dos animais | 24 |
| 3.3 | Eutanásia dos animais | 26 |
| 3.4 | Análise proteômica do tecido muscular | 26 |
| 3.4.1 | Aquisição nano-LC-ESI-MS/MS | 27 |
| 3.5 | Análise dos dados por meio da bioinformática | 28 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 4.1 | Análise Funcional | 29 |
| 4.1.1 | Perfil geral dos termos com mais genes associados | 29 |
| 4.1.1.1 | DHL X CND | 30 |
| 4.1.1.2 | DHL X CDD | 31 |
| 4.1.1.3 | CDD X CND | 32 |
| 4.2 | Análise das alterações em cada categoria funcional | 33 |
| 4.2.1 | Contração muscular | 33 |
| 4.2.1.1 | F-box proteína 32 (FBXO32) | 35 |
| 4.2.1.2 | Regulação e homeostase do cálcio | 38 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.2.2 | Metabolismo de carboidratos e metabolismo energético | 42 |
| 4.2.3 | Análise de estresse oxidativo | 50 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 54 |
| | REFERÊNCIAS..... | 55 |
| | APÊNDICE A – Tabelas originais das proteínas com diferença de expressão | 61 |

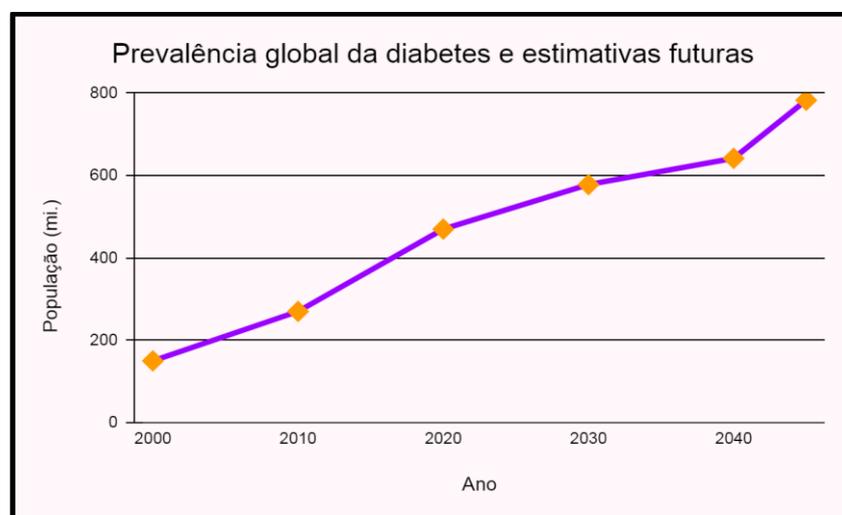
1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Diabetes

Atualmente, cerca de 537 milhões de pessoas convivem diariamente com diabetes (IDF, 2021), sendo cerca de 90% desta estatística correspondente à diabetes *mellitus* tipo II; este número é ainda maior se considerado o fato de que tais dados são subnotificados, visto que muitos portadores desconhecem sua condição (VIJAN, 2010). Em 2015, a diabetes ocupou a sexta posição dentre as principais causas de deficiência, sendo também um problema de saúde pública que demanda um grande custo econômico global de mais de 800 bilhões de dólares anuais (CHATTERJEE *et al.*, 2017). Segundo dados da federação internacional de diabetes (IDF, 2021), nos últimos 15 anos cerca de 966 bilhões de dólares foram gastos em saúde direcionados a esta doença.

Estima-se que em 20 anos a diabetes tenha dobrado sua prevalência global (gráfico 1) acompanhando o crescimento das taxas de obesidade ao redor do mundo e é estimado que até 2030 o número de portadoras da doença terá dobrado (VIJAN, 2010; OLOKOBA *et al.*, 2012), em 2040 o número de portadores da doença seja próximo a 642 milhões (ZIMMET *et al.*, 2016) e a perspectiva para o ano de 2045 seja de 783 milhões (IDF, 2021).

Gráfico 1 - Crescimento na incidência de indivíduos portadores de diabetes 2 no mundo e previsões para as próximas décadas.



Fonte: elaborado pela autora segundo as fontes IDF (2021); VIJAN (2010); OLOKOBA *et al.* (2012); ZIMMET *et al.* (2016).

É sugerido que este aumento alarmante se deva também à falta de investimento público no combate à diabetes por tratar-se de uma doença não-transmissível (DNTs) e portanto, de menor prioridade quando comparado as doenças transmissíveis. Ainda, a prevalência da diabetes está fortemente relacionada com a região geográfica, dadas as variações no estilo de vida, fatores de risco e as condições socioeconômicas de cada região, com destaque para os países de baixa e média renda (OLOKOBA *et al.*, 2012).

O Brasil ocupa a quarta posição na prevalência mundial de diabetes *mellitus* II, em decorrência do envelhecimento populacional, transição nutricional, altos índices de obesidade, alimentação inadequada, sedentarismo, entre outros (ALMEIDA-PITITTO *et al.*, 2015). Além disso, as diferenças no nível econômico prejudicam ou dificultam o diagnóstico e tratamento desta doença, visto que os custos gerados pela diabetes são extremamente altos, estimados em 50 bilhões de dólares anuais no Brasil, ocupando a quinta posição mundial de gastos direcionados à diabetes *mellitus* tipo 2 (IDF, 2019).

Outros fatores contribuem para que a distribuição da diabetes seja desigual na população, como a região geográfica, com destaque para as regiões nordeste e sul, que apresentam os maiores índices de diabetes no Brasil, segundo um censo realizado em 2011 (IDF, 2011). O sistema único de Saúde (SUS) foi criada com intuito de garantir o direito do acesso à saúde de toda a população, oferecendo suporte gratuito; embora medicamentos para diabetes sejam fornecidos por este sistema, a distribuição é falha, desigual, e a quantidade disponível de medicamentos é insuficiente para atender toda a demanda exigida (COUTINHO, JÚNIOR, 2015).

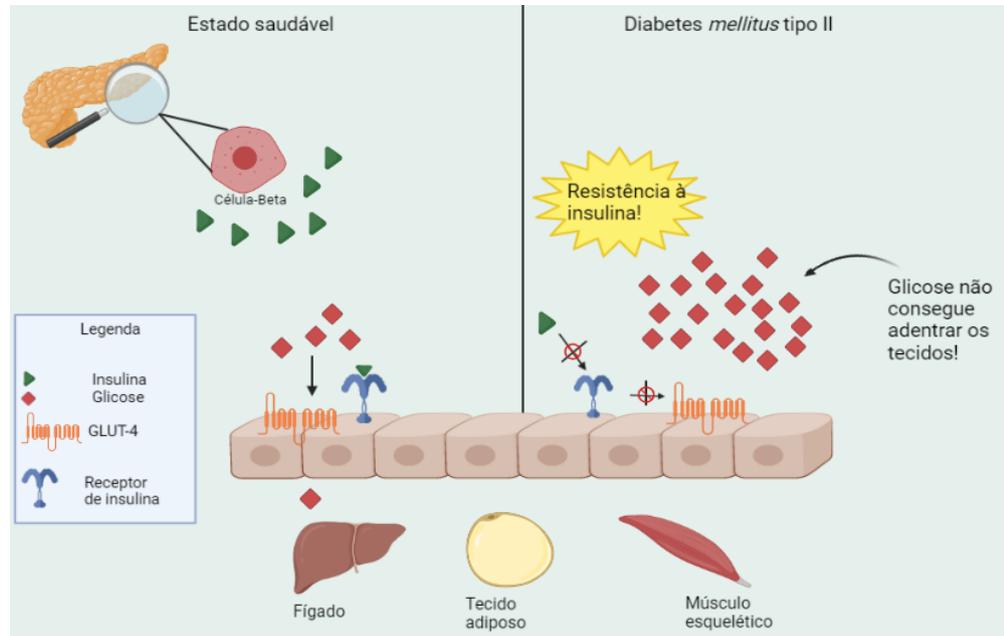
A diabetes também não está distribuída de forma homogênea na população, sendo mais frequente em pessoas de etnia africana (COUTINHO, JÚNIOR, 2015) e mulheres (COSTA *et al.*, 2017). Segundo a Sociedade brasileira do diabetes, durante a pandemia da COVID-19 foi observado um crescimento ainda mais acelerado da diabetes na população feminina, marcando um aumento de 7,8% para 9% entre os anos de 2019 e 2020 (SBD, 2020).

1.2 Fisiopatologia da diabetes tipo II

A diabetes *mellitus* tipo II consiste em uma desordem metabólica crônica decorrente da baixa produção de insulina pelo pâncreas por disfunção de células- β pancreáticas ou pela resistência do organismo por este hormônio, fazendo com que níveis elevados de glicose permaneçam no sangue, levando a uma redução no transporte de glicose para o fígado, células

musculares e adipócitos; devido a isso ocorre um aumento na quebra de moléculas de gordura nos adipócitos (GOYAL; JIALAL, 2018; DEFRONZO *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - esquema representando perfil saudável e perfil diabético.



Fonte: elaborado pela autora. Criado com BioRender.com.

Além disso, por se tratarem de células altamente sensíveis à glicose, frente a altas concentrações desta molécula pode haver sobrecarga destas células com consequente redução de volume, o que desencadeia um desequilíbrio no qual as células α se mostram aumentadas, levando à hiperglucagonemia (concentração elevada de glucagon no sangue). Desta forma, dentre os principais sintomas desta doença estão hiperglicemia, resistência à insulina, hiperglucagonemia e deficiência relativa de insulina (GOYAL; JIALAL, 2018; DEFRONZO *et al.*, 2015; GINTER *et al.*, 2013).

A diabetes *mellitus* tipo II (DM2) pode ser desencadeada por fatores internos e externos como herança genética, sexo (com maior prevalência em pessoas do sexo feminino (FLOR *et al.*, 2015) e estilo de vida, que podem facilitar o desenvolvimento de doenças secundárias levando à morbidade e mortalidade, sendo a principal delas as doenças cardiovasculares associadas. Alguns órgãos estão intrinsecamente envolvidos no desenvolvimento da diabetes *mellitus* II, tais como pâncreas (células β e células α), fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, intestino delgado e tecido adiposo. Este último responsável pela ativação de vias inflamatórias que podem comprometer a eficiência do manuseio da

glicose pelos adipócitos, hepatócitos e células musculares e interferem na produção e sinalização da insulina (KOHLGRUBER; LYNCH, 2015).

1.3 Diabetes *mellitus* II e o músculo esquelético

Os dois órgãos mais importantes atingidos pela resistência à insulina na diabetes tipo II são o fígado e o músculo esquelético. O músculo é o responsável pela maior parte da captação de glicose no corpo estimulado por insulina, desempenhando um papel importante na resistência à insulina (IR). O acúmulo de lipídeos é um dos fatores que leva a IR especialmente devido ao acúmulo de triacilgliceróis no músculo esquelético em indivíduos obesos, estado que comumente precede a diabetes (FREEMAN; PENNING, 2021).

As funções do músculo esquelético vão além do suporte e movimento muscular, como a regulação do metabolismo em resposta a eventos fisiológicos, por este motivo possui grande capacidade adaptativa que variam conforme sua composição, tipo de fibra e outros fatores. As alterações nestes aspectos podem ativar eventos de sinalização e transcrição gênica reguladas por interferências na homeostase das células musculares, disponibilidade de oxigênio, estado redox, regulação do cálcio e disponibilidade energética (KJØBSTED *et al.*, 2018).

Ainda, a redução da força muscular do músculo esquelético é considerada um sinal que surge primariamente antes mesmo de serem detectadas as falhas nas células β -pancreáticas, uma vez que nos estágios iniciais da doença, a síntese prejudicada de glicogênio no músculo é o principal responsável pela resistência à insulina (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009).

Além disso, o músculo esquelético apresenta também alterações estruturais, metabólicas e funcionais em condições de obesidade e diabetes, tais como atrofia muscular (PERRY *et al.*, 2016), alterações no tipo de fibra (TRAJCEVSKI *et al.*, 2013), absorção prejudicada de glicose, síntese de glicogênio, oxidação de ácidos graxos (CIARALDI *et al.*, 2016), acarretando a fraqueza muscular e dificuldade em realizar exercícios físicos (TENG; HUANG, 2019), isso porque na atrofia muscular ocorre uma diminuição no volume das miofibras e na massa muscular, ocasionando a perda da força do músculo em pacientes com DM2, cuja incidência se eleva à medida que o indivíduo envelhece. Ademais, trabalhos indicam que o acúmulo de gordura nos músculos está associado ao comprometimento da função muscular (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2017; TENG; HUANG, 2019).

1.4 Estreptozotocina (STZ)

A estreptozotocina (STZ) é uma glicosamina-nitrosureia comumente usada para induzir a diabetes. É captada por transportadores GLUT-2 das células pancreáticas, portanto células que não apresentam estes transportadores são resistentes a este composto. Sua ação se dá pela alcalinização do DNA celular seguida da ativação de vias que culminam na depleção de NAD nas células pancreáticas com subsequente redução no nível de ATP e inibição da síntese e secreção da insulina (SILVA *et al.*, 2011).

Os mecanismos citotóxicos da STZ desencadeiam também a formação de radicais superóxido (SILVA *et al.*, 2011) e a liberação de quantidades tóxicas de óxido nítrico que inibe a atividade da enzima aconitase que participa do dano ao DNA. Como resultado, as células β são destruídas por necrose (SZKUDELSKI, 2001).

Assim, a utilização da estreptozotocina na indução da diabetes *mellitus* tipos I e II atua através da morte de células β por alquilação do DNA. Em doses elevadas, a STZ afeta de forma severa a secreção de insulina, desencadeando uma fisiopatologia semelhante à diabetes tipo I; entretanto, em doses baixas é possível simular a diabetes II por um comprometimento sutil da secreção de insulina, que configura esta patologia (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2012). Desta forma, o emprego conjunto de múltiplas doses baixas de insulina em adição à indução da resistência insulínica por meio da dieta hiperlipídica configura um modelo prático e reprodutível da diabetes tipo II produzindo hiperglicemia associado à hiperinsulinemia e resistência insulínica, um quadro típico desta patologia (FURMAN, 2015).

1.5 Dieta Hiperlipídica e resistência insulínica

A dieta hiperlipídica é comumente utilizada em estudos para indução de obesidade e resistência insulínica, já que o excesso de lipídios está associado a efeitos tóxicos nas células devido a metabólitos provenientes do metabolismo lipídico (CORCORAN; LAMON-FAVA; FIELDING, 2007) que favorecem disfunções celulares e mitocondriais que aumentam a produção de ROS, uma vez que a dieta hiperlipídica é conhecida por aumentar a produção de H_2O_2 nas mitocôndrias (KOH *et al.*, 2019), pela indução de compostos pró-inflamatórios que induzem disfunção muscular (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2017).

Além disso, a ingestão excessiva de nutrientes e calorias estão envolvidas em muitos processos patológicos, e foi sugerido que isso ocorra devido à ausência de adaptações seletivas para superar estes desafios (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015). Durante a demanda prolongada de energia, o músculo tem a capacidade de mudar de carboidratos para a utilização de ácidos graxos. Foi demonstrado que os roedores podem aumentar o gasto de energia em resposta à superalimentação para evitar o ganho excessivo de peso. Eles sugeriram que termogênese induzida pela dieta (DIT) pode ser benéfica para eliminar o excesso de calorias e prevenir doenças metabólicas (PERIASAMY; HERRERA; REIS, 2017).

Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 apresentam prejuízos na capacidade oxidativa de gordura que levam a altos níveis de ácidos graxos livres e são responsáveis por causar a resistência à insulina, diminuindo a captação de glicose no músculo esquelético pelo acúmulo de lipídeos intramiocelular (FREEMAN; PENNING, 2021).

Já foi relatado que sob condições de excesso lipídico podem ocorrer consequências a nível transcricional através de uma reorganização metabólica adaptativa para intensificar a taxa oxidativa de gordura tanto no fígado quanto no músculo como um mecanismo compensatório de administração deste combustível (PRIEGO *et al.*, 2008).

1.6 Proteômica

Dado o acelerado crescimento na prevalência da diabetes *mellitus* em todo o mundo, surge a necessidade de ferramentas que permitam realizar o diagnóstico precoce da doença; desta forma a identificação de biomarcadores e proteínas-alvo se apresentam como excelente ferramenta de busca. Estes marcadores correspondem a moléculas ou componentes biológicos que podem ser mensurados a fim de detectar alterações no estado normal. (GAN *et al.*, 2019).

As ferramentas “ômicas” se destacaram na identificação destes marcadores, permitindo o diagnóstico precoce de muitas doenças, além de fornecerem subsídios para melhor compreensão das mesmas, já que a multiômica permite explorar as diversas vias e mecanismos por trás das patologias, incluindo a diabetes *mellitus* tipo 2 (WANG; YONG; HE, 2021). Dentre estas ferramentas, a proteômica é muito útil e de extrema importância para estabelecer associações genéticas e identificar potenciais biomarcadores de risco para diversas patologias, desvendar vias biológicas e identificar possíveis alterações no perfil proteico, já que fornece uma gama de informações que permitem desvendar e compreender mecanismos-chave no estabelecimento destas doenças visando identificar estratégias preventivas e

alternativas de tratamento (MOULDER *et al.*, 2018).

1.7 Justificativa

A diabetes é uma doença fortemente prevalente no mundo, afetando várias faixas etárias e classes econômicas e pode contribuir para o desenvolvimento de outras doenças de risco, tais como problemas cardiovasculares, neurais e motores.

Por esta razão, compreender os mecanismos envolvidos na patologia da diabetes e como são afetados por estes fatores, é fundamental para a elaboração de tratamentos direcionados que busquem solucionar a causa em detrimento unicamente dos sintomas, sobretudo considerando a lacuna existente acerca dos mecanismos e fatores que envolvem esta patologia. Neste sentido, a proteômica é uma ferramenta muito útil, já que permite a identificação de proteínas-chave na regulação da diabetes, assim como identificar possíveis marcadores biológicos com potencial para serem aplicados para melhoria a qualidade de vida dos portadores.

2 OBJETIVO

O presente estudo objetiva analisar o perfil proteômico do músculo gastrocnêmio de camundongos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica e SZT, assim como verificar a influência da dieta hiperlipídica para o modelo experimentais de indução de DM2. Por fim, este estudo busca esclarecer os mecanismos envolvidos nesta patologia envolvendo o músculo e identificar possíveis marcadores.

3 METODOLOGIA

Este trabalho faz parte de um projeto de Pós Doutorado da Dra. Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira que visa investigar os mecanismos envolvidos na patologia da diabetes em diversos tecidos, assim como analisar a influência de fatores como a dieta e outros compostos sobre o perfil proteômico na condição diabética. Desta forma as análises presentes neste estudo representam parte de um projeto abrangente, sendo que outros testes e análises complementares estão sendo realizados paralelamente.

3.1 Obtenção dos animais

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética local da Faculdade de Odontologia de Bauru sob o número 001/2019.

Dezoito camundongos (n=6/grupo) machos adultos (6 semanas) das linhagens C57BL/6J e C57BL/6, provenientes respectivamente pelo Biotério de Matriz do ICB e pela Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, foram acomodados no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, sendo submetidos a uma fase de adaptação de 1 semana na qual foram alimentados com dieta padrão, sob condições controladas de luz, temperatura e umidade.

3.2 Tratamento dos animais

Um grupo (DHL) com 6 animais da linhagem C57BL/6J foram alimentados com ração hiperlipídica fornecida pela empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências[®], seguindo as orientações que constam na literatura (GILBERT *et al.*, 2011), por 8 semanas ou mais, até que atingissem o peso mínimo de 30 gramas. Outro grupo (CDD) também com 6 animais receberam uma dieta normocalórica por 8 semanas. A etapa subsequente se caracterizou por sucessivas injeções intraperitoneais de doses de 40 ou 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ), durante o período de 3-5 dias para a destruição de parte das células- β e redução da produção de insulina. Um grupo controle da linhagem C57BL/6 com 6 animais, recebeu a dieta normocalórica por 8 semanas, e injeções de soro para mimetizar o mesmo estresse ocorrido nas doses de estreptozotocina. A partir da semana posterior após confirmação de diabetes

(índice glicêmico $\geq 200\text{mg/dL}$) os camundongos de cada grupo : DHL: ratos diabéticos induzida por dieta hiperlipídica e estreptozotocina; CND: ratos não-diabéticos alimentados com dieta normocalórica; CDD: ratos diabéticos alimentados com dieta normal e tratados com estreptozotocina (Figura 1), Permaneceram nestas condições por 21 dias até o sacrifício.

Figura 2 – O esquema representa os grupos de estudo (CDD, DHL e CND) , os tratamentos que cada grupo recebeu e as relação entre eles. As linhas pretas curvas indicam a comparação entre tratamentos e a legenda indica os aspectos que se buscou analisar em cada comparação. .



Fonte: elaborado pela autora. Criado com BioRender.com.

A seleção da linhagem C57BL/6J se deve à alta propensão do grupo ao ganho de peso e desenvolvimento da resistência insulínica (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007) em decorrência de alterações genéticas nestes animais, diferentemente da linhagem C57BL/6, que é utilizada como *background* para camundongos transgênicos e mutantes. Os animais de cada grupo foram mantidos em grupos de 3 por caixa até a eutanásia. Com relação ao modelo utilizado, a conciliação da dieta hiperlipídica conjuntamente com a estreptozotocina é reconhecida como um modelo ideal para a simulação da diabetes humana tipo II em camundongos (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2012).

3.3 Eutanásia dos animais

Após o período experimental de 21 dias foi realizada a eutanásia dos animais. Para isso, os mesmos foram submetidos à uma câmara de CO₂, com auxílio de um fluxômetro para mensuração da concentração do gás como forma alternativa ao uso da anestesia (tiopental sódico), uma vez sugerida sua capacidade de alterar a glicemia (WINDELOV, PEDERSEN *et al.* 2016). Dentro destas condições, evita-se possíveis interferências nos processos bioquímicos, sobretudo no índice glicêmico. Os animais foram eutanasiados e tiveram a cavidade peritoneal exposta, então amostras do tecido muscular gastrocnêmio foram coletados para posterior análise proteômica, sendo acondicionadas a temperatura de -80°C.

3.4 Análise proteômica do tecido muscular

A análise proteômica das amostras foi realizada em triplicata biológica e técnica, sendo utilizados *pools* de 2 animais de cada grupo, o que já foi demonstrado como suficiente em outros trabalhos (PEREIRA; LEITE *et al.*, 2013; DIONIZIO; MELO *et al.*, 2018). Primeiramente foi realizada uma solução de lise para a desnaturação inicial das proteínas utilizando 100 mg de amostras de tecido muscular gastrocnêmio dos animais, aos quais foi acrescentado 500 µL de tampão de lise A (7 M Uréia, 2M Tiouréia, 40 mM DTT em 50 mM de NH₄HCO₃ (Ambic) pH 7,8). A solução foi homogeneizada em um homogeneizador elétrico e um béquer contendo gelo para impedir a degradação de proteínas teciduais. Após, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 min, 20.817 g, 4 °C, e o sobrenadante foi coletado.

Para a quantificação das proteínas contidas nas amostras foi realizado o Teste de Bradford, altamente empregado em laboratórios por consistir em uma técnica simples, rápida e sensível, além de não sofrer interferências de componentes não-proteicos. Neste método é utilizado um corante Coomassie Blue G250 que deve se ligar à proteína, o que gera mudanças de coloração e permite a mensuração destes componentes na amostra (KRUGER, 2009; KIELKOPF *et al.*, 2020). O ensaio foi realizado em duplicata seguindo o descrito (BRADFORD, 1976), sendo utilizados 5 µL de amostra e 250 µL do reagente para cada reação feita com o kit, e posterior incubação durante 5 min em temperatura ambiente.

A leitura de absorvância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro, uma vez que este é o comprimento de onda ideal para este reagente (KRUGER, 2009; KIELKOPF *et al.*,

2020). As concentrações proteicas foram quantificadas por comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de soro bovino (BSA), o componente mais utilizado como padrão e, portanto, com valores conhecidos, além de ser facilmente encontrado em sua forma pura e ser pouco dispendioso (KRUGER, 2009). Após, foram utilizados 100µg de proteínas para dar sequência aos experimentos.

Em sequência a quantificação foi realizada redução das amostras; para isso, 5 mM de DTT (ditiotreitól) foram acrescentados à solução e agitados em vórtex, sendo o tubo transferido para um bloco aquecido (37°C) e incubado por 40 min e posteriormente as amostras foram alquiladas com 10 mM de iodoacetamida para impedir nova formação das pontes dissulfeto anteriormente rompidas e foi agitado em vórtex. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em ambiente afótico à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a digestão das proteínas pela adição 50 µL de tripsina, sendo então transferidas para um bloco à temperatura de 37°C durante 16 horas.

Após, 10 µL de solução bloqueadora contendo TFA 5% foi agitada e incubada a 37°C por 90 minutos seguindo para a fase de purificação e dessalinização em coluna C18 Spin, e então houve nova quantificação das amostras pelo método de Bradford. Por fim as amostras foram ressuspensas em solução de ácido fórmico 0,1% e ACN 3% (AF/ACN) e transferidas para um *vial* e levadas até o equipamento de cromatografia líquida reversa acoplado ao espectrômetro de massas.

3.4.1 Aquisição nano-LC-ESI-MS/MS

Para as análises dos peptídeos foi utilizado o espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milford, MA). O equipamento é composto por um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA), é equipado com uma Trap Column (responsável pela cromatografia; Trap Column: 100Å, 5 µm, 180 µm x 200 mm), previamente equilibrada com 99,9% de fase A (0,1% de ácido fórmico em água) a um fluxo de 5 µl/min e uma coluna HSS T3 M-Class (coluna analítica; coluna Acquity UPLC HSS T3 M-Class 75µm x150mm; 1,8µm) (Waters, Milford, MA), previamente equilibrada com 93% da fase móvel A e fase móvel B (ácido fórmico a 0,1% em ACN). Os peptídeos foram separados por um gradiente linear de 7 a 85% da fase móvel B por 70 min com vazão de 0,35 µL/min; a temperatura da coluna é mantida a 45 °C. O espectrômetro de massa Xevo G2 Q-TOF foi operado no modo de íon nano-eletro-spray positivo e os dados foram coletados usando o método MSE em

energia elevada (19-45V).

As condições ideais da fonte incluem tensão capilar, 2,8kV; cone de amostra, 40V; cone de extração, 3.0 V e temperatura da fonte 100 °C. No entanto, as condições da fonte podem variar devido às configurações de tensão do detector e do lock spray. A aquisição dos dados ocorreu por 70 min e o intervalo de varredura foi de 50 a 1.500 Da. O lock spray foi operado com uma solução de Glu-fibrinopeptídeo [Glu1] (1 pmol/ μ L) a uma taxa de fluxo de 0,3 μ L/min, com íon de referência no modo positivo a uma relação m/z 785,8427. O software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milford, MA) foi usado para processar e pesquisar os dados contínuos de LC-MSE.

A identificação das proteínas do músculo foi realizada usando o algoritmo de contagem de íons incorporado ao software, utilizando uma pesquisa no banco de dados *Mus musculus* do catálogo UniProtKB (Universal Protein Resource) (<http://www.uniprot.org>). Todas as amostras foram injetadas em triplicata técnica. A diferença de expressão entre os grupos foi analisada pelo teste t ($p < 0,05$).

3.5 Análise dos dados por meio da bioinformática

Os dados foram analisados com auxílio do software Cytoscape v 3.9.0 do plug-in Cluego v 2.5.8 + Clupedia v 1.5.8 (BINDEA; MLECNIK *et al.* 2009, BINDEA; GALON *et al.* 2013) e foi realizada a classificação funcional de acordo com o processo biológico envolvido das proteínas com diferença de expressão e únicas identificadas, sendo utilizadas neste estudo as proteínas mais relevantes segundo o processo biológico considerando a ontologia genética (GO) e as categorias com maior expressão. Para a geração das subnetworks as proteínas identificadas pelo banco de dados UNIPROT foram inseridas no programa ClusterMaker 2 v 2.0 seguindo as configurações: teste estatístico de enriquecimento/esgotamento (teste hipergeométrico bilateral), método de correção de Bonferroni step down, nível mínimo de ontologia genética (GO) = 4, nível máximo de GO = 7, número de Genes = 4 e porcentagem mínima = 10%, com tamanho final do grupo após a fusão = 15, filtro de genes *Mus musculus* (10090). Estas configurações são adaptadas pelo pesquisador conforme critérios de pesquisa, considerando o volume de dados desejado para análise, demais configurações são automaticamente fornecidas pelo software. As subnetworks de todos os grupos foram construídas utilizando-se os mesmos critérios para padronização das análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Funcional

As análises realizadas apontam para o perfil proteômico de cada comparação (CDD X CND; DHL X CND; DHL X CDD), mostrando as alterações observadas em cada comparação e os termos com mais genes envolvidos. Os resultados mostram que três categorias funcionais se destacaram nas três comparações, sendo elas: contração muscular, metabolismo de carboidratos e metabolismo energético. Estas categorias serão abordadas e analisadas no decorrer do trabalho para cada comparação .

Para os resultados da análise funcional 67 proteínas com alteração presentes nas categorias funcionais foram analisadas, cuja expressão e distribuição entre os grupos são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 - Perfil de expressão das proteínas nas comparações entre os grupos. Os dados foram obtidos a partir da seleção das proteínas mais relevantes demonstradas pela análise por ontologia genética (Cytoscape) e segundo as categorias com maior porcentagem de genes associados.

| GRUPO | Proteínas únicas¹ | Proteínas + reguladas² | Proteínas - reguladas³ | Proteínas totais⁴ |
|------------------|-------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| CDD X CND | 1 | 8 | 30 | 49 |
| DHL X CND | 6 | 38 | 10 | 55 |
| DHL X CDD | 3 | 45 | 2 | 59 |

Fonte: elaboração pela autora segundo análise dos dados.

1 -Proteínas únicas : proteínas encontradas exclusivamente na referida comparação;

2- Proteínas +reguladas :proteínas que apresentaram aumento da expressão em relação ao grupo que está sendo comparado , sendo sempre o grupo da frente da comparação que possui a expressão aumentada ou reduzida em relação ao segundo grupo . 3- Proteínas – reguladas : proteínas que estavam com a expressão reduzida na comparação ;4- Proteínas totais : número total de proteínas encontradas na comparação (única, + reguladas e – reguladas) somada às proteínas em comum com outras comparações (valor restante que totaliza a somatória).

4.1.1 Perfil geral dos termos com mais genes associados

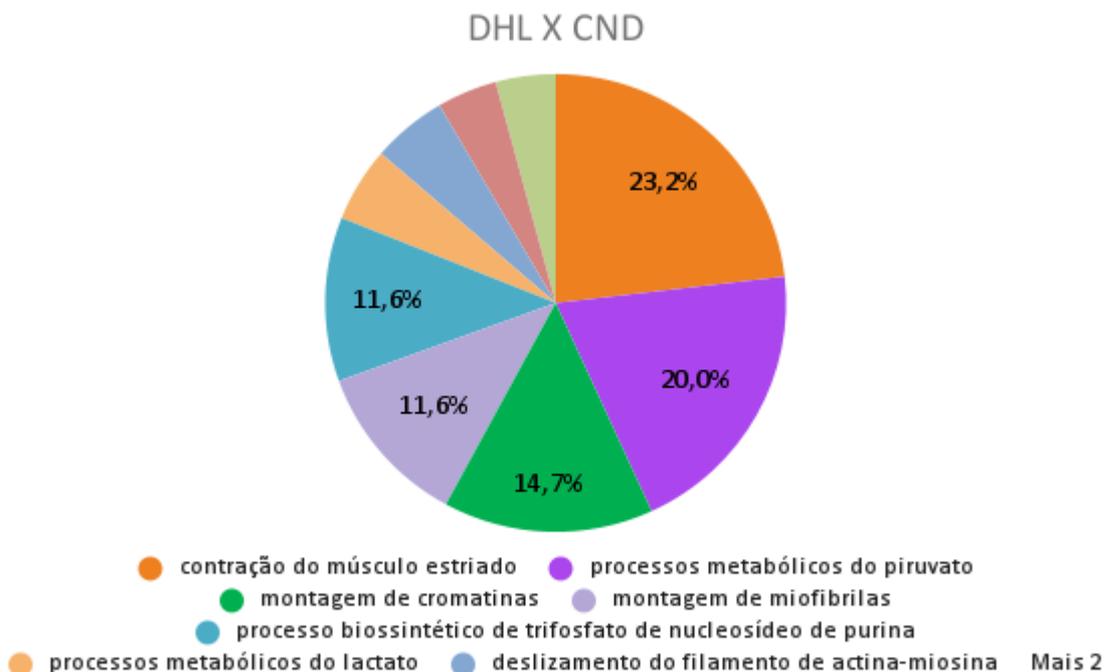
A seguir serão apresentados os perfis gerais de cada comparação através dos termos com maior porcentagem de genes associados que obtiveram diferença de expressão. Os gráficos que se seguem foram construídos a partir das análises de processos biológicos

realizada no software Cytoscape ® considerando os termos com maior porcentagem de genes associadas.

4.1.1.1 DHL X CND

Esta comparação visa observar os termos com maior porcentagem de genes associados presentes nos grupos DHL (diabético) em comparação ao grupo controle CND (não diabético), conforme visto no gráfico 2. Os três termos com maior porcentagem de genes associados são: contração do músculo estriado (23,2%), processos metabólicos do piruvato (20%) e conjunto de cromatinas (14,7%). Já consta na literatura que a diabetes tipo II têm impacto nos músculos liso e esquelético (YUZEFOVYCH *et al.*, 2013), este último sobretudo relacionado à perda da massa muscular e atrofia, além de danos no reparo muscular (PERRY *et al.*, 2016).

Gráfico 2 - Perfil geral da análise funcional da comparação entre os animais do grupos DHL X CND de acordo com a função do processo biológico de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0 e termos com mais genes associados. 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.

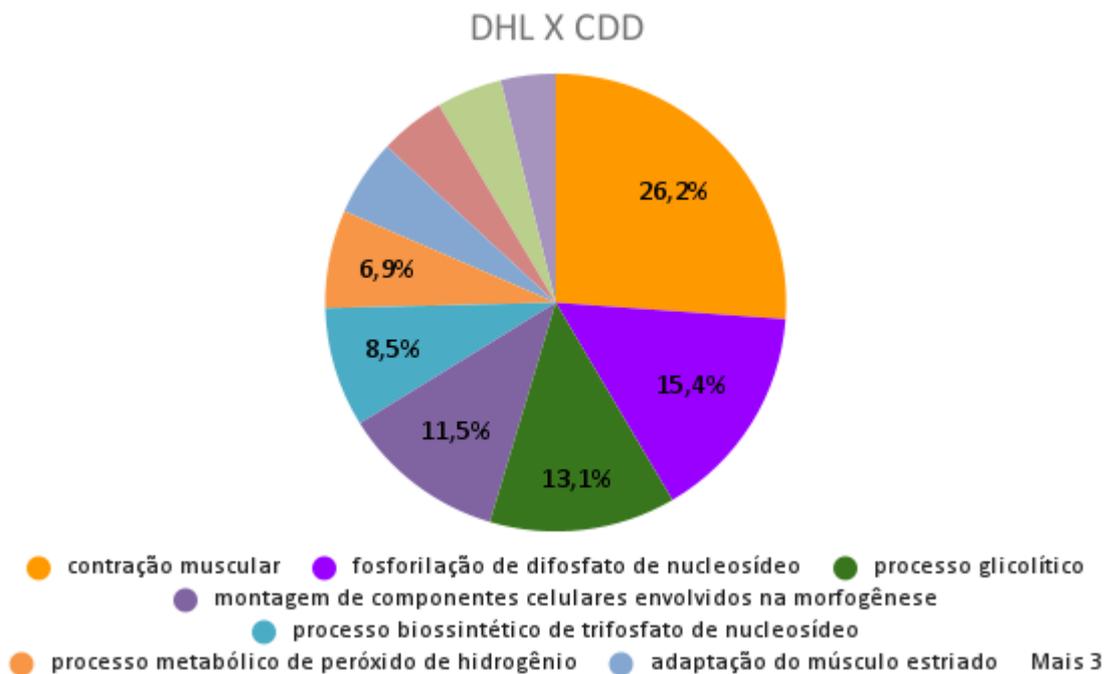


Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos das análises.

4.1.1.2 DHL X CDD

Os três termos com mais genes associados nesta comparação são mostrados no gráfico 3: contração muscular (22%), fosforilação de difosfato de nucleosídeos (13%) e processos glicolíticos (11%), representando juntos 46% dos termos identificados. As alterações na contração muscular, metabolismo energético e de carboidratos se destacam nesta comparação e já estão bem estabelecidas na diabetes tipo 2. Alguns termos indicativos de possível estresse oxidativo podem ser observados, como processos metabólicos do peróxido de hidrogênio (6,9%) e do lactato (3,3%), que serão discutidos mais adiante.

Gráfico 3 - Perfil geral da análise funcional da comparação entre os animais dos grupos DHL X CDD de acordo com a função do processo biológico de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0 e termos com mais genes associados. 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.

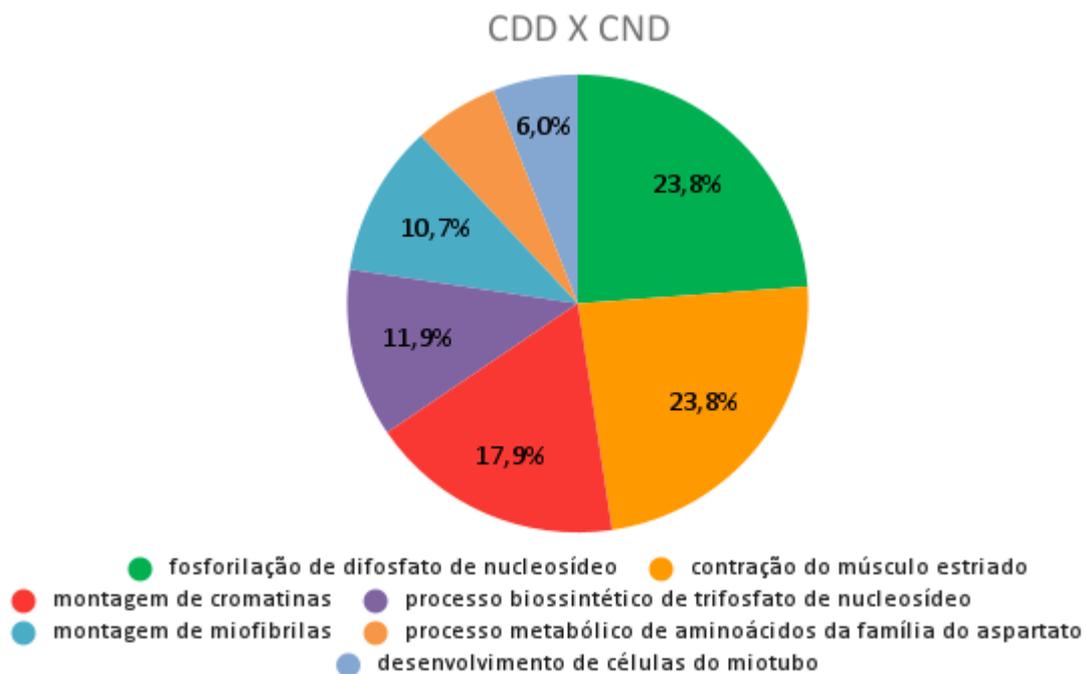


Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos das análises.

4.1.1.3 CDD X CND

O gráfico 4 mostra os termos com mais genes associados referentes a comparação CDD X CND. Os termos “contração do músculo estriado” (23,8%), “fosforilação de difosfato de nucleosídeo” (23,8%) apresentaram as maiores porcentagens de genes associados, correspondendo juntos a 47,9% do total. Em seguida montagem de cromatinas (17,9%), sendo que estes três termos representam juntos 65,5% do total. É possível notar desta forma que houveram alterações significativas na expressão de genes associados à atividade muscular e metabolismo energético no grupo diabético.

Gráfico 4 - Perfil geral da análise funcional da comparação entre os animais dos grupos CDD X CND de acordo com a função do processo biológico de que participam, fornecida pelo software Cytoscape® 3.9.0 e termos com mais genes associados. 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.



Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos das análises.

4.2 Análise das alterações em cada categoria funcional

As análises realizadas de função biológica das proteínas identificadas neste estudo permitiu a confecção dos gráficos acima que revelam os termos com maior porcentagem de genes associados de acordo com o processo biológico envolvido. A partir destes dados algumas funções se destacaram e destas, as três categorias mais expressivas foram selecionadas para análise. Desta forma, categorias observadas exclusivamente em uma comparação não foram utilizadas, uma vez que objetivou-se analisar os padrões de alteração destas proteínas/funções presentes de forma comparativa entre os grupos. Assim, as 3 categorias observadas que atenderam a estes critérios são: contração muscular, metabolismo energético e metabolismo de carboidratos.

4.2.1 Contração muscular

A tabela 2 mostra as principais proteínas envolvidas na contração muscular identificadas no presente estudo em cada comparação e o estado de regulação das mesmas, indicados pela cor verde (super-reguladas) e vermelha (sub-reguladas) e únicas (siglas dos grupos). É possível observar diversas subunidades de algumas das principais proteínas contráteis do músculo como actinas, miosinas, troponinas e tropomiosinas. Além disso, outras categorias destacam-se como a regulação da homeostase do cálcio, essencial para a contração muscular.

Tabela 2 - Proteínas associadas à contração muscular em cada comparação (DHL X CND; DHL X CDD; CDD X CND). A cor verde representa as proteínas positivamente reguladas no grupo tratado em comparação ao controle, e a cor vermelha representa regulação negativa. As siglas mostram as proteínas expressas unicamente no respectivo grupo.

| GENE | ID | NOME | DHL X CND | DHL X CDD | CDD X CND |
|--------|--------|---|--------------|--------------|--------------|
| ACTC1 | P68033 | Actina_ músculo cardíaco alfa 1 | Verde | Verde | Vermelho |
| ACTN3 | O88990 | Alfa-actinina-3 | Vermelho | Verde | Vermelho |
| AKAP9 | Q9WT5 | Proteína âncora 12 de A-quinase | | CDD | CDD |
| ANK2 | Q8C8R3 | Anquirina-2 | | CDD | CDD |
| ATP2A1 | Q8R429 | ATPase 1 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático | Verde | | Verde |
| ATP2A2 | O55143 | ATPase 2 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático | Verde | Verde | Vermelho |
| CASQ1 | O09165 | Calsequestrina-1 | | Verde | Vermelho |

| | | | CDD | CDD |
|-------|--------|---|-----|-----|
| MB | P04247 | Mioglobina | | |
| MYH3 | P13541 | Miosina-3 | | |
| MYH6 | Q02566 | Miosina-6 | | |
| MYH7 | Q91Z83 | Miosina-7 | | |
| MYH7B | A2AQP0 | Miosina-7B | | |
| MYH8 | P13542 | Miosina-8 | | |
| MYL1 | P05977 | Cadeia leve de miosina 1/3_ isoforma do músculo esquelético | | |
| PGAM2 | O70250 | Fosfoglicerato mutase 2 | | |
| TNNC2 | P20801 | Troponina C_ músculo esquelético | | |
| TNNI2 | P13412 | Troponina I_ músculo esquelético rápido | | |
| TNNT3 | Q9QZ47 | Troponina T_ músculo esquelético rápido | | |
| TPM1 | P58774 | Cadeia beta da tropomiosina | | |
| CALM3 | P0DP28 | Calmodulina-3 | | |
| LDB3 | Q9JKS4 | Proteína 3 de ligação ao domínio LIM | | |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

O músculo estriado é composto por filamentos contráteis chamados sarcômeros formados por bandas de actinas e miosinas, as principais proteínas contráteis do músculo além do complexo tropomiosina-troponina - que regula a homeostase do Ca^{2+} e pode impedir a interação entre actina e miosina nas células musculares relaxadas (SWEENEY; HAMMERS, 2018).

Nas duas primeiras comparações (DHL X CND e DHL X CDD), foi observada a regulação positiva de várias subunidades de actina e miosina, assim como de proteínas adaptativas do músculo estriado, motilidade e modulação das células musculares, o que aponta para um possível efeito compensatório das mesmas. O gene LDB3(Q9JKS4) que estava com a sua expressão aumentada em todas as comparações interage com actinas e miosinas na estruturação e integridade muscular e está envolvido na adaptação e integridade dos sarcômeros, e alterações neste gene são responsáveis por disfunções musculares, como a miopatia (UNIPROT, 2021). As cadeias leves regulatórias das miosinas estão envolvidas no reparo muscular, e alterações nesta proteína podem indicar desta forma, estresse oxidativo e interferências neste processo (ARAGNO *et al.*, 2004). Isso pode sugerir que a regulação positiva de subunidades desta proteína (nas comparações DHL X CND e DHL X CDD) indiquem um processo adaptativo no músculo, reforçado pela regulação positiva da proteína 3 de ligação ao domínio LIM (LDB3-Q9JKS4) nas três comparações.

Outros estudos também reforçam essa hipótese adaptativa; Wilde *et al.*, (2008) avaliou o efeito de dois modelos de dieta com alta e baixa concentração de gordura a curto prazo, e constatou que animais alimentados com dieta hiperlipídica por 3 e 28 dias mostraram regulação positiva de diversas proteínas musculares contráteis por meio da ativação da morfogênese e de vias adaptativas, o que pode esclarecer o observado no presente estudo.

Em CDD X CND é possível observar a sub-regulação da maioria das proteínas contráteis, reguladoras de cálcio e associadas ao processo de regeneração, condizendo com o que consta na literatura acerca da função muscular na diabetes, disfunção mitocondrial e prejuízo ao sistema de reparo, e manutenção de fibras musculares (HESSELINK; SCHRAUWEN-HINDERLING; SCHRAUWEN *et al.*, 2016). Estes danos são desencadeados por um estado inflamatório induzido pela diabetes que estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e induz o estresse no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias, prejudicando o metabolismo energético. Neste caso parece que o efeito da aplicação da estreptozotocina levou a alterações contrárias as encontradas quando se associa a dieta hiperlipídica. O tópico acerca do metabolismo energético será abordado com mais detalhes mais adiante.

4.2.1.1 F-box proteína 32 (FBXO32)

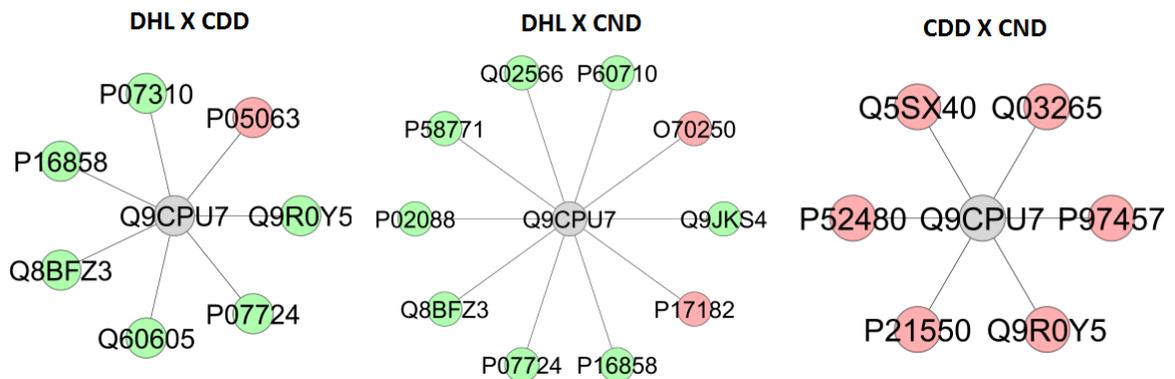
Uma proteína sugerida nas três comparações foi observada durante as análises: F-box proteína 32 (Q9CPU7). Esta proteína foi sugerida pelo software Cytoscape ® pela sua capacidade de interagir e regular outras proteínas referentes às três comparações estudadas que foram identificadas no presente estudo. A proteína F-box 32 (gene FBXO32) também chamada atrogina-1 ou ainda "MAFbx", para "*Muscle Atrophy F-box gene*" está essencialmente ligada à atrofia muscular e sarcopenia. Isso porque desempenha papel como ubiquitina ligases E3 que se encontram no músculo esquelético, orientando a poliubiquitinação de proteínas para a proteólise (GUMUCIO; MENDIAS, 2012). As proteínas da família FoxO são responsáveis pela transcrição e responsivas ao estresse, além de estarem intrinsecamente envolvidas na degradação de proteínas musculares por ubiquitinação; desta forma esses genes modulam respostas como atrofia muscular, autofagia e podem ser ativados por uma cascata de reações mediada pela insulina (O'NEILL *et al.*, 2019).

O FBXO32 é comumente induzido em algumas patologias como a diabetes na qual é comum o desenvolvimento da atrofia muscular; em decorrência do aumento do catabolismo e a diminuição da síntese proteica; como resultado, a ativação de vias de proteólise e

ubiquitinas acontece, incluindo a ativação da atrogina-1; esta ativação é acompanhada geralmente pela redução do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que podem estimular a proliferação e a diferenciação de mioblastos (ABE *et al.*, 2019).

Esta proteína muscular atua como uma reserva de aminoácidos que são mobilizados durante o estado de jejum ou estados patológicos para garantir a gliconeogênese hepática e produção energética. Desta forma, maiores taxas de degradação proteica nos músculos acarreta em perda muscular acelerada, assim como redução de proteínas; este cenário ocorre frequentemente em doenças sistêmicas, como diabetes, câncer, entre outras. A proteólise é estimulada pela ativação da via proteossoma-ubiquitina, da qual a F-box faz parte (ABE *et al.*, 2019). A figura 5 mostra as subnetworks obtidas através do programa ClusterMaker mostrando como a proteína F-box 32 interage com algumas proteínas identificadas neste estudo. Desta forma, embora não identificada neste estudo, o fato de ter sido sugerida nas três comparações aponta para um perfil de estresse e dano muscular nas mesmas.

Figura 3 - subnetworks representando proteínas que interagem com F-box-32. A proteína central foi sugerida pelo software e interage com as proteínas identificadas nestes estudo. Nodos verdes indicam regulação positiva, e vermelhos, regulação negativa.



Fonte: elaborado pela autora com base nas proteínas identificadas (apêndice B) com auxílio do plug-in ClusterMaker.

As tabelas 3 e 4 apresentam as proteínas identificadas que interagiram com a F-box 32 (Figura 3) referentes às comparações DHL X CDD e DHL X CND envolvidas principalmente três categorias: contração muscular, metabolismo de carboidratos (glicólise/gliconeogênese) e fosforilação oxidativa, assim como a razão destas proteínas entre os grupos e seu estado de regulação, sendo verde para super-reguladas e vermelhas para sub-reguladas.

Tabela 3 - Proteínas que interagiram com F-box-32 (Figura 3) referentes à comparação DHL X CDD e razão entre os grupos. As cores indicam regulação positiva (verde) ou negativa (vermelho).

| ID | NOME | RAZÃO DHL: CDD |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| P07310 | Creatina quinase tipo M | 1,97 |
| P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | 1,15 |
| Q8BFZ3 | Proteína tipo beta-actina 2 | 1,38 |
| Q60605 | Polipeptídeo leve de miosina 6 | 2,61 |
| Q9R0Y5 | Adenilato quinase isoenzima 1 | 1,95 |
| P07724 | albumina | 3,19 |
| P05063 | frutose-bifosfato aldolase C | 0,75 |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise dos dados.

Tabela 4 - Proteínas que interagiram com F-box-32 (Figura 3) referentes à comparação DHL X CND e razão entre os grupos. As cores indicam regulação positiva (verde) ou negativa (vermelho).

| ID | NOME | RAZÃO DHL: CND |
|---------------|---|-------------------|
| Q02566 | Miosina-6 | 1,52 |
| P60710 | Actina, citoplasmática 1 | 1,60 |
| P58771 | Cadeia alfa-1 da tropomiosina | 1,35 |
| P02088 | Subunidade do músculo cardíaco da hemoglobina tipo alfa | 1,21 |
| Q8BFZ3 | Proteína tipo beta-actina 2 | 1,62 |
| P07724 | Albumina | 2,32 |
| P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | 1,08 |
| Q9JKS4 | Proteína 3 de ligação ao domínio LIM | 1,27 |
| P17182 | Alfa-enolase | 0,86 |
| O70250 | Fosfoglicerato mutase 2 | 0,84 |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise dos dados.

Na comparação DHL X CDD a F-box-32 regulou positivamente 6 proteínas (P07310; P16858; Q8BFZ3; Q60605; Q9R0Y5; P07724) e negativamente (P05063) cujas razões constam na tabela 3. A maioria destas proteínas está envolvida na contração muscular (Q8BFZ3; Q60605), fosforilação oxidativa (P07310; Q9R0Y5) metabolismo de carboidratos/glicólise (P16858; P05063). Uma observação semelhante pode ser feita para a comparação DHL X CND, que também apresentou uma sub-unidade de hemoglobina (P02088). Para a comparação CDD X CND, todas as proteínas foram sub-reguladas: miosina 1 (Q5SX40), Subunidade de ATP sintase alfa_ mitocondrial (Q03265), Piruvato quinase (P52480), beta-enolase (P21550), Adenilato quinase 1 (Q9R0Y5) e Miosina 2 (P97457). A associação com proteínas envolvidas no metabolismo da glicose e proteínas contráteis já é conhecida, dada a importância do músculo na captação de glicose (SANTOS *et al.*, 2008). Ainda, a albumina (P07724) que apareceu em DHL X CND (aumentada em 2,32 vezes) e DHL X CDD (3,19 vezes) está envolvida no transporte de cálcio (ZHU *et al.*, 2019) e ao

transporte de ácidos graxos (STADLER; GOLDBERG; SUSZTAK, 2015), associando-se ao risco de DM2; portanto a superexpressão desta proteína nos grupos que receberam dieta hiperlipídica é coerente com o maior aporte de ácidos graxos proveniente da dieta na corrente sanguínea destes animais.

Embora muitos estudos relatem o desenvolvimento de atrofia muscular como consequência do diabetes, já foi documentada a hipertrofia compensatória em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, já que a redução da sensibilidade das células à insulina pode resultar em um efeito rebote, onde ocorre uma secreção em excesso deste hormônio (FERNANDES, 2013) nos músculos e em resposta ao aumento de carga/trabalho ou atrofia das miofibrilas (FOSSEY; GREG HALL; LEININGER, 2018) e também por influência da expressão de calsequestrina, que também foi identificada neste estudo e cuja expressão se mostrou ausente em DHL X CND, positivamente regulada em DHL X CDD ($r= 2,59$) e negativamente regulada em CDD X CND (tabela 1). Além disso, as alterações na expressão de proteínas do retículo endoplasmático (RE) reguladoras de cálcio sugerem, além de disfunções nesta organela, possível estresse oxidativo (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015).

Leite *et al.*, (2014) observaram em seu estudo testando a ação do flúor no músculo gastrocnêmio de camundongos diabéticos a superexpressão de diversas subunidades de miosinas nos animais controle possivelmente devido à constante necessidade de reparo em músculos diabéticos. Outra possibilidade é que as observações feitas decorram do tempo de tratamento a que os camundongos foram submetidos. Muitos estudos que demonstraram atrofia muscular, perda de massa muscular e subexpressão de proteínas contráteis foram realizados em períodos curtos (cerca de 3 semanas), e a diabetes foi induzida com uma única dose de estreptozotocina. É possível que o estresse constante decorrente do longo tempo de tratamentos dos animais do presente estudo (~12 semanas) e o número de doses subsequentes de STZ (3 a 5 dias) associado à dieta hiperlipídica no grupo que receberam essa dieta, tenham estimulado a adaptação do músculo esquelético. Desta forma, as proteínas contráteis teriam sido positivamente reguladas como uma forma de superar este estresse. É relevante pontuar, que os outros grupo receberam a dieta padrão por todo os experimento (12 semanas) e o grupo CDD recebeu também doses de SZT e após a diabete instalada permaneceu nesse estado por 3 semanas.

4.2.1.2 Regulação e homeostase do cálcio

A contração muscular é dependente de cálcio, isso porque este íon é responsável por regular as vias que permitem a interação entre as proteínas contráteis que irão estimular ou inibir a contração muscular. Desta forma, alterações na regulação do cálcio são fundamentais na integridade desta função, além de que já existem evidências de que a regulação prejudicada na homeostase do cálcio é um dos sinais na diabetes (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015).

Tabela 5 - Proteínas identificadas envolvidas na regulação do cálcio para cada comparação. A cor verde representa proteínas que foram reguladas positivamente, enquanto a cor vermelha indica regulação negativa.

| GENE | ID | NOME | DHL X | DHL X | CDD X |
|--------|--------|---|-------|--------|----------|
| | | | CND | CDD | CND |
| ATP2A1 | Q8R429 | ATPase 1 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático | Verde | Branco | Verde |
| ATP2A2 | O55143 | ATPase 2 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático | Verde | Verde | Vermelho |
| CASQ1 | O09165 | Calsequestrina-1 | Verde | Verde | Vermelho |
| CALM3 | P0DP28 | Calmodulina-3 | Verde | Verde | Branco |
| TNNC2 | P20801 | Troponina C_ músculo esquelético | Verde | Branco | Verde |
| TNNI2 | P13412 | Troponina I_ músculo esquelético rápido | Verde | Branco | Vermelho |
| TNNT3 | Q9QZ47 | Troponina T_ músculo esquelético rápido | Verde | Verde | Vermelho |
| TPM1 | P58774 | Cadeia beta da tropomiosina | Verde | Verde | Branco |

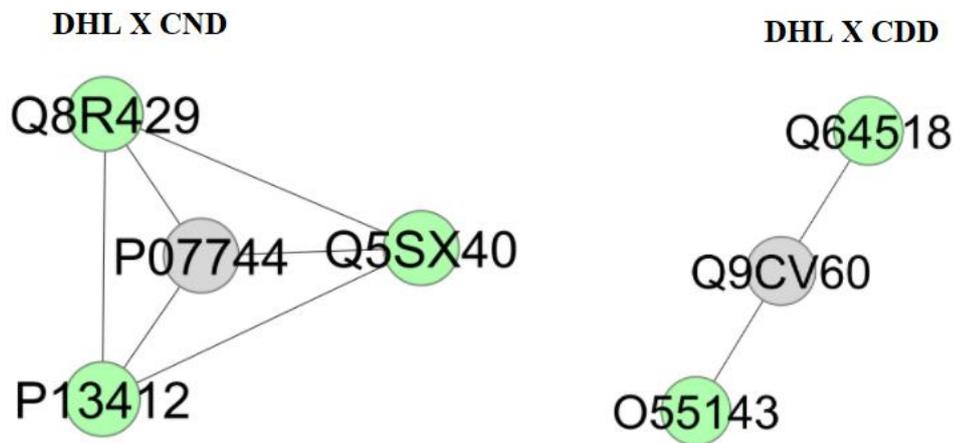
Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

A tabela 5 mostra as proteínas envolvidas na regulação do cálcio que foram identificadas neste estudo em cada comparação. Nas duas primeiras comparações (DHL X CND e DHL X CDD), em acordo com o que foi observado para a função contrátil, a maioria das proteínas reguladoras do cálcio foram positivamente reguladas, enquanto no último grupo (CDD X CND), com exceção de ATPase 1 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático (Q8R429 – razão (r) 1,15) e Troponina C_ músculo esquelético (P20801 – razão 1,72) que foram super-reguladas, as demais foram negativamente reguladas. Muitos estudos relatam que a disfunção de organelas reguladoras do cálcio são observadas em patologias como a diabetes (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015), já que a problemas na regulação do cálcio foram associados ao comprometimento do metabolismo da glicose, sendo sugerido que maiores níveis circulantes deste mineral apresentam uma relação positiva com a propensão à diabetes *mellitus* 2 (ZHU *et al.*, 2019). Esses dados indicam a importância da presença da dieta hiperlipídica para gerar alterações condizentes com a DM2,

uma vez que no grupo que recebeu a dieta padrão (CDD) quando comparado ao controle (CND) se observa o inverso com redução destas proteínas indicando uma possível redução destes níveis de cálcio.

As subnetworks abaixo (Figura 4) foram geradas a partir dos dados que constam nas tabelas 11 e 12 respectivamente (apêndice B) e mostram a interação entre algumas destas proteínas, e como se relacionam com a contração muscular.

Figura 4 - subnetworks representando proteínas envolvidas na regulação do cálcio mostrando as interações entre as proteínas identificadas que demonstraram diferença de expressão entre os grupos diabético (DHL) e controle (CND). O nodo central representa a proteína sugerida pelo software que interage com as proteínas positivamente reguladas identificadas neste estudo (nodos verdes).



Fonte: elaborado pela autora com base nas proteínas identificadas (apêndice B) com auxílio do plug-in ClusterMaker.

A subnetwork DHL X CND mostra no nodo central a proteína queratina citoesquelética tipo II 4 (P07744) sugerida pelo software que aparece interagindo com as proteínas identificadas neste estudo e foram positivamente reguladas, sendo elas Miosina-1 (Q5SX40 – razão (r) 1,72), envolvida na contração muscular, Troponina I (P13412 $r=1,54$), Retículo sarcoplasmático de cálcio ATPase 1 (Q8R429 – $r=1,23$). Esta última sendo a de maior relevância nesta subnetwork, por ser uma proteína responsável por regular a captação de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, regulando a contração muscular, hidrólise de ATP, e atuando como um indicador de alterações mitocondriais, marcador de estresse do retículo endoplasmático e processos apoptóticos (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015); logo, a regulação positiva desta proteína nestes grupos indica maior captação do cálcio, aumento na quebra de ATP e consequentemente, regulação da atividade muscular.

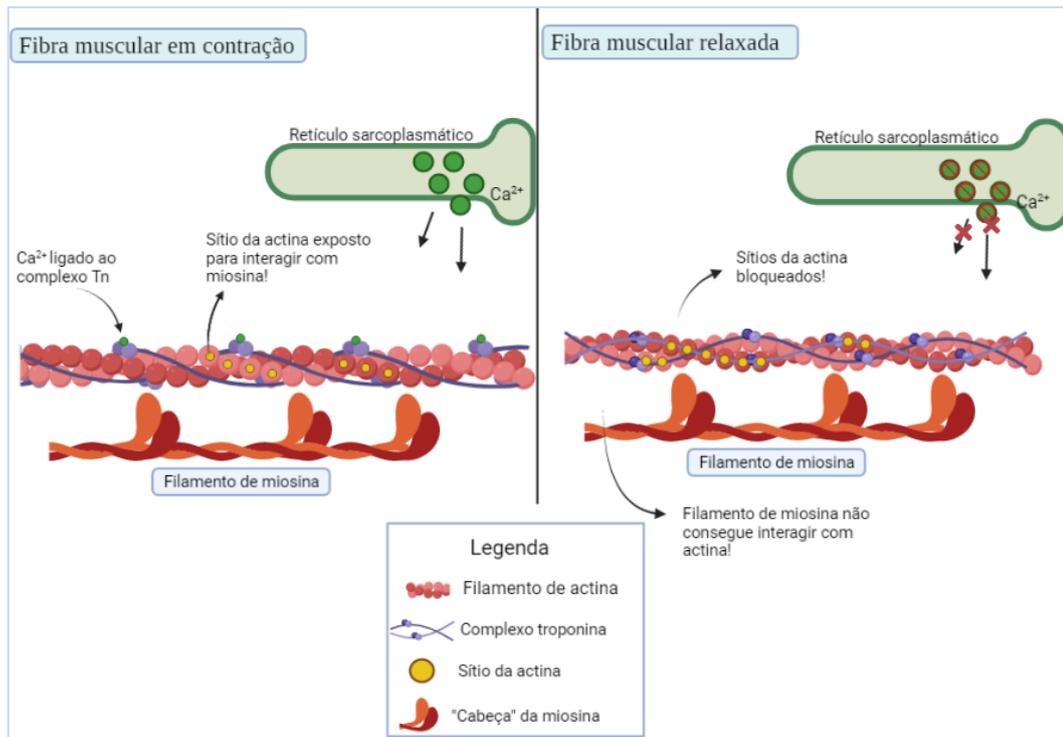
Já com relação à subnetwork DHL X CDD, vê-se no centro (nodo branco) a Miorregulina (Q9CV60, gene *Mrln*), a qual possui a capacidade de reduzir a afinidade aparente da ATPase pelo Ca^{2+} de forma a inibir a atividade da ATP2A1 / SERCA1 ATPase no retículo sarcoplasmático. Esta proteína foi sugerida pelo software e interage com outras duas proteínas identificadas neste estudo, sendo elas ATPase 3 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático (Q64518 – $r=2,23$) e ATPase 2 de cálcio do retículo endoplasmático/sarcoplasmático (O55143 – $r=2,69$). Desta forma, a miorregulina está associada à regulação da atividade do músculo esquelético e pode ser uma boa indicadora da integridade desta função.

Qaisar e colaboradores (2018) relataram que a ativação da bomba SERCA no músculo esquelético é capaz de melhorar o quadro de comprometimento do músculo e reduzir a atrofia e perda de massa muscular em camundongos sofrendo com estresse oxidativo, prevenindo a geração de ROS, demonstrando a importância desta proteína nos grupos mencionados (DHL X CND e DHL X CDD) e reforçando seu papel adaptativo frente condições de estresse; em contraste, em CDD X CND uma das subunidades desta proteína foi negativamente regulada sugerindo um prejuízo na função desta proteína. Esta observação condiz com as proteínas referentes à contração muscular que também apresentaram regulação negativa neste grupo.

Já existem evidências de que a regulação prejudicada na homeostase do cálcio é um dos sinais da diabetes (ARRUDA; HOTAMISLIGIL, 2015). O retículo endoplasmático deve controlar e regular a liberação de cálcio; quando estes mecanismos falham, as bombas SERCA auxiliam no processo de adaptação celular mediante estresse. Entretanto, frente a desafios como estresse oxidativo, presença de ácidos graxos saturados e citocinas inflamatórias, a atividade da SERCA é reduzida, conduzindo ao estresse do RS. Se as condições ideais não forem restauradas, a longo prazo pode ocorrer morte celular, desencadeando a resistência à insulina e a diabetes (GUERRERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Neste sentido, a superexpressão das ATPases/SERCA nos grupos DHLX CND e DHL X CDD pode indicar uma condição de adaptação do retículo endoplasmático nos animais diabéticos alimentados com dieta hiperlipídica em relação aos animais controle.

Além disso, três subunidades da proteína troponina foram identificadas neste estudo: troponina I, troponina C e troponina T; que compõem o complexo troponina, o qual se liga à tropomiosina e interagem com a actina. O Ca^{2+} ao ligar-se nos receptores localizados em sítios na troponina C permite que a tropomiosina se liberte de sua posição no complexo e permita a interação actina-miosina, conforme mostra a figura 5 (SWEENEY; HAMMERS, 2018).

Figura 5 - Mecanismo de contração muscular



Fonte: Elaborado pela autora. Criado com BioRender.com.

É possível observar a regulação negativa de várias destas proteínas em CDD X CND, indicando também um estresse do retículo endoplasmático e da regulação de cálcio. Esta comparação visa observar os efeitos da estreptozotocina, a qual já foi atribuída à interrupção da homeostase do cálcio pelo estresse no RE e leva à apoptose das células pancreáticas (AHN; AN; JEUNG, 2015).

4.2.2 Metabolismo de carboidratos e metabolismo energético

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença crônica caracterizada por distúrbios metabólicos da glicose. O músculo esquelético é responsável por cerca de 80% da eliminação de glicose estimulada pela insulina, mostrando sua importância nesta patologia. A tabela 6 mostra as proteínas que foram identificadas neste estudo referentes ao metabolismo de carboidratos nos três grupos e seu estado de expressão.

Tabela 6 - apresentação das proteínas identificadas envolvidas no metabolismo de carboidratos para os três grupos comparativos. Verde: proteínas super-reguladas; vermelho: proteínas sub-reguladas.

| Metabolismo de carboidratos | | | | | |
|--|-----------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| GENE | ID | NOME | DHL X CND | DHL X CDD | CDD X CND |
| ALDOA | P05064 | Aldolase A de frutose-bifosfato | Red | Verde | Red |
| ALDOC | P05063 | Aldolase C de frutose-bifosfato | Red | Red | Red |
| ENO2 | P17183 | Gama-enolase | Verde | Verde | Verde |
| ENO3 | P21550 | Beta-enolase | Red | Verde | Red |
| GAPDH | P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | Verde | Verde | Red |
| GAPDH S | Q64467 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase_ específico para testículos | Verde | Verde | Red |
| PFKM | P47857 | 6-fosfofrutoquinase_ dependente de ATP (muscular) | Verde | Verde | Red |
| PGAM2 | O70250 | Fosfoglicerato mutase 2 | Red | Verde | Red |
| PGK1 | P09411 | Fosfoglicerato quinase 1 | Verde | Verde | Red |
| PGK2 | P09041 | Fosfoglicerato quinase 2 | Verde | Verde | Verde |
| PKLR | P53657 | Piruvato quinase PKLR | Verde | Red | Red |
| PKM | P52480 | Piruvato quinase PKM | Verde | Verde | Red |
| TPI1 | P17751 | Triosefosfato isomerase | Verde | Verde | Red |
| Processos metabólicos do lactato | | | | | |
| ACTN3 | O88990 | Alfa-actnina 3 | Red | Verde | Red |
| LDHA | P06151 | Cadeia A da L-lactato desidrogenase | Verde | Verde | Red |
| LDHC | P00342 | Cadeia C da L-lactato desidrogenase | Red | Verde | Red |
| Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) | | | | | |
| MDH2 | P08249 | Malato desidrogenase_ mitocondrial | Verde | Verde | Red |
| MDH1 | P14152 | Malato desidrogenase_ citoplasmática | Red | Verde | Red |
| ACO2 | Q99KI0 | Aconitato hidratase_ mitocondrial | Verde | Verde | Red |
| GOT1 | P05201 | Aspartato aminotransferase_ citoplasmática | Red | Verde | Red |

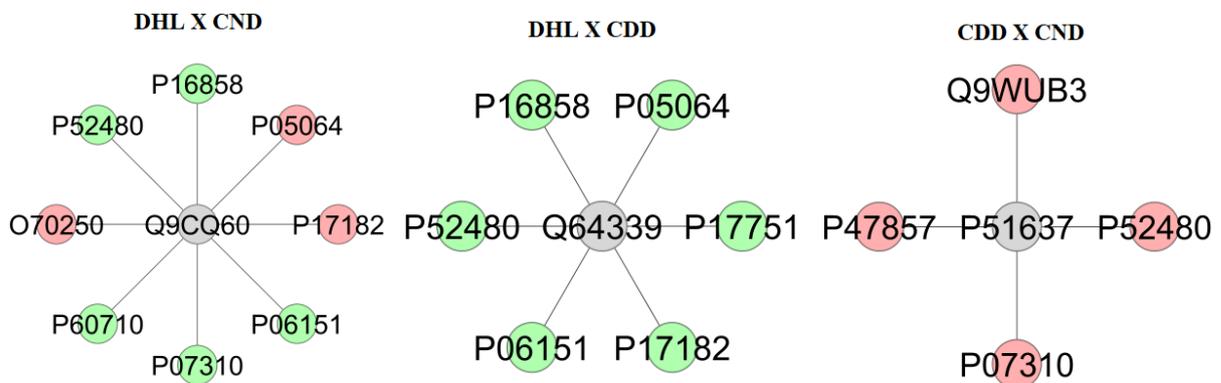
Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

É possível observar que o perfil geral mostra a super-regulação da maioria das proteínas das comparações DHL X CND e DLH X CDD, enquanto na comparação CDD X CND a maioria das proteínas foram sub-reguladas, conforme observado nas categorias anteriores. Existe uma relação bem estabelecida entre os processos de contração muscular e regulação de carboidratos, já que o músculo esquelético é um dos órgãos responsáveis pela

eliminação da glicose, além de demandar grandes quantidades de energia (PERIASAMY; HERRERA; REIS, 2017).

Duas proteínas merecem destaque especial: fosfofrutoquinase e piruvato quinase (subunidades), que são as principais reguladoras da glicólise juntamente com a proteína hexoquinase, a qual não foi identificada. Estas proteínas se mostraram presente nas três comparações e sofreram alteração na expressão, sendo que foram positivamente reguladas nas duas primeiras comparações e negativamente reguladas em CDD X CND, apontando para uma possível disfunção na glicólise neste grupo. Isso pode significar um aumento na utilização da glicose nas duas primeiras comparações como um possível efeito rebote em resposta ao excesso de glicose e uma redução na sua utilização na terceira comparação, em acordo com a literatura.

Figura 3 - subnetworks representando interação entre proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos.



Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos do software cytoscape 3.9.0

Na subnetwork referente à comparação DHL X CND (Figura 6) pode-se observar uma proteína central 6-fosfogluconolactonase (Q9CQ60) interagindo 8 proteínas (P60710; P07310; P06151; P16858; P52480; P05064; P17182 e O70250). Já para DHL X CDD a proteína central Ubiquitina proteína ISG15 (Q64339) interagiu com 6 proteínas (P06151; P16858; P52480; P05064; P17751 e P17182), cuja razão entre os grupos constam respectivamente nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Proteínas identificadas em DHL X CND presentes nas subnetwork (Figura 6) referentes ao metabolismo de carboidratos e razão entre os grupos. As cores indicam regulação positiva (verde) ou negativa (vermelho).

| ID | NOME | RAZÃO DHL: CND |
|---------------|---------------------------------------|----------------|
| P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | 1,08 |
| P52480 | piruvato quinase | 1,13 |
| P60710 | Actina | 1,60 |
| P07310 | Creatina quinase muscular | 2,10 |
| P06151 | L-lactato desidrogenase cadeia A | 1,54 |
| P17182 | Alfa-enolase | 0,86 |
| P05064 | frutose-bifosfato aldolase | 0,91 |
| O70250 | fosfoglicerato mutase 2 | 0,84 |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise dos dados.

Tabela 8 - Proteínas identificadas em DHL X CDD presentes nas subnetwork (Figura 6) referentes ao metabolismo de carboidratos e razão entre os grupos. As cores indicam regulação positiva (verde) ou negativa (vermelho).

| ID | NOME | RAZÃO DHL: CDD |
|---------------|---------------------------------------|----------------|
| P16858 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | 1,15 |
| P05064 | frutose-bifosfato aldolase A | 1,17 |
| P52480 | piruvato quinase | 1,34 |
| P06151 | L-lactato desidrogenase cadeia A | 2,75 |
| P17182 | Alfa-enolase | 1,16 |
| P17751 | Triosefosfato isomerase | 1,26 |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise dos dados.

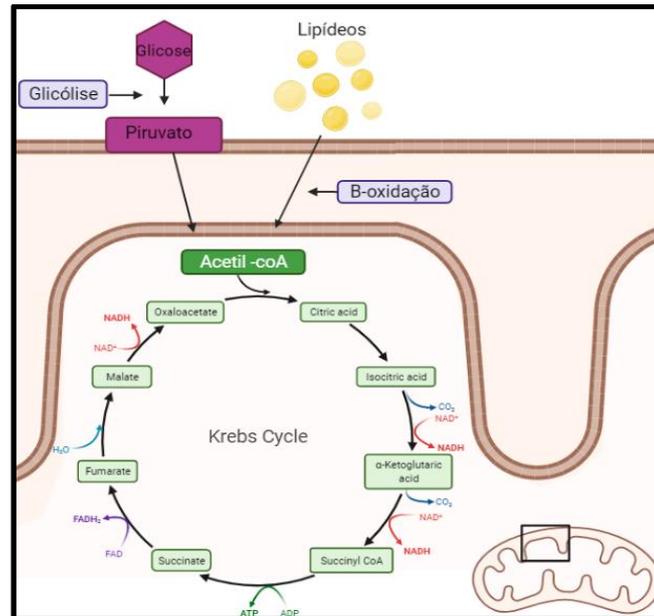
A comparação CDD X CND tem como proteína central a Caveolina-3 (P51637) que interagiu com as proteínas negativamente reguladas, Glicogênio fosforilase (Q9WUB3), 6-fosfofrutoquinase dependente de ATP (P47857), Creatina quinase muscular (P07310) e piruvato quinase (P52480). Todas as proteínas que constam nas subnetworks estão envolvidas com a contração muscular e metabolismo de carboidratos (glicólise).

Observam-se algumas proteínas envolvidas na glicogenólise como a glicogênio fosforilase (Q9WUB3), responsável pela quebra de glicogênio para liberar energia para a contração muscular, desta forma, esta enzima atua como um marcador da utilização do glicogênio e em processos relacionados como sinalização da insulina e glucagon, resistência à insulina (MIGOCKA-PATRZALEK; ELIAS, 2021). Esta proteína observada na subnetwork CDD X CND foi identificada neste estudo (apêndice B) em DHL X CDD (razão 1,08), e em CDD X CND (razão 0,79) estando ausente em DHL X CND. A regulação negativa desta proteína em CDD X CND indica a inibição da quebra do glicogênio no músculo que ocorre provavelmente devido a alterações no metabolismo da glicose e na sua utilização neste grupo. Como a estreptozotocina causa a destruição das células β das ilhotas de Langerhans, ocorre

uma queda nos níveis de insulina, e conseqüentemente um aumento da glicogênio fosforilase (GOTHANDAM *et al.*, 2019).

Algumas proteínas associadas ao metabolismo do lactato sofreram alteração. O lactato é um dos produtos gerados no metabolismo da glicose, assim como o piruvato - produto final da glicólise - sendo destinado às mitocôndrias como um combustível para sustentar o fluxo de carbono do ciclo do ácido cítrico (metabolismo de carboidratos e energético, Figura 7) (LIANG *et al.*, 2016). Além disso, um estudo demonstrou que a lactato desidrogenase estimulou a produção de ROS nas mitocôndrias, comparando-se com a produção de H₂O₂ pelo piruvato (YOUNG; OLDFORD; MAILLOUX, 2020). Existem evidências de que a atividade da lactato desidrogenase aumenta em decorrência do comprometimento da secreção de insulina, como é o caso da diabetes. Assim, o aumento da atividade da LDH interfere no metabolismo normal da glicose e na secreção de insulina (GOTHANDAM *et al.*, 2019). Portanto, a regulação positiva destes genes (DHL X CND e DHL X CDD) sugere um aumento do metabolismo da glicose e na produção de lactato e piruvato para o metabolismo oxidativo e geração de energia, embora também possa sugerir por outro lado um aumento consequente na produção de ROS. Além disso, o lactato frequentemente é produzido no músculo em resposta à estresse ou dano por exercício físico intenso ou em músculo em estado de hipóxia como uma via alternativa de produção de glicose através da gliconeogênese, (MOTTA, 2011). O aumento da gliconeogênese poderia explicar as alterações observadas no metabolismo da glicose, que foi aumentado nos dois primeiros grupos coincidindo com o aumento da produção de lactato.

Figura 4 - esquema representando associação entre diferentes vias metabólicas (metabolismo de carboidratos e metabolismo energético).



Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Hesselink *et al.*, (2016). Criado com BioRender.com.

Outra via observada se refere ao ciclo do ácido tricarboxílico (CAT). A Malato desidrogenase mitocondrial (MDH2) realiza a oxidação do malato em oxaloacetato na mitocôndria utilizando NAD, que é reduzido a NADH. O MDH2 também desempenha um papel fundamental no transporte malato-aspartato que opera na coordenação metabólica entre o citosol e as mitocôndrias, da qual participa também o aspartato; a aspartato transferase catalisa a transferência reversível de um grupo amino do aspartato a -cetoglutarato formando glutamato e oxalacetato, o qual é reduzido a malato na presença de malato desidrogenase. Essas reações fazem parte do CAT em que ocorre tanto catabolismo quanto anabolismo de síntese de ácidos graxos, aminoácidos e gliconeogênese. O CAT se relaciona com a glicólise/β-oxidação e a cadeia de transporte de elétrons (CTE). Em suma, a produção de ATP mitocondrial é acoplada ao CTE enquanto a atividade do ciclo do TCA é dependente da disponibilidade de oxigênio e ADP (GASTER; NEHLIN; MINET, 2012), o que pode explicar o status regulatório destas enzimas (regulação positiva em DHL X CND e DHL X CDD e negativa em CDD X CND) (tabela 6). Além disso, o malato e a aspartato estão envolvidas no transporte de NADH para dentro da mitocôndria no sistema de lançadeira para fosforilação oxidativa (MOTTA, 2011) e portanto, um aumento destas proteínas pode indicar um aumento na produção energética.

A tabela 9 apresenta as principais proteínas identificadas neste estudo envolvidas no metabolismo energético, nos processos de fosforilação oxidativa e transporte de elétrons para a cadeia transportadora.

Tabela 9 - Proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons.

| Cadeia transportadora de elétrons | | | | | |
|-----------------------------------|--------|--|--------------|--------------|--------------|
| GENE | ID | NOME | DHL X CND | DHL X CDD | CDD X CND |
| Atp5f1a | Q03265 | Subunidade de ATP sintase alfa_ mitocondrial | | | |
| Atp5f1b | P56480 | Subunidade de ATP sintase beta_ mitocondrial | | | |
| Atp5po | Q9DB20 | Subunidade ATP sintase O_ mitocondrial | | DHL | CND |
| Atp5f1b | P51881 | ADP/ATP translocase 2 | DHL | | CDD |
| Slc25a4 | P48962 | ADP/ATP translocase 1 | | | |
| Ak1 | Q9R0Y5 | Adenilato quinase isoenzima 1 | | | |
| Nme1 | P15532 | Nucleosídeo difosfato quinase A | | | |
| Nme2 | Q01768 | Nucleosídeo difosfato quinase B | | | |
| Uqcrcl | Q9CZ13 | Subunidade 1 do complexo citocromo b-c1 _ mitocondrial | | | |
| Ckm | P07310 | Creatina quinase tipo M | | | |
| | P62897 | Citocromo c _ somático | DHL | DHL | |
| Cycs | Q9CR68 | Subunidade do complexo citocromo b- c1 Rieske_ mitocondrial | CND | | CND |
| | P00405 | Subunidade 2 do citocromo c oxidase | DHL | DHL | |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

A tabela 9 mostra a regulação positiva de diversas proteínas produtoras de ATP nas comparações DHL X CND e DHL X CDD, o que está de acordo com as alterações observadas nas demais categorias, como metabolismo de carboidratos e contração muscular; já na comparação CDD X CND estas proteínas estão sub-reguladas, com exceção de duas isoformas de nucleosídeo difosfato quinases; estas proteínas, embora também sejam produtoras de moléculas energéticas, produzem outros trifosfatos de nucleosídeos que não sejam ATP.

As mitocôndrias são os principais reguladores do metabolismo energético celular, sendo que sua função principal é a síntese de ATP. Alterações da funcionalidade mitocondrial têm sido associadas à patogênese de alguns distúrbios metabólicos, incluindo obesidade e diabetes *mellitus* tipo II (DM2) (BUSIELLO; SAVARESE; LOMBARDI, 2015).

No músculo esquelético, o desacoplamento mitocondrial diminuído juntamente com a oxidação de ácidos graxos mitocondriais prejudicada levam ao acúmulo de ácidos graxos e/ou seus metabólitos que, associados ao aumento do estresse oxidativo, são cruciais no desenvolvimento e progressão das patologias metabólicas (PATTI; CORVERA, 2010).

Já está bem estabelecido que a diabetes acarreta em alterações no funcionamento das mitocôndrias, e na produção energética; isso é fundamental sobretudo para o músculo esquelético, que é um dos principais órgãos (juntamente com o fígado) responsáveis pela utilização da glicose estimulada por insulina (FREEMAN; PENNING, 2021) e um dos órgãos com maior demanda energética. O metabolismo energético do músculo esquelético é um dos principais determinantes da capacidade aeróbica, e sua regulação metabólica depende da função mitocondrial, que desempenha um papel fundamental na homeostase energética, incluindo o metabolismo de nutrientes e produção de ATP e está envolvido na resistência à insulina (PUTTI *et al.*, 2016).

Esta categoria apresentou grande relevância nas três comparações como processo biossintético de trifosfato de nucleosídeos e fosforilação de difosfato de nucleosídeos, isso porque a função primordial das mitocôndrias musculares é a geração oxidativa de ATP para suprir a demanda energética que sustenta a atividade contrátil adequada das fibras musculares. Para isso, frente a condições que exigem adaptação ou perante deficiência de substrato essas organelas podem recorrer ao metabolismo oxidativo de ácidos graxos e glicose. No entanto, embora a glicose também possa ser usada para gerar ATP, o catabolismo de ácidos graxos requer função mitocondrial adequada; portanto, se as mitocôndrias funcionais são poucas, os ácidos graxos podem competir com a glicose pela degradação oxidativa (HESSELINK; SCHRAUWEN-HINDERLING; SCHRAUWEN *et al.*, 2016), o que é interessante de ser considerado mediante dieta hiperlipídica (grupo DHL).

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) ou cadeia respiratória é a via final do metabolismo energético responsável por transportar os elétrons das moléculas reduzidas geradas durante a oxidação dos nutrientes, encaminhando-os para a etapa final de fosforilação oxidativa e produção energética (MOTTA, 2011). O presente estudo identificou algumas destas proteínas como subunidades de citocromos que são responsáveis por transportar os elétrons ao longo da cadeia transportadora até oceptor final O_2 . Esta cadeia está associada à fosforilação oxidativa, à quem transfere os elétrons para que ocorra a fosforilação de ADP pelo complexo ATPsintase, formando ATP (MOTTA, 2011; ZHAO *et al.*, 2019).

As ATP sintases são enzimas presentes na membrana mitocondrial responsáveis pela produção de ATP a partir de ADP na cadeia respiratória (UNIPROT, 2021); logo alterações

na regulação destas enzimas indicam um aumento na síntese de ATP (DHL X CND e DHL X CDD) ou redução (CDD X CND), apontando para possíveis distúrbios energéticos nestes grupos; além disso, a produção aumentada de ATP nos grupos com dieta hiperlipídica pode ocorrer devido à maior disponibilidade de ácidos graxos para a B-oxidação nestes grupos.

4.2.3 Análise de estresse oxidativo

Conforme abordado, as disfunções mitocondriais levam a alterações no metabolismo energético, e conseqüentemente a geração de espécies reativas de oxigênio que têm a capacidade de causar danos oxidativos e interferir nos processos metabólicos normais. Estas espécies são muito associadas a patologias em decorrência do estresse oxidativo. A tabela 10 mostra as proteínas envolvidas neste processo identificadas no presente estudo.

Tabela 10 - Proteínas referentes aos processos metabólicos do peróxido de hidrogênio.

| Processos metabólicos do peróxido de hidrogênio | | | | | |
|---|--------|--|--------------|--------------|--------------|
| Gene | ID | NOME | DHL X CND | DHL X CDD | CDD X CND |
| Hbb-b2 | P02089 | Subunidade beta-2 da hemoglobina | ■ | ■ | ■ |
| Hbb-y | P02104 | Subunidade de hemoglobina épsilon-Y2 | | | |
| hbb-b1 | P02088 | Subunidade beta-1 da hemoglobina | | | |
| hba | P01942 | Subunidade alfa da hemoglobina | ■ | ■ | ■ |
| Park7 | Q99LX0 | Homólogo da proteína 7 da doença de Parkinson | CND | CDD | ■ |
| Prdx1 | P35700 | Peroxirredoxina-1 | | CDD | CDD |
| Sod1 | P08228 | Superoxido dismutase [Cu-Zn] | DHL | DHL | |
| Cycs | P62897 | Citocromo c_somático | DHL | DHL | |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um subproduto tóxico formado como resultado de processos metabólicos normais, como desintoxicação do organismo pela conversão de superóxido por superóxidos dismutases. O H₂O₂ apresenta maior estabilidade do que o ânion

superóxido, uma espécie reativa de oxigênio (ROS) altamente tóxica; entretanto, possui atividade oxidante e é facilmente difundido pelas membranas plasmáticas (GUO *et al.*, 2014:).

O peróxido de hidrogênio, no entanto, também participa de processos importantes como regulação de processos biológicos, cicatrização, defesa imunológica contra microorganismos e proliferação de células-tronco. Porém, em concentrações muito elevadas torna-se altamente tóxico, estando associado a patologias como câncer, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e diabetes (GUO *et al.*, 2014).

É possível observar na tabela apresentada várias subunidades de hemoglobina que foram positivamente reguladas nesta comparação, associadas ao metabolismo de peróxido de hidrogênio; isso porque existem evidências de que além de sua função de transportar oxigênio esta proteína atua também como um importante antioxidante eliminando ROS, desta forma, esta proteína pode indicar estresse oxidativo (LIM *et al.*, 2019). É interessante observar que na comparação CDD X CND não consta nenhuma destas subunidades, isso pode ter ocorrido em decorrência à menor exposição a estressores neste grupo (ausência de dieta hiperlipídica); ainda, coincide com a diminuição do metabolismo energético encontrada neste grupo. Já em DHL X CDD a categoria processos metabólicos do peróxido de hidrogênio obteve 6,9% de genes associados, que apresentou as maiores alterações de metabolismo energético, o que pode estar associado à presença de dois grupos diabéticos.

Algumas proteínas merecem destaque, como a superóxido dismutase que se mostrou presente exclusivamente no grupo DHL. A superóxido dismutase catalisa a dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual apresenta menor citotoxicidade, mas é posteriormente neutralizado em água por meio de reações enzimáticas por catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPX) (YAN; SPAULDING, 2020). Isso pode ocorrer devido ao fato de que, embora o metabolismo normal das mitocôndrias gere espécies reativas de oxigênio, essa produção é aumentada quando esta organela apresenta disfunções (DOHERTY; OAKS; PERL, 2014). O fato de se apresentar unicamente no grupo DHL - que foi alimentado com dieta hiperlipídica - concorda com as evidências de que os lipídios intramusculares resultantes do acúmulo ectópico de lipídios no músculo induzem disfunções mitocondriais que interferem na realização adequada da B-oxidação, estimulando a produção de ROS, além de resistência à insulina (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2017).

Tabela 11 - Proteínas referentes ao sistema antioxidante.

| Sistema Antioxidante | | | | | |
|----------------------|----|------|-------|-------|-------|
| GENE | ID | NOME | DHL X | DHL X | CDD X |

| | | | CND | CDD | CND |
|-------|--------|--|-----|-----|-----|
| Ca3 | P16015 | Anidrase carbônica 3 | | | |
| Calm1 | P0DP26 | Calmodulina-1 | | | |
| Calm3 | P0DP28 | Calmodulina-3 | | | |
| Vdac1 | Q60932 | Proteína de canal seletivo de ânion dependente de voltagem 1 | | | |
| Hspa8 | P63017 | Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa | | DHL | CND |
| Gstp2 | P46425 | Glutathiona S-transferase P 2 | | DHL | CND |
| Gstp1 | P19157 | Glutathiona S-transferase P 1 | | DHL | CND |
| Hspa2 | P17156 | Proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico | DHL | | CND |
| Sod1 | P08228 | Superóxido dismutase [Cu-Zn] | DHL | DHL | |
| Prdx1 | P35700 | Peroxirredoxina-1 | | CDD | CDD |

Fonte: elaborado pela autora segundo dados obtidos da análise proteômica.

A tabela 11 apresenta as proteínas referentes ao sistema oxidante identificadas neste estudo. Estas proteínas são de extrema importância, pois a função antioxidante é responsável pela proteção contra o estresse oxidativo gerado pela produção de ROS. A diferença entre os grupos na expressão de antioxidantes é clara, com uma predominância maior na comparação DHL X CND que difere drasticamente da CDD X CND, onde é observada apenas expressão de proteínas exclusivas. Todas as proteínas que constam nesta tabela são de extrema importância, e por isso serão discutidas a seguir.

A anidrase carbônica (AC) é uma enzima antioxidante chave comumente encontrada no músculo esquelético que realiza a hidratação do CO₂, sendo essencial para a regulação do pH intracelular; por esse motivo pode ser considerada um bom marcador de dano muscular (DOWLING; *et al.*, 2021), além de estar envolvido na fadiga muscular (SHAIKH *et al.*, 2020). Esta enzima foi positivamente regulada nas comparações DHL X CND e DHL X CDD, mas ausente em CDD X CND, o que fornece um indicativo de que estes grupos estão sob maior estresse oxidativo por ação de ROS, o que estimulou a superexpressão deste antioxidante. Esta observação é coerente, uma vez que nos dois primeiros grupos os animais receberam dieta hiperlipídica, enquanto no último os animais receberam dieta normocalórica.

A calmodulina também apareceu nesta tabela; além da sua função na homeostase do cálcio fundamental para a contração muscular essa proteína também pode atuar como antioxidante por meio do acoplamento excitação-transcrição que medeia a sinalização em

caso de danos musculares ou morte celular por meio de alterações na regulação do cálcio podendo estimular vias miogênicas e de reparo e resposta inflamatória (HU *et al.*, 2019). Assim, seu aumento notável de expressão nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica está de acordo com as hipóteses de adaptação: DHL X CDD (P0DP28 , razão 4,95) e DHL X CND (P0DP28 razão 5,10 e P0DP26 razão 5,47).

A VDAC1 é uma proteína localizada na mitocôndria que está envolvida em processos apoptóticos, regulação do cálcio e resposta ao estresse oxidativo, além de interagir com uma grande diversidade de proteínas. Além disso, sua superexpressão na DM2 é associada à morte celular (SHOSHAN-BARMATZ; MALDONADO; KRELIN, 2017). Essa proteína se apresentou apenas em DHL X CND, onde foi negativamente regulada, sugerindo um papel protetor no grupo DHL quando comparado ao grupo controle não diabético.

Foram identificadas também duas subunidades de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*); que são de extrema importância, já que são expressas em resposta a estímulos potencialmente estressores. A HSP70 é comumente expressa no músculo esquelético em resposta a lesões, portanto pode atuar como um marcador de integridade muscular, uma vez que quando negativamente regulada indica possível atrofia muscular (SENF, 2013), sendo também envolvidas na regulação da glicose em resposta à insulina.

Muitas destas proteínas se apresentaram exclusivamente no grupo DHL; isso coincide com observações feitas anteriormente para este grupo, que demonstrou um perfil marcado por importantes marcadores de estresse oxidativo como a superóxido dismutase, proteínas de choque e glutatona transferase.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou três categorias que sofreram maiores alterações: contração muscular, metabolismo energético e metabolismo de carboidratos. Estes três processos estão intimamente relacionados, uma vez que compartilham algumas vias. Ainda, é bem estabelecido que a diabetes está associada a disfunções motoras como distrofia muscular, neste aspecto as comparações DHL X CND e DHL X CDD indicaram dados controversos. Isso se deve ao fato de que nestas duas comparações o grupo diabético alimentado com dieta hiperlipídica estava presente, e provavelmente o excesso de estressores neste grupo pode ter ativado mecanismos compensatórios ou de adaptação. O grupo CDD X CND demonstrou regulação negativa destas mesmas vias. Contudo as outras alterações encontradas no metabolismo energético e de carboidratos estão condizentes com a literatura para a DM2, ratificando assim o modelo experimental com a utilização em conjunto da dieta hiperlipídica e STZ. Em adição uma proteína sugerida nas três comparações indica um potencial marcador de distrofia (F-box proteína 32), que interagiu com diversas proteínas contráteis do músculo.

Estas observações possuem um potencial científico para indicar possíveis mecanismos envolvidos na patologia da diabetes sob diferentes condições e como afetam o perfil proteômico dos portadores, abrindo portas para que futuros estudos possam investigar estes mecanismos por meio de estudos complementares que visem explorar estas observações.

REFERÊNCIAS

- ABE, Tomoki *et al.* Food deprivation during active phase induces skeletal muscle atrophy via IGF-1 reduction in mice. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 677, p. 108160, 2019.
- AHN, Changhwan; AN, Beum-Soo; JEUNG, Eui-Bae. Streptozotocin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis via disruption of calcium homeostasis in mouse pancreas. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 412, p. 302-308, 2015.
- ALMEIDA-PITITTO, de B *et al.* Type 2 diabetes in Brazil: epidemiology and management. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 8, 17–28, 2015.
- ARAGNO, Manuela, Raffaella Mastrocola, Maria Graziella Catalano, Enrico Brignardello, Oliviero Danni, Giuseppe Boccuzzi; Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **Diabetes** 1 April 2004; 53 (4): 1082–1088.
- ARRUDA, Ana Paula; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. **Cell metabolism**, v. 22, n. 3, p. 381-397, 2015.
- BINDEA, Gabriela *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation subnetworks. **Bioinformatics**, v. 25, n. 8, p. 1091-1093, 2009.
- BINDEA, Gabriela; GALON, Jérôme; MLECNİK, Bernhard. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 5, p. 661-663, 2013.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUSIELLO, R. A., Savarese, S., & Lombardi, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. **Frontiers in Physiology**, 6, 2015.
- CHATTERJEE, Sudesna, Kamlesh Khunti, Melanie J Davies, Type 2 diabetes, **The Lancet**, Volume 389, Issue 10085, Pages 2239-2251, ISSN 0140-6736, 2017.
- CIARALDI, T. P., Ryan, A. J., Mudaliar, S. R., & Henry, R. R. Altered Myokine Secretion Is an Intrinsic Property of Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. **PloS one**, 11(7), e0158209, 2016.
- CORCORAN, Michael P , Stefania Lamon-Fava, Roger A Fielding, Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise, **The American Journal of Clinical Nutrition**, Volume 85, Issue 3, Pages 662–677, 2007.
- CORREIA-SANTOS AM, Suzuki A *et al.* Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratos wistar. **Medicina** (Ribeirão Preto), 2012.

- COSTA, AF *et al.* Carga do diabetes *mellitus* tipo 2 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 33 (2)., 2017.
- COUTINHO, Walmir F., Wellington Santana Silva Júnior, Diabetes Care in Brazil, **Annals of Global Health**, Volume 81, Issue 6, Pages 735-741, ISSN 2214-9996, 2015.
- DE WILDE, J., Mohren, R., van den Berg, S., Boekschoten, M., Dijk, K. W.-V., de Groot, P., ... Smit, E. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. **Physiological Genomics**, 32(3), 360–369, 2008.
- DEFRONZO RA, Ferrannini E *et al.* Type 2 diabetes *mellitus*. **Nat Rev Dis Primers**. 23;1:15019, 2015.
- DIONIZIO, Aline Salgado *et al.* Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: insights from proteomics and enteric innervation analysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- DOHERTY, Edward; OAKS, Zachary; PERL, Andras. Increased mitochondrial electron transport chain activity at complex I is regulated by N-acetylcysteine in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 1, p. 56-65, 2014.
- DOWLING, Paul *et al.* Proteomic profiling of carbonic anhydrase CA3 in skeletal muscle. **Expert Review of Proteomics**, n. just-accepted, 2021.
- FERNANDES, N. S. M. **Alterações metabólicas no diabético**. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2013.
- FLOR, Luísa Sorio *et al.* Diabetes burden in Brazil: fraction attributable to overweight, obesity, and excess weight. **Revista de Saúde Pública** [online], v. 49, n. 00, 2015.
- FOSSEY, S. L., Greg Hall, D., & Leininger, J. R. Skeletal Muscle. **Boorman's Pathology of the Rat**, 281–298, 2018.
- FREEMAN, Andrew M.; PENNING, Nicholas. Insulin resistance. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, 5.47.1–5.47.20, 2015.
- GALMOZZI, Andrea *et al.* Inhibition of Class I Histone Deacetylases Unveils a Mitochondrial Signature and Enhances Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle and Adipose Tissue. **Diabetes**, 62 (3): 732–742, 2013.
- GAN, W. Z., Ramachandran, V., Lim, C. S. Y., & Koh, R. Y. Omics-based biomarkers in the diagnosis of diabetes. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 0(0), 2019.

GASTER, M., Nehlin, J. O., & Minet, A. D. Impaired TCA cycle flux in mitochondria in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects: Marker or maker of the diabetic phenotype? **Archives of Physiology and Biochemistry**, 118(3), 156–189, 2012.

GILBERT, Elizabeth R.; FU, Zhuo; LIU, Dongmin. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. **Experimental diabetes research**, v. 2011, 2011.

GINTER, E., & Simko, V. Diabetes *Mellitus* tipo 2, pandemia no século 21. **Diabetes**, 42–50, 2013.

GOTHANDAM, K. *et al.* Antioxidant potential of theaflavin ameliorates the activities of key enzymes of glucose metabolism in high fat diet and streptozotocin – induced diabetic rats. **Redox Report**, 24(1), 41–50, 2019.

GOYAL R, Jialal I. Diabetes *Mellitus* Type 2. In: StatPearls. **StatPearls Publishing, Treasure Island** (FL); 2018. PMID: 30020625.

GUERRERO-HERNANDEZ, A., & Verkhatsky, A. Calcium signalling in diabetes. **Cell Calcium**, 56(5), 297–301, 2014.

GUMUCIO, J. P., & Mendias, C. L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. **Endocrine**, 43(1), 12–21, 2012.

GUO, H. *et al.* Recent advances in hydrogen peroxide imaging for biological applications. **Cell Biosci** 4, 64, 2014.

HESSELINK, M., Schrauwen-Hinderling, V. & Schrauwen, P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes *mellitus*. **Nat Rev Endocrinol** 12, 633–645, 2016.

HU, J. *et al.* Calmodulin- dependent signalling pathways are activated and mediate the acute inflammatory response of injured skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, 2019.

IDF, international diabetes federation, **Diabetes Atlas, 2021**. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/>> Acesso em 28 set. 2021.

KALINKOVICH, A., & Livshits, G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. **Ageing Research Reviews**, 35, 200–221, 2017.

KIELKOPF, Clara L.; BAUER, William; URBATSCH, Ina L. Bradford assay for determining protein concentration. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2020, n. 4, p. pdb. prot102269, 2020.

KJØBSTED, R. *et al.* AMPK in skeletal muscle function and metabolism. **The FASEB Journal**, 32(4), 1741–1777, 2018.

KOH, J. H. *et al.* TFAM Enhances Fat Oxidation and Attenuates High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Diabetes**, 68(8), 1552–1564, 2019.

KOHLGRUBER, A., Lynch, L. Adipose Tissue Inflammation in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Curr Diab Rep** 15, 92, 2015.

KRUGER, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. **The Protein Protocols Handbook**, 17–24, 2009. doi:10.1007/978-1-59745-198-7_4.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.** 2001;50(6):537-46. PMID: 11829314.

LEITE, Aline De Lima *et al.* Proteomic Analysis of Gastrocnemius Muscle in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes and Chronically Exposed to Fluoride. **PLoS ONE**, 9(9), e106646, 2014.

LIANG, Xijun *et al.* Exercise inducible lactate dehydrogenase B regulates mitochondrial function in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 49, p. 25306-25318, 2016.

LIM, Megan *et al.* Hemoglobin: potential roles in the oocyte and early embryo, **Biology of Reproduction**, Volume 101, Issue 2, Pages 262–270, 2019.

MIGOCKA-PATRZALEK, M., & Elias, M. Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease. **Cells**, 10(4), 883, 2021.

MOTTA, Valter. Bioquímica. [Digite o Local da Editora]: **MedBook Editora**, 2011. 9786557830208. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786557830208/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

MOULDER, R. *et al.* Proteomics of Diabetes, Obesity, and Related Disorders. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, 12(1), 1600134, 2018.

OLOKOBA, Abdulfatai B.; OBATERU, Olusegun A.; OLOKOBA, Lateefat B. Type 2 diabetes *mellitus*: a review of current trends. **Oman medical journal**, v. 27, n. 4, p. 269, 2012.

O'NEILL, Brian T. *et al.* FoxO Transcription Factors Are Critical Regulators of Diabetes-Related Muscle Atrophy. **Diabetes** 1; 68 (3): 556–570, 2019.

PADRÃO, A. I. *et al.* Impaired protein quality control system underlies mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1822(8), 1189–1197, 2012.

PATTI, Mary-Elizabeth; CORVERA, Silvia. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 3, p. 364-395, 2010.

PERIASAMY, M., Herrera, J. L., & Reis, F. C. G. Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism. **Diabetes & Metabolism Journal**, 41(5), 327, 2017.

PEREIRA HABdS, *et al.* Correction: Proteomic Analysis of Liver in Rats Chronically Exposed to Fluoride. **PLOS ONE** 8(11): 10.1371/annotation/54b8fb45-bb22-469e-96b3-77e99ba62b77, 2013.

PERRY, Ben D *et al.* “Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise.” **Exercise immunology review** vol. 22 (2016): 94-109.

PRIEGO, T., Sánchez, J., Picó, C., & Palou, A. Sex-differential Expression of Metabolism-related Genes in Response to a High-fat Diet. **Obesity**, 16(4), 819–826, 2008.

PUTTI, R. *et al.* Skeletal Muscle Mitochondrial Bioenergetics and Morphology in High Fat Diet Induced Obesity and Insulin Resistance: Focus on Dietary Fat Source. **Frontiers in Physiology**, 6, 2016.

QAISAR, R., Bhaskaran, S., Ranjit, R., Sataranatarajan, K., Premkumar, P., Huseman, K., & Van Remmen, H. Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. **Redox Biology**, 2018.

SBD - Sociedade brasileira de diabetes. Dados epidemiológicos do diabetes *mellitus* no Brasil. **Departamento de Epidemiologia, Economia e Saúde Pública**, 2020.

SCHONES, D. E., Leung, A., & Natarajan, R. Chromatin Modifications Associated With Diabetes and Obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 35(7), 1557–1561, 2015.

SENF, S. M. Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. **Frontiers in Physiology**, 4, 2013.

SHAIKH, Atik B. *et al.* Reduced expression of carbonic anhydrase III in skeletal muscles could be linked to muscle fatigue: A rat muscle fatigue model. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 22, p. 116-123, 2020.

SHOSHAN-BARMATZ, V., Maldonado, E. N., & Krelin, Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. **Cell stress**, 1(1), 11–36, 2017.

SILVA, Máisa *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, p. 46-53, 2011.

SRINIVASAN, K. *et al.* Animal model in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 3, p. 451, 2007.

STADLER, Krisztian; GOLDBERG, Ira J.; SUSZTAK, Katalin. The evolving understanding of the contribution of lipid metabolism to diabetic kidney disease. **Current diabetes reports**, v. 15, n. 7, p. 40, 2015.

SWEENEY, H. L., & Hammers, D. W. Muscle Contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 10(2), a023200, 2018.

- TENG, S., Huang, P. The effect of type 2 diabetes *mellitus* and obesity on muscle progenitor cell function. **Stem Cell Res Ther** 10, 103, 2019.
- THE UNIPROT Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, **Nucleic Acids Research**, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D480–D489.
- TRAJCEVSKI KE, O'Neill HM *et al.* Enhanced lipid oxidation and maintenance of muscle insulin sensitivity despite glucose intolerance in a diet-induced obesity mouse model. **PLoS One**;8(8):e71747, 2013.
- VIJAN, S. Type 2 Diabetes. **Annals of Internal Medicine**, 152(5), ITC3–1, 2010.
- WANG, S., Yong, H., & He, X. D. Multi-omics: Opportunities for research on mechanism of type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, 12(7), 1070–1080, 2021.
- WINDELØV, Johanne A.; PEDERSEN, Jens; HOLST, Jens J. Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. **Physiological reports**, v. 4, n. 11, p. e12824, 2016.
- YAN, Zhen; SPAULDING, Hannah R. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. **Redox biology**, v. 32, p. 101508, 2020.
- YOUNG, A., Oldford, C., & Mailloux, R. J. Lactate dehydrogenase supports lactate oxidation in mitochondria isolated from different mouse tissues. **Redox Biology**, 28, 101339, 2020.
- YUZEFOVYCH LV, Musiyenko SI, Wilson GL, Rachek LI Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice. **PLoS ONE** 8(1): e54059, 2013.
- ZIMMET, Paul *et al.* Diabetes *mellitus* statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 10, p. 616-622, 2016.
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 44, 3-15, 2019.
- ZHU, J. *et al.* Circulating calcium levels and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, 122(4), 376-387, 2019.

APÊNDICE A – Tabelas originais das proteínas com diferença de expressão

As tabelas a seguir apresentam todas as proteínas referentes às respectivas comparações que mostraram diferença na expressão. “Ratio” indica a razão desta proteína entre os grupos apresentados, e “score” indica o número de identificação atribuído às proteínas de acordo com o tamanho do peptídeo obtido na espectrometria de massas. Proteínas cujo *ratio* seja maior ou igual a 1 tiveram sua expressão aumentada, e o oposto é observado para *ratio* menores que 1; desta forma, estes valores indicam a taxa de alteração na expressão destas proteínas.

Tabela 12 - Proteínas identificadas na comparação CDD X CND com diferença de expressão.

| ID | NOME | Score | CDD:CND_Ratio |
|--------|---|---------|---------------|
| Q9JKS4 | LIM domain-binding protein 3 | 578,43 | 1,32 |
| Q99LX0 | Parkinson disease protein 7 homolog | 1007,96 | 1,48 |
| Q8R429 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 | 2837,87 | 1,15 |
| Q01768 | Nucleoside diphosphate kinase B | 178,59 | 1,86 |
| P63260 | Actin_ cytoplasmic 2 | 17992,2 | 1,13 |
| P20801 | Troponin C_ skeletal muscle | 1776,75 | 1,72 |
| P17183 | Gamma-enolase | 1199,48 | 1,55 |
| P09041 | Phosphoglycerate kinase 2 | 983,12 | 1,60 |
| P15532 | Nucleoside diphosphate kinase A | 178,59 | 1,80 |
| P52480 | Pyruvate kinase PKM | 8234,2 | 0,94 |
| P17751 | Triosephosphate isomerase | 4035,95 | 0,90 |
| P00342 | L-lactate dehydrogenase C chain | 567,47 | 0,76 |
| Q8VDD5 | Myosin-9 | 218,67 | 0,65 |
| P57780 | Alpha-actinin-4 | 171,15 | 0,70 |
| P08249 | Malate dehydrogenase_ mitochondrial | 1592,5 | 0,88 |
| Q8CI94 | Glycogen phosphorylase_ brain form | 146,39 | 0,82 |
| Q61315 | Adenomatous polyposis coli protein | 96,34 | 0,43 |
| Q9WUB3 | Glycogen phosphorylase_ muscle form | 2199,3 | 0,79 |
| Q9R0Y5 | Adenylate kinase isoenzyme 1 | 5937,85 | 0,72 |
| Q9QZ47 | Troponin T_ fast skeletal muscle | 2955,5 | 0,80 |
| Q9D0F9 | Phosphoglucomutase-1 | 195,74 | 0,75 |
| Q99KI0 | Aconitate hydratase_ mitochondrial | 861,06 | 0,73 |
| Q91Z83 | Myosin-7 | 5493,25 | 0,86 |

| ID | NOME | Score | CDD:CND_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| Q91VP7 | Transmembrane protein 101 | 233,29 | 0,48 |
| Q8CI51 | PDZ and LIM domain protein 5 | 226,55 | 0,57 |
| Q8BFZ3 | Beta-actin-like protein 2 | 7569,23 | 0,90 |
| Q7TQ48 | Sarcalumenin | 198,73 | 0,79 |
| Q6RT24 | Centromere-associated protein E | 117,74 | 0,80 |
| Q64518 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 | 128,41 | 0,84 |
| Q64467 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific | 404,35 | 0,41 |
| Q60605 | Myosin light polypeptide 6 | 1740,96 | 0,46 |
| Q5XKE0 | Myosin-binding protein C_ fast-type | 1272,26 | 0,90 |
| Q5SX40 | Myosin-1 | 8348,05 | 0,70 |
| Q5SX39 | Myosin-4 | 11235,51 | 0,71 |
| Q03265 | ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial | 824,28 | 0,85 |
| Q02566 | Myosin-6 | 5447,02 | 0,71 |
| P97457 | Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle | 9762,86 | 0,52 |
| P68134 | Actin_ alpha skeletal muscle | 56005,29 | 0,90 |
| P68033 | Actin_ alpha cardiac muscle 1 | 43264,05 | 0,89 |
| P63268 | Actin_ gamma-enteric smooth muscle | 43264,05 | 0,90 |
| P62737 | Actin_ aortic smooth muscle | 43264,05 | 0,88 |
| P62631 | Elongation factor 1-alpha 2 | 282,41 | 0,79 |
| P60710 | Actin_ cytoplasmic 1 | 17992,2 | 0,90 |
| P58774 | Tropomyosin beta chain | 2550,42 | 0,79 |
| P58771 | Tropomyosin alpha-1 chain | 6398,97 | 0,77 |
| P53657 | Pyruvate kinase PKLR | 712,76 | 0,65 |
| P47857 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ muscle type | 225,57 | 0,79 |
| P31001 | Desmin | 106,89 | 0,54 |
| P21550 | Beta-enolase | 3115,39 | 0,78 |
| P21107 | Tropomyosin alpha-3 chain | 1394,06 | 0,58 |
| P17182 | Alpha-enolase | 1391,99 | 0,88 |
| P14152 | Malate dehydrogenase_ cytoplasmic | 295,54 | 0,77 |
| P13542 | Myosin-8 | 9026,93 | 0,72 |
| P13541 | Myosin-3 | 4427,99 | 0,72 |
| P13412 | Troponin I_ fast skeletal muscle | 1666,13 | 0,71 |
| P10126 | Elongation factor 1-alpha 1 | 77,49 | 0,79 |
| P07310 | Creatine kinase M-type | 13905,81 | 0,79 |

| ID | NOME | Score | CDD:CND_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| P06151 | L-lactate dehydrogenase A chain | 1700,93 | 0,81 |
| P05977 | Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform 2 | 5936,73 | 0,68 |
| P05201 | Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic | 66,41 | 0,58 |
| P05064 | Fructose-bisphosphate aldolase A | 8557,34 | 0,80 |
| P01942 | Hemoglobin subunit alpha | 4990,5 | 0,53 |
| O88990 | Alpha-actinin-3 | 961,52 | 0,81 |
| O70250 | Phosphoglycerate mutase 2 | 1494,66 | 0,87 |
| O55143 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 1318,63 | 0,81 |
| O09165 | Calsequestrin-1 | 1251,74 | 0,55 |
| A2AQP0 | Myosin-7B | 2767,19 | 0,90 |
| A2AL36 | Centriolin | 116,74 | 0,32 |

Fonte: elaborada pela autora segundo análise estatística.

Tabela 13 - Proteínas identificadas na comparação DHL X CND com diferença de expressão.

| ID | NOME | Score | DHL:CND_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| Q9QZ47 | Troponin T_ fast skeletal muscle | 2955,5 | 1,79 |
| Q9JKS4 | LIM domain-binding protein 3 | 578,43 | 1,27 |
| Q99KI0 | Aconitate hydratase_ mitochondrial | 861,06 | 1,31 |
| Q91Z83 | Myosin-7 | 5493,25 | 1,42 |
| Q8R429 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 | 2837,87 | 1,23 |
| Q8BI22 | Centrosomal protein of 128 kDa | 186,25 | 2,56 |
| Q8BFZ3 | Beta-actin-like protein 2 | 7569,23 | 1,62 |
| Q64518 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 | 128,41 | 1,86 |
| Q64467 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis | 404,35 | 1,42 |
| Q5XKE0 | Myosin-binding protein C_ fast-type | 1272,26 | 1,17 |
| Q5SX40 | Myosin-1 | 8348,05 | 1,72 |
| Q5SX39 | Myosin-4 | 11235,51 | 1,67 |
| Q03265 | ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial | 824,28 | 1,58 |
| Q02566 | Myosin-6 | 5447,02 | 1,52 |
| P97457 | Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle | 9762,86 | 1,26 |
| P68134 | Actin_ alpha skeletal muscle | 56005,29 | 1,55 |
| P68033 | Actin_ alpha cardiac muscle 1 | 43264,05 | 1,57 |
| P63268 | Actin_ gamma-enteric smooth muscle | 43264,05 | 1,55 |
| P62737 | Actin_ aortic smooth muscle | 43264,05 | 1,55 |
| P60710 | Actin_ cytoplasmic 1 | 17992,2 | 1,60 |

| ID | NOME | Score | DHL:CND_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| P58774 | Tropomyosin beta chain | 2550,42 | 1,22 |
| P58771 | Tropomyosin alpha-1 chain | 6398,97 | 1,35 |
| P56480 | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial | 931,21 | 1,52 |
| P53657 | Pyruvate kinase PKLR | 712,76 | 2,39 |
| P31001 | Desmin | 106,89 | 1,82 |
| P21107 | Tropomyosin alpha-3 chain | 1394,06 | 2,23 |
| P20801 | Troponin C_ skeletal muscle | 1776,75 | 1,70 |
| P16858 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 10545,41 | 1,08 |
| P16015 | Carbonic anhydrase 3 | 679,26 | 1,82 |
| P13542 | Myosin-8 | 9026,93 | 1,62 |
| P13541 | Myosin-3 | 4427,99 | 2,97 |
| P13412 | Troponin I_ fast skeletal muscle | 1666,13 | 1,54 |
| P0DP28 | Calmodulin-3 | 249,16 | 5,10 |
| P0DP27 | Calmodulin-2 | 249,16 | 5,31 |
| P0DP26 | Calmodulin-1 | 249,16 | 5,47 |
| P09542 | Myosin light chain 3 | 468,61 | 1,46 |
| P09411 | Phosphoglycerate kinase 1 | 1121,63 | 1,43 |
| P09041 | Phosphoglycerate kinase 2 | 983,12 | 1,62 |
| P07724 | Albumin | 172,97 | 2,32 |
| P07310 | Creatine kinase M-type | 13905,81 | 2,10 |
| P06151 | L-lactate dehydrogenase A chain | 1700,93 | 1,54 |
| P05977 | Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform | 5936,73 | 1,20 |
| P02089 | Hemoglobin subunit beta-2 | 2010,77 | 1,25 |
| P02088 | Hemoglobin subunit beta-1 | 2874,41 | 1,21 |
| O55143 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 1318,63 | 1,75 |
| E9Q9R9 | Disks large homolog 5 | 132,5 | 5,58 |
| A2AQP0 | Myosin-7B | 2767,19 | 2,36 |
| A2AL36 | Centriolin | 116,74 | 1,39 |
| Q01768 | Nucleoside diphosphate kinase B | 178,59 | 3,74 |
| P70402 | Myosin-binding protein H | 155,6 | 1,77 |
| P47857 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ muscle type | 225,57 | 1,20 |
| P15532 | Nucleoside diphosphate kinase A | 178,59 | 3,71 |
| P02104 | Hemoglobin subunit epsilon-Y2 | 2010,77 | 1,22 |
| Q9JK37 | Myozenin-1 | 700,26 | 1,19 |
| Q9D0F9 | Phosphoglucomutase-1 | 195,74 | 1,14 |

| ID | NOME | Score | DHL:CND_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| Q8CJF7 | Protein ELYS | 97,24 | 1,48 |
| P52480 | Pyruvate kinase PKM | 8234,2 | 1,13 |
| P08249 | Malate dehydrogenase_ mitochondrial | 1592,5 | 1,28 |
| Q9CZU6 | Citrate synthase_ mitochondrial | 160,41 | 1,42 |
| Q6PHN1 | Coiled-coil domain-containing protein 57 | 98,41 | 1,42 |
| P63017 | Heat shock cognate 71 kDa protein | 73,36 | 1,23 |
| P58854 | Gamma-tubulin complex component 3 | 256,08 | 0,33 |
| P46425 | Glutathione S-transferase P 2 | 194,07 | 0,63 |
| P05063 | Fructose-bisphosphate aldolase C | 431,63 | 0,84 |
| Q6URW6 | Myosin-14 | 201,99 | 0,77 |
| P19157 | Glutathione S-transferase P 1 | 194,07 | 0,53 |
| G3UZ78 | Androglobin | 160,66 | 0,66 |
| Q7TPR4 | Alpha-actinin-1 | 171,15 | 0,64 |
| P00342 | L-lactate dehydrogenase C chain | 567,47 | 0,79 |
| Q9WUB3 | Glycogen phosphorylase_ muscle form | 2199,3 | 0,89 |
| Q60932 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | 109,72 | 0,48 |
| P17182 | Alpha-enolase | 1391,99 | 0,86 |
| O08638 | Myosin-11 | 201,62 | 0,30 |
| Q9DB20 | ATP synthase subunit O_ mitochondrial | 669,64 | 0,14 |
| Q91VW5 | Golgin subfamily A member 4 | 241,04 | 0,16 |
| Q61879 | Myosin-10 | 221,14 | 0,24 |
| Q60952 | Centrosome-associated protein CEP250 | 115,02 | 0,15 |
| P21550 | Beta-enolase | 3115,39 | 0,88 |
| P05064 | Fructose-bisphosphate aldolase A | 8557,34 | 0,91 |
| O88990 | Alpha-actinin-3 | 961,52 | 0,84 |
| O70250 | Phosphoglycerate mutase 2 | 1494,66 | 0,84 |

Fonte: elaborado pela autora segundo análise estatística.

Tabela 14 - Proteínas identificadas na comparação DHL X CDD com diferença de expressão.

| ID | NOME | Score | DHL:CDD_Ratio |
|-----------|-------------------------------------|--------------|----------------------|
| Q9WUB3 | Glycogen phosphorylase_ muscle form | 3105,71 | 1,08 |
| Q9R0Y5 | Adenylate kinase isoenzyme 1 | 928,34 | 1,95 |
| Q9QZ47 | Troponin T_ fast skeletal muscle | 634,36 | 2,39 |
| Q9JKS4 | LIM domain-binding protein 3 | 595,9 | 1,28 |
| Q9JK37 | Myozenin-1 | 473,59 | 1,28 |

| ID | NOME | Score | DHL:CDD_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| Q9JI91 | Alpha-actinin-2 | 509,69 | 1,25 |
| Q9DBJ1 | Phosphoglycerate mutase 1 | 139,46 | 1,88 |
| Q9D0F9 | Phosphoglucomutase-1 | 281,49 | 1,38 |
| Q9CZU6 | Citrate synthase_ mitochondrial | 202,9 | 1,99 |
| Q99KI0 | Aconitate hydratase_ mitochondrial | 334,13 | 1,38 |
| Q91Z83 | Myosin-7 | 4587,49 | 2,12 |
| Q8K0L0 | Ankyrin repeat and SOCS box protein 2 | 107,02 | 1,92 |
| Q8BFZ3 | Beta-actin-like protein 2 | 18567,97 | 1,38 |
| Q7TQ48 | Sarcalumenin | 186,85 | 1,42 |
| Q6P8J7 | Creatine kinase S-type_ mitochondrial | 37,97 | 3,35 |
| Q64518 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 | 169,01 | 2,23 |
| Q64467 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis | 193,13 | 3,22 |
| Q62234 | Myomesin-1 | 348,03 | 1,82 |
| Q60605 | Myosin light polypeptide 6 | 3578,19 | 2,61 |
| Q5XKE0 | Myosin-binding protein C_ fast-type | 1436,38 | 1,63 |
| Q5SX40 | Myosin-1 | 13797,46 | 2,20 |
| Q5SX39 | Myosin-4 | 18704,88 | 2,18 |
| Q3V132 | ADP/ATP translocase 4 | 267,83 | 2,01 |
| Q03265 | ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial | 480,66 | 1,63 |
| Q02566 | Myosin-6 | 4468,68 | 1,82 |
| P97457 | Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle | 6728,81 | 1,35 |
| P68033 | Actin_ alpha cardiac muscle 1 | 92317,78 | 1,15 |
| P63268 | Actin_ gamma-enteric smooth muscle | 90945,33 | 1,16 |
| P63260 | Actin_ cytoplasmic 2 | 68627,73 | 1,28 |
| P62806 | Histone H4 | 120,21 | 3,06 |
| P62737 | Actin_ aortic smooth muscle | 91276,4 | 1,16 |
| P62631 | Elongation factor 1-alpha 2 | 161,1 | 1,48 |
| P60710 | Actin_ cytoplasmic 1 | 68627,73 | 1,07 |
| P58774 | Tropomyosin beta chain | 6904,69 | 2,12 |
| P58771 | Tropomyosin alpha-1 chain | 7435,92 | 2,05 |
| P56480 | ATP synthase subunit beta_ mitochondrial | 2405,68 | 1,45 |
| P52480 | Pyruvate kinase PKM | 8693,66 | 1,34 |
| P51881 | ADP/ATP translocase 2 | 340,07 | 2,44 |
| P48962 | ADP/ATP translocase 1 | 420,87 | 1,97 |
| P47857 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase_ muscle type | 131,03 | 1,42 |

| ID | NOME | Score | DHL:CDD_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| P30275 | Creatine kinase U-type_ mitochondrial | 276,68 | 3,35 |
| P21550 | Beta-enolase | 7553,81 | 1,16 |
| P21107 | Tropomyosin alpha-3 chain | 216,78 | 3,29 |
| P17751 | Triosephosphate isomerase | 6445,99 | 1,26 |
| P17183 | Gamma-enolase | 669,78 | 1,73 |
| P16858 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 16330,98 | 1,15 |
| P16015 | Carbonic anhydrase 3 | 171,85 | 2,77 |
| P14152 | Malate dehydrogenase_ cytoplasmic | 229,57 | 1,36 |
| P13542 | Myosin-8 | 10114,73 | 2,12 |
| P13541 | Myosin-3 | 3096,79 | 2,36 |
| P0DP28 | Calmodulin-3 | 297,58 | 4,95 |
| P09542 | Myosin light chain 3 | 3784,81 | 2,03 |
| P09411 | Phosphoglycerate kinase 1 | 3724,52 | 1,40 |
| P09041 | Phosphoglycerate kinase 2 4 | 2802,03 | 1,43 |
| P08249 | Malate dehydrogenase_ mitochondrial | 775,12 | 1,30 |
| P07724 | Albumin | 55,93 | 3,19 |
| P07310 | Creatine kinase M-type | 8428,7 | 1,97 |
| P06151 | L-lactate dehydrogenase A chain | 1412,45 | 2,75 |
| P05977 | Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform | 28346,98 | 1,84 |
| P05064 | Fructose-bisphosphate aldolase A | 13611,37 | 1,17 |
| P02104 | Hemoglobin subunit epsilon-Y2 | 1896,08 | 1,36 |
| P02089 | Hemoglobin subunit beta-2 | 1896,08 | 1,34 |
| P02088 | Hemoglobin subunit beta-1 | 2303,85 | 1,36 |
| P01942 | Hemoglobin subunit alpha | 2173,73 | 1,79 |
| P00342 | L-lactate dehydrogenase C chain | 326,01 | 2,16 |
| O88990 | Alpha-actinin-3 | 1514,39 | 1,11 |
| O70250 | Phosphoglycerate mutase 2 | 2248,77 | 1,72 |
| O55143 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 1056,54 | 2,69 |
| O09165 | Calsequestrin-1 | 1011,2 | 2,59 |
| E9Q1T9 | Exportin-2 | 185,22 | 2,08 |
| D3Z6I8 | Tropomyosin alpha-3 chain | 168,7 | 3,25 |
| B8JJB1 | PDZ and LIM domain protein 7 (Fragment) | 402,15 | 2,44 |
| A2AQP0 | Myosin-7B | 1568,52 | 2,51 |
| A2AIM4 | Tropomyosin beta chain | 6904,69 | 1,22 |
| Q9ERK4 | Exportin-2 | 186,24 | 2,20 |

| ID | NOME | Score | DHL:CDD_Ratio |
|-----------|---|--------------|----------------------|
| Q9CZ13 | Cytochrome b-c1 complex subunit 1_mitochondrial | 86,92 | 2,12 |
| Q6PHC1 | Alpha-enolase | 4639,03 | 1,19 |
| P57724 | Poly(rC)-binding protein 4 | 264,08 | 11,82 |
| Q01768 | Nucleoside diphosphate kinase B | 195,97 | 1,99 |
| P15532 | Nucleoside diphosphate kinase A | 111,75 | 2,03 |
| P05201 | Aspartate aminotransferase_cytoplasmic | 316,34 | 1,31 |
| P68134 | Actin_alpha skeletal muscle | 94650,54 | 1,04 |
| A2AL36 | Centriolin | 247,8 | 5,21 |
| P17182 | Alpha-enolase | 4973,46 | 1,16 |
| Q3TJD7 | PDZ and LIM domain protein 7 | 887,43 | 0,79 |
| Z4YKE7 | Troponin T_fast skeletal muscle | 634,36 | 0,79 |
| Z4YJU0 | Troponin T_fast skeletal muscle | 634,36 | 0,79 |
| Q922J3 | CAP-Gly domain-containing linker protein 1 | 99,54 | 0,37 |
| Q91W40 | Kinesin light chain 3 | 179,43 | 0,01 |
| Q8VDD5 | Myosin-9 | 235,02 | 0,24 |
| Q8BSH3 | Tropomyosin alpha-1 chain | 6452,13 | 0,88 |
| Q61879 | Myosin-10 | 241,17 | 0,43 |
| Q5SV64 | Myosin-10 | 231,86 | 0,38 |
| Q3UH59 | Myosin-10 | 231,86 | 0,42 |
| P0DP27 | Calmodulin-2 | 297,58 | 0,27 |
| P0DP26 | Calmodulin-1 | 297,58 | 0,21 |
| P05063 | Fructose-bisphosphate aldolase C | 527,33 | 0,75 |
| O08638 | Myosin-11 | 227,72 | 0,42 |

Fonte: elaborado pela autora segundo análise estatística.