

JOÃO PEDRO TÔRRES GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS LEUCOTRIENOS E DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA EM ÓRGÃOS METABOLICAMENTE ATIVOS DE
CAMUNDONGOS COM DIABETES DO TIPO 1 E OBESIDADE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

JOÃO PEDRO TÔRRES GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS LEUCOTRIENOS E DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA EM ÓRGÃOS METABOLICAMENTE ATIVOS DE
CAMUNDONGOS COM DIABETES DO TIPO 1 E OBESIDADE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

Co-orientadora: Profa. Dra. Sonia Jancar

Versão Corrigida

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tôrres Guimarães, João Pedro
Avaliação do efeito dos leucotrienos e do sistema
renina-angiotensina em órgãos metabolicamente ativos
de camundongos com diabetes do tipo 1 e obesidade.
/ João Pedro Tôrres Guimarães; orientador Joilson de
Oliveira Martins; coorientadora Sonia Jancar. --
São Paulo, 2021.
194 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes do tipo 1. 2. Obesidade. 3.
Leucotrienos. 4. Sistema renina-angiotensina. 5.
Insulina. I. de Oliveira Martins, Joilson,
orientador. II. Jancar, Sonia, coorientador. III.
Titulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: João Pedro Tôrres Guimarães

Título da Tese: Avaliação do efeito dos leucotrienos e do sistema renina-angiotensina em órgãos metabolicamente ativos de camundongos com diabetes do tipo 1 e obesidade.

Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 07/07/2021, considerou o candidato:

Aprovado **Reprovado**

Examinador(a): Nome: Rosália Santos Amorim Jesuino

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Examinador(a): Nome: Ana Cristina Breithaupt Faloppa

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Examinador(a): Nome: José Alexandre Marzagão Barbuto

Instituição: Universidade de São Paulo

Presidente: Nome: Joilson de Oliveira Martins

Instituição: Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **08** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel do LTB4 no estado inflamatório sistêmico induzido pela diabetes*" do qual participam o(s) aluno(s) **Luciano Filgueiras Ribeiro Junior, Edson Kiyotaka Ishizuka, Marianna Mainardi Koga, Mateus Fila Pecenin** e o Especialista em Laboratório **Marlise Bonetti Agostinho Montes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **31.03.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 01 de abril de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Aramando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP / Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB II - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.131.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **08/2014/CEUA**, válido até 31/03/2018, e por solicitação da Profa. Dra. **Sonia Jancar**, do Departamento de Imunologia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **João Pedro Torrès Guimarães** ao Projeto de Pesquisa "*O papel do LTB₄ no estado inflamatório sistêmico induzido pela diabetes*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 01 de agosto de 2017.


Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 5091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.007.2018

São Paulo, 02 de abril de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "**O papel do *LTB4* no estado inflamatório sistêmico induzido pela diabetes**", registrado sob o protocolo nº **8/2014** e aprovado em 31/03/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 31/03/2022**, sem a inclusão de novos animais no projeto citado acima.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Sonia Jancar**
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas da USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.008.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **08/2014/CEUA**, aprovado em 31/03/2014 e renovado até 31/03/2022, relativo ao projeto intitulado "***O papel do LTB4 no estado inflamatório sistêmico induzido pela diabetes***", de responsabilidade da Profa. Dra. **Sonia Jancar**, do Departamento de Imunologia, aprovo a seguinte metodologia, conforme detalhamento da solicitação:

- Tratamento com captopril diluído em água filtrada e autoclavada na concentração de 30 mg/L.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, e no Laboratório de Imunoendocrinologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2017/11540-7, 2018/50004-6, 2018/23266-0, 2020/03175-0), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 301617/2016-3; 310993/2020-2) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Uma parte deste trabalho foi desenvolvida no Nutrigenomics, Inflammation and Obesity Research (NIOR) Lab, no Nutritional Sciences Department, da Texas Tech University, Lubbock, TX, Estados Unidos, com apoio financeiro da FAPESP (BEPE 2019/09983-3).

AGRADECIMENTOS

O tão aguardado momento chegou. E junto a ele, diversas memórias vão se misturando e trazendo todo o significado e sentido de ter chegado até aqui. E como um imunologista recém-formado, não poderia escrever meus agradecimentos de modo distinto, senão, utilizando da imunologia pra explicar e agradecer por cada momento, pessoal e profissional deste doutorado, afinal, este doutorado se assemelhou ao sistema imune, com diversos desafios, processos de amadurecimento, vários componentes interessantes e sem este sistema, ao qual sou muito grato, eu não seria quem sou hoje, literalmente.

Tudo começou quando este pequeno linfócito T resolveu sair de sua medula óssea, também conhecida por Goiânia, e ir em direção ao timo, também conhecido por São Paulo para completar sua maturação. Quando chegou lá, se assustou um pouco, afinal, estava em um ambiente completamente novo, sendo exposto a novos estímulos, e foi neste momento, que este pequeno linfócito T, que achava já estar maduro, descobriu que havia um longo porém promissor caminho pela frente, até chegar aqui, neste momento em que vos escreve, especializado, diferenciado, ativado e pronto para encarar novos desafios.

Nas primeiras disciplinas, onde os grandes mestres apresentavam diversos peptídeos via seus MHCs, confesso que no começo ficava confuso, receoso se ao ser exposto novamente aquelas informações, se lembraria para responder de forma eficaz, mas também de modo mais elegante e especializado, afinal, sou um linfócito. E a medida que aqueles peptídeos iam sendo apresentados e reapresentados, minha resposta era cada vez mais rápida e eficaz. Naquele momento, comecei a maturar minha confiança.

Mas assim como o sistema imune enfrenta certas falhas, ou não funciona muito bem frente a novos patógenos, entrei em contato com o patógeno mais temido da pós-graduação, o famigerado Western Blotting (e as vezes mais complexo que os componentes do sistema complemento). Aquele pequeno linfócito, recém maturado, com um pouco mais de confiança, achou que daria conta de primeira, que iria tirar de letra, mas como esperado de uma resposta imune ainda não tão bem montada, a falha foi certa! Mas não se preocupe caro leitor, afinal, aqui entra um dos, senão o componente mais importante de uma resposta imunológica - e de nossas vidas - a interação com outras células, outros componentes que te ajudam a montar a melhor e mais eficaz resposta, nossos amigos e colegas.

Obviamente sou grato a todas essas células, que me ajudaram durante todo o meu processo de montar uma resposta imune eficaz, me ajudando a superar cada antígeno que entrou em meu caminho. Dentre estas células, destaco algumas: Marlise, ou melhor dizendo, nosso querido linfócito T helper (LTh), literalmente, que estava ao nosso lado pra ajudar com toda sua experiência nas mais diversas técnicas. Afinal, me considero um linfócito de sorte, por ter não só um LTh, mas sim dois! Meu outro linfócito Th, ou melhor dizendo Silene, com toda sua expertise, que foi essencial para me auxiliar com outras técnicas e processos burocráticos (outro antígeno horrível) também. Inclusive, aprendi que a melhor e mais eficaz quimiocina para atrair a Marlise para o microambiente inflamatório, vulgo bancada, é o bom e velho cheirinho de café!

Vale lembrar que existem diversos subtipos de LThs, com outras funções essenciais para um bom funcionamento da resposta imune, bem como de suas células, neste caso, este pequeno linfócito que vos escreve. Neste contexto, gostaria que conhecessem um pouco mais destes outros subtipos, com suas respectivas funções auxiliares cruciais para que este doutorado fosse realizado. Todos estes LThs produzem uma citocina em comum conhecida por amizade, porém existem outras citocinas características de cada subtipo que me chamam a atenção e me inspiraram muito neste processo, e irei pontuar aqui como forma de agradecimento. Vou começar com meus queridos LThs de Goiânia: Gabriel, sua principal citocina é a esperança; Lucas, sim, te transformei numa célula imune (como sei que ama estudar os linfócitos e seus diversos subtipos, creio que esta licença poética foi pertinente), sua principal citocina é o conhecimento; Caio, sua principal citocina é o coração; Rafael, sua principal citocina é a determinação; Kássia, sua principal citocina é a persistência; Madalena, sua principal citocina é a força; Anália, sua principal citocina é a resiliência; Millena, sua principal citocina é a iniciativa; Letícia, sua principal citocina é o *know-how*; Ludmila, sua principal citocina é a serenidade; Zé Vitor, sua citocina é a alegria. Um fato interessante e que todos estes LThs possuem igual capacidade de produzir cada uma destas citocinas mencionadas.

Continuando agora com os LThs de São Paulo, gostaria de destacar: Rafael e Nagela, que produzem a citocina coração. Carol, que produz a citocina conhecimento; Jean que produz a citocina ciência; Marília, sua principal citocina é a perseverança; Nayara (conhecida também por outras nomenclaturas) e Ana, que produzem a citocina dedicação; Theresa, sua principal citocina é a ciência; Luiz e Manu, que produzem a citocina companheirismo; Barbara e Tia Ivete, que

produzem a citocina comunicação; Dani e Stal, duas células que tive a oportunidade de conviver por um tempo no mesmo linfonodo, vocês produzem a citocina união. Bem, como podem ver, assim como no sistema imune, possuo várias células, também conhecidas por amigos, em minha vida, que se eu pudesse nomearia uma por uma, mas daí teria que escrever outra tese só com este tema, mas sou e serei eternamente grato a cada citocina que produziram em minha vida, sem vocês, este caminho seria muito mais complicado!

Voltando um pouco na trajetória deste pequeno linfócito T, ocorreu um marco muito especial em seu processo de maturação, o momento em que ele conheceu um outro linfócito T, um linfócito intrigante, inteligente, dedicado, bondoso, talentoso, engraçado (afinal, este linfócito era literalmente diferenciado), que compartilhava vários marcadores em comum, mas que produzia a citocina mais linda e que está muito em falta no mundo atualmente, o amor. E o efeito desta citocina foi extremamente eficaz, transformando este pequeno linfócito T em um linfócito T muito mais feliz! Hoje, estes linfócitos estão noivos! Poderia aqui escrever outra tese apenas para te dizer o quanto a sua vida teve impacto na minha, tanto pessoal quanto profissionalmente, e o quanto eu sou grato a você, Flávia (que queria ser chamada de LTCD8⁺ ou M1).

Tiveram momentos incríveis que vivenciei durante o doutorado, diversas viagens, migrando para diferentes linfonodos, nacionais e internacionais, onde pude aprender mais e mais, estudar e aprender técnicas novas, descobrir novas culturas, e isso foi extremamente enriquecedor! E nada disso teria sido possível sem que meus grandes mestres, Joilson, Sonia e Naima, tivessem aberto as portas de seus laboratórios para mim! Por detrás de uma boa célula efetora existe uma grande célula APC, e neste caso tive a honra e sorte de ter 3!! Vocês são as células dendríticas, capazes de captar diversos sinais e trabalhar em várias coisas ao mesmo tempo (pois os enxergo assim, com inúmeros dendritos, um escrevendo artigo, outro projetos, outro auxílios a pesquisa, outro corrigindo teses e dissertações, outro analisando dados e ajudando em experimentos, dentre infinitos outros). Tenho enorme respeito e carinho por vocês, pois uma resposta imune eficaz e reflexo de uma excelente atuação inicial das células APCs. Foi um honra trabalhar com vocês!!

Gostaria de agradecer as agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, por fornecerem todos os ATPs necessários para utilizarmos em nossos experimentos e tornar possível a execução deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer toda minha família, especialmente minha célula progenitora, Tânia, por estar ao meu lado sempre, me impulsionando sempre, acreditando em mim e no meu potencial de sair do conforto da medula e enfrentar todos os desafios do lado de fora, que foram enfrentados com garra, determinação, dedicação, resiliência e esperança, frutos de uma resposta imunológica sensacional, composta por tantos componentes incríveis! Meu muito obrigado a todos vocês!

“Dedication is a talent all on its own.”

– Alphonse Elric

RESUMO

Guimarães, João Pedro Tôrres. **Avaliação do efeito dos leucotrienos e do sistema renina-angiotensina em órgãos metabolicamente ativos de camundongos com diabetes do tipo 1 e obesidade**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O diabetes e a obesidade são doenças metabólicas crônicas que estão associadas a vários distúrbios fisiológicos. Alguns estudos mostraram vias comuns interligando estas doenças à resistência à insulina e ao sistema renina-angiotensina (SRA), um dos principais reguladores da pressão arterial. O angiotensinogênio (Agt) é o principal precursor do SRA, sua ativação exerce efeitos pró-inflamatórios, frequentemente ligados a disfunções nos processos celulares, como a autofagia. Acredita-se que a autofagia desregulada esteja ligada à diabetogênese através do desenvolvimento de inflamação e resistência insulínica. Já os leucotrienos (LTs), especificamente o leucotrieno B4 (LTB4), possuem papel central no estabelecimento da resistência à insulina. Assim, pretendemos investigar: (1) o envolvimento dos LTs na via de sinalização da insulina e no processo inflamatório em músculos de camundongos com diabetes do tipo 1 (DT1); (2) o envolvimento do SRA e dos LTs no músculo e no fígado de camundongos com DT1, nas vias da autofagia e da insulina; e, por fim, (3) no envolvimento do SRA no músculo e no fígado de camundongos com DT1 e obesidade, nas vias da autofagia e da insulina. O DT1 foi quimicamente induzido com estreptozotocina (STZ), enquanto a obesidade com dieta hiperlipídica. Para inibir o SRA, tratamos os camundongos com captopril. Observamos, nos músculos de camundongos DT1 nocautes para LTs ($5LO^{-/-}$), que houve aumento na expressão de *Arg1* e *Ym1*, além de aumento da fosforilação de AKT e da expressão de *Insr*. Também observamos que, no músculo de camundongos DT1, o tratamento com captopril aumentou a expressão de *Agt* e *At1* (marcadores do SRA), *Insr*, *Irs1* e *Ampk* (marcadores da via de sinalização da insulina), *Beclin1*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg12*, *Atg14* e *LC3* (marcadores da via da autofagia), em padrão semelhante nas duas linhagens. No fígado de camundongos DT1 Wt e $5LO^{-/-}$, o tratamento com captopril aumentou a expressão de *Agt*, *At1*, *Insr*, *Irs1* e *Ampk*. Foi observado, também, tanto no fígado quanto no músculo desses camundongos, semelhanças na expressão de marcadores da autofagia independentes dos LTs. Já, em camundongos obesos, o captopril não aumentou a expressão de *At1*. Entretanto, no fígado de camundongos obesos, encontramos diminuição da expressão gênica de *Insr*, *Irs1* e *Ampk*, independentemente de tratamento com

captopril ou superexpressão de Agt. Analisando o conjunto de resultados, concluímos que os LTs possuem papel fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina no músculo de camundongos com DT1. Além disso, o tratamento com captopril recuperou a expressão gênica dos principais marcadores da via de sinalização da insulina, bem como os de marcadores referentes ao funcionamento da via da autofagia nesses tecidos, tanto no DT1, quanto na obesidade, indicando um possível papel do bloqueio da enzima ECA na sensibilidade à insulina e na ativação da autofagia nestas doenças.

Palavras-chave: diabetes do tipo 1, obesidade, leucotrienos, sistema renina-angiotensina, insulina, autofagia.

ABSTRACT

Guimarães, João Pedro Tôres. **Evaluation of the effect of leukotrienes and the renin angiotensin system in metabolically active tissues from mice with type 1 diabetes and obesity.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Diabetes and obesity are chronic metabolic diseases that are associated with several physiological disorders. Some studies have shown common pathways linking these diseases to insulin resistance and the renin-angiotensin system (RAS), one of the main regulators of blood pressure. Angiotensinogen (Agt) is the main precursor of RAS, and its activation has pro-inflammatory effects, often linked to dysfunctions in cellular processes, such as autophagy. Deregulated autophagy is believed to be linked to diabetogenesis through the development of inflammation and insulin resistance. Leukotrienes (LTs), specifically leukotriene B4 (LTB₄), play a central role in establishing insulin resistance. Thus, we intend to investigate: (1) the involvement of LTs in the insulin signaling pathway and in the inflammatory process in muscles of mice with type 1 diabetes (T1D); (2) the involvement of RAS and LTs in the muscle and liver of mice with T1D, in the autophagy and insulin pathways; and (3) the involvement of SARS in the muscle and liver of mice with T1D and obesity, in the autophagy and insulin pathways. T1D was chemically induced with streptozotocin (STZ), while obesity with a high-fat diet. To inhibit RAS, we treated the mice with captopril. We observed, in muscles of T1D mice knockouts for LTs (5LO^{-/-}), that there was an increase in the expression of *Arg1* and *Ym1*, in addition to the increased phosphorylation of AKT and increased expression of *Insr*. We also observed that in muscle of T1D mice, treatment with captopril increased the expression of *Agt* and *At1* (RAS markers), *Insr*, *Irs1* and *Ampk* (insulin signaling pathway markers), *Beclin1*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg12*, *Atg14* and *LC3* (autophagy markers) in a similar pattern in the two mice strain. In liver of T1D Wt and 5LO^{-/-} mice, the treatment with captopril increased the expression of *Agt*, *At1*, *Insr*, *Irs1* and *Ampk*. Similarities were also observed in the liver and muscle of these mice, with similarities in the expression of autophagy markers independent of LTs. In obese mice, captopril did not increase *At1* expression. However, in liver of obese mice, we found decreased gene expression of *Insr*, *Irs1* and *Ampk*, regardless of treatment with captopril or overexpression of Agt. Analyzing the set of results, we conclude that LTs have a fundamental role in the development of insulin resistance in the muscle of mice with T1D. In

addition, treatment with captopril recovered the gene expression of the main markers of the insulin signaling pathway, as well as those related to the functioning of the autophagy pathway in these tissues, both in T1D and in obesity, indicating a possible role of ACE blockade in insulin sensitivity and activation of autophagy in these diseases.

Keywords: type 1 diabetes, obesity, leukotrienes, renin-angiotensin system, insulin, autophagy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas qPCRs.....	48
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do metabolismo do ácido araquidônico via 5LO-/- adaptado.....	33
Figura 2. Esquema representativo do sistema renina-angiotensina - adaptado	36
Figura 3. Funcionamento da via de sinalização da insulina.....	38
Figura 4. Esquema representativo da autofagia – adaptado	40
Figura 5. Variação de peso e glicemia de camundongos Wt e 5LO-/-.....	52
Figura 6. Teste de tolerância a insulina e dosagem de insulina de camundongos Wt e 5LO-/-	53
Figura 7. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos Wt e 5LO -/-	55
Figura 8. Expressão de marcadores da inflamação no músculo quadríceps de camundongos Wt e 5LO-/-	57
Figura 9. Expressão de marcadores da inflamação no músculo gastrocnêmio de camundongos Wt e 5LO-/-	57
Figura 10. Variação de peso e glicemia de camundongos Wt e 5LO-/- tratados com captopril	59
Figura 11. Teste de tolerância a insulina e dosagem de insulina de camundongos Wt e 5LO-/- tratados com captopril	61
Figura 12. Concentração plasmática de adipocinas em camundongos Wt e 5LO-/- DT1 tratados ou não com captopril	63
Figura 13. Expressão de marcadores do SRA no músculo de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril	64
Figura 14. Expressão de marcadores do SRA no fígado de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril	65
Figura 15. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril.....	67
Figura 16. Expressão protéica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril.....	68
Figura 17. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril.....	70
Figura 18. Expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos Wt e 5LO -/- tratados ou não com captopril	71
Figura 19. Expressão de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril.....	73

Figura 20. Expressão protéica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril	74
Figura 21. Expressão de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril.....	76
Figura 22. Expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos Wt e 5LO-/- tratados ou não com captopril	77
Figura 23. Avaliação do peso e glicemia de camundongos da linhagem C57bl/6	80
Figura 24. Concentração plasmática de adipocinas e insulina em camundongos da linhagem C57bl/6 tratados ou não com captopril.....	82
Figura 25. Expressão gênica de marcadores relacionados ao SRA no músculo de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	83
Figura 26. Expressão gênica de marcadores relacionados ao SRA no fígado de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	84
Figura 27. Expressão gênica de marcadores relacionados à via de sinalização da insulina no músculo de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	86
Figura 28. Expressão protéica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos diabéticos e obesos.....	87
Figura 29. Expressão gênica de marcadores relacionados à via de sinalização da insulina no fígado de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	89
Figura 30. Expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	90
Figura 31. Expressão de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	92
Figura 32. Expressão protéica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	93
Figura 33. Expressão de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril	95
Figura 34. Expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-LO - 5-lipoxigenase

AA - Ácido araquidônico

AGT - Angiotensinogênio

AGT-TG - Camundongos C57bl/6 transgênicos que superexpressam Agt

AKT - Proteína quinase B

AMPK - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

ANGI - Angiotensina I

ANGII - Angiotensina II

ARG1 - Gene de arginase

AT1 - Receptor da agiotensina II tipo 1 (*Type 1 angiotensin II receptor*)

AT2 - Receptor da agiotensina II tipo 2 (*Type 2 angiotensin II receptor*)

ATG5 - Gene relacionado à autofagia 5 (*Autophagy Related 5*)

ATG7 - Gene relacionado à autofagia 7 (*Autophagy Related 7*)

ATG12 - Gene relacionado à autofagia 12 (*Autophagy Related 12*)

ATG14 - Gene relacionado à autofagia 14 (*Autophagy Related 14*)

ATP - Trifosfato de adenosina (*Adenosine triphosphate*)

BECLIN1- Gene relacionado à autofagia 6 (*Autophagy Related 6 Homolog*)

BLT1 (LTB4R) - Receptor de leucotrieno B4 (*Leukotriene B4 receptor*)

cDNA - DNA complementar (*Complementary DNA*)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cysLTs - Cisteinil leucotrienos (*Cysteinil leukotrienes*)

DT1 - Diabetes tipo 1

DT2 - Diabetes tipo 2

ECA - Enzima Conversora de angiotensina

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

FLAP - Proteína ativadora da 5-lipoxigenase (*5-lipoxygenase-activating protein*)

GLUT - Transportador de glicose (*Glucose transporter*)

HFD - Dieta hiperlipídica (*High fat diet*)

HPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IDF - Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*)

IFN γ - Interferon gama

INSR - Gene do receptor de insulina (*Insulin receptor gene*)

IL - Interleucina

IRS - Gene do substrato do receptor de insulina (*Insulin receptor substrate*)

KO - Nocaute (*knockout*)

LC3 - Proteína 1 associada a microtúbulos de cadeia leve 3 α (*Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha*)

LTs - Leucotrienos

LTB4 - Leucotrieno B4

MCP1 - Proteína 1 quimioatraente de monócitos (*Monocyte chemoattractant protein 1*)

MTOR - Alvo mecânico da rapamicina (*Mammalian target of rapamycin*)

NEFA - Ácidos graxos não esteroides (*Non-esterified fatty acids*)

NOS - Óxido nítrico sintase 2 (*Nitric oxide synthase 2*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCRq ou RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (*Polimerase chain reaction quantitative*)

PDK1 - Proteína quinase-1 dependente da proteína 3-fosfoinositida (*Protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*)

PGC-1 α - Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3- Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*)

PKC - Proteína quinase C (*Protein kinase C*)

PLA2 - Fosfolipase A2 (*Phospholipase A2*)

PVDF - Difluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene difluoride*)

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

RNA - Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (*Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*)

SEM - Erro padrão da média (*Standard error of the mean*)

SRA - Sistema renina-angiotensina

STAT1 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*)

STZ - Estreptozotocina (*Streptozotocin*)

TBP - Proteína de ligação TATA (*TATA binding protein*)

TG - Triglicerídeos

TLR - Receptor do tipo Toll (*Toll-like receptors*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrose factor alpha*)

TTU - Texas Tech University

WT - Selvagem (*Wild type*)

USP - Universidade de São Paulo

YM1 (Chi3l3) - Proteína 3 semelhante à quitinase 3 (*Chitinase 3 like 3*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Aspectos gerais do diabetes do tipo 1 e obesidade.....	29
1.2 Orgãos metabolicamente ativos no diabetes do tipo 1 e obesidade	30
1.3 Os leucotrienos e o diabetes do tipo 1	31
1.4 O sistema renina-angiotensina no diabetes do tipo 1 e na obesidade.....	35
1.5 A via de sinalização da insulina no diabetes do tipo 1 e na obesidade	37
1.6 A via da autofagia no diabetes do tipo 1 e na obesidade.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Animais	45
3.2 Indução de DT1	45
3.3 Indução de obesidade	45
3.4 Tratamento com Captopril	46
3.5 Grupos experimentais.....	46
3.6 Expressão gênica	46
3.7 Quantificação de proteínas e Western blotting	49
3.8 Teste de tolerância à insulina (ITT)	49
3.9 Dosagem de triglicerídeos	50
3.10 Dosagem de ácidos graxos não esteróides (NEFA)	50
3.11 Ensaio multiplex	50
3.12 Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS	51
PARTE I - O PAPEL DOS LEUCOTRIENOS NO DT1, COM ÊNFASE NA INFLAMAÇÃO E SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA.....	51
4.1 Padronização do modelo da DT1.	52
4.2 Avaliação da insulina em camundongos Wt e 5LO ^{-/-}	53
4.3 Avaliação da expressão gênica da via de sinalização da insulina em camundongos Wt e 5LO ^{-/-}	54
4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores da inflamação no músculo de camundongos Wt e 5LO ^{-/-}	56
4. RESULTADOS	58

PARTE II - O PAPEL DOS LEUCOTRIENOS E DO SRA NO DT1, COM ÊNFASE NA AUTOFAGIA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA.....	58
4.5 Avaliação do peso e da glicemia em camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.....	59
4.6 Avaliação da insulina em camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	60
4.7 Dosagem das principais adipocinas no plasma de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	61
4.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no músculo de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	63
4.9 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no fígado de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.....	64
4.11 Avaliação da expressão protéica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	68
4.12 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.....	69
4.13 Avaliação da expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.....	71
4.14 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	72
4.15 Avaliação da expressão protéica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	74
4.16 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	75
4.17 Avaliação da expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos Wt e 5LO ^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril.	77
4. RESULTADOS	79
PARTE III - O PAPEL DOS DO SRA NO DT1 E NA OBESIDADE, COM ÊNFASE NA AUTOFAGIA E SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA.....	79
4.18 Avaliação do peso e da glicemia em camundongos da linhagem C57bl/6 DT1 tratados ou não com captopril.....	80
4.19 Dosagem das principais adipocinas e insulina no plasma de camundongos da linhagem C57bl/6 tratados ou não com captopril.	81
4.20 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	82
4.21 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	83

4.22 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.	85
4.23 Avaliação da expressão protéica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	87
4.24 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.	88
4.25 Avaliação da expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	89
4.26 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	90
4.27 Avaliação da expressão protéica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	93
4.28 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	94
4.29 Avaliação da expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos e obesos tratados ou não com captopril.....	96
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONCLUSÕES.....	110
7. REFERÊNCIAS.....	112
8. APÊNDICES.....	120

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do diabetes do tipo 1 e da obesidade

Nas últimas décadas, a incidência de desordens metabólicas tem crescido drasticamente, sendo, hoje, globalmente considerada um problema de saúde pública. Em doenças como o diabetes ou a obesidade, por exemplo, o desequilíbrio do metabolismo associa-se ao estabelecimento de um processo inflamatório em órgãos como o fígado e tecido adiposo, juntamente com o acúmulo e produção de determinados componentes do metabolismo, como a glicose e os ácidos graxos, os quais, por sua vez, são fatores determinantes em suas respectivas fisiopatologias [1-3]. Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes [4], o diabetes *mellitus* (DM) atinge cerca de 463 milhões de pessoas no mundo, sendo que, destas, cerca de 7-12% representam o diabetes do tipo 1 (DT1). Já, no caso da obesidade, a Organização Mundial de Saúde estimou que mais de 1,6 bilhão de pessoas no mundo estavam com sobrepeso e, dentre estas, mais de 650 milhões apresentavam obesidade [5].

O DM é uma doença caracterizada pela hiperglicemia crônica, com alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes [6], o DM é classicamente dividido em quatro classificações: DT1, diabetes tipo 2 (DT2), diabetes gestacional e diabetes mellitus de outros tipos. No DT2, a hiperglicemia é decorrente da resistência à insulina que se estabelece no fígado, no músculo e no tecido adiposo, sendo que o principal fator de risco para essa condição é a obesidade [7, 8]. Já, no DT1, a hiperglicemia decorre da produção deficiente de insulina, em consequência da destruição das células β -pancreáticas por processos autoimunes. Esta condição pode ser corrigida pela administração de insulina, embora episódios de hipoglicemia possam ocorrer e, ao longo do tratamento, os pacientes com DT1 possam desenvolver resistência à insulina exógena – casos nos quais o controle glicêmico torna-se cada vez mais difícil, o que prejudica a qualidade de vida do paciente [9, 10]. Acredita-se que, no DT1, de forma similar ao DT2, a resistência à insulina possa ser decorrente da inflamação de baixo grau [11-13]; entretanto, os mecanismos envolvidos podem ser distintos e ainda precisam ser elucidados.

Além do DM, outra doença de importância na saúde pública é a obesidade. A obesidade é

caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo, com índice de massa corporal (IMC) acima de 30kg/m^2 , dislipidemia, resistência à insulina, inflamação crônica, principalmente no tecido adiposo, dentre outras características [14]. Geralmente, esta doença se desenvolve devido à dieta desbalanceada, associada ao sedentarismo. Em decorrência da inflamação no tecido adiposo, juntamente com o desequilíbrio na produção de mediadores lipídicos e hormônios, a obesidade é considerada fator de risco significativo para o desenvolvimento de outras doenças metabólicas crônicas [15-18]. Neste contexto, sabe-se que tanto no DT1 quanto na obesidade, pacientes possuem maior risco de desenvolver cardiopatias, devido a fatores que são comuns entre as duas doenças, como a hiperglicemia, a resistência à insulina, o aumento de lipídios no sangue e a produção de citocinas pró-inflamatórias; logo, compreender a relação entre essas doenças torna-se fundamental para se reduzir esses riscos [19, 20].

1.2 Órgãos metabolicamente ativos no diabetes do tipo 1 e na obesidade

Em condições fisiológicas, os órgãos metabolicamente ativos, tais como músculo, fígado e tecido adiposo, possuem determinada demanda energética, além de desempenharem importantes funções quanto ao funcionamento do metabolismo do corpo, como, por exemplo, a produção de hormônios, mediadores lipídicos e citocinas. Todavia, no DT1 ou na obesidade, a atividade desses órgãos pode ser prejudicada, comprometendo suas funções, como a produção de hormônios, a regulação glicêmica e a manutenção de lipídeos no corpo, por exemplo, relacionando-se com a progressão e a fisiopatologia destas doenças [21-30].

O músculo é um órgão metabolicamente ativo, que necessita de alta demanda energética para seu funcionamento. Estudos indicam que, de modo geral, a captação da glicose/via de sinalização da insulina encontra-se prejudicada, tanto no DT1 quanto na obesidade, devido à hiperglicemia e ao quadro de resistência à insulina [22, 31]. Acredita-se que a produção de citocinas pró-inflamatórias e a metabolização prejudicada de lipídeos, por exemplo, contribuam para o mal funcionamento deste órgão. Já foi demonstrado que a ativação dos receptores de TNF- α e IL-1 leva ao bloqueio da via de sinalização da insulina no DT2. Da mesma maneira, mediadores lipídicos produzidos nesta condição de inflamação no

músculo, fígado e tecido adiposo, como os leucotrienos (LTs), por exemplo, contribuem para o bloqueio desta via, através da ativação do receptor do BLT-1 [13, 16, 32-35].

No caso do fígado, tanto no DT1 quanto na obesidade, o acúmulo de lipídeos, junto com a peroxidação, promove estresse de retículo endoplasmático nos hepatócitos, contribuindo para a inflamação de baixo grau neste tecido, com a produção de citocinas – como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) –, além de mediadores lipídicos inflamatórios [36]. Somado a isso, citocinas circulantes, adipocinas e ácidos graxos liberados pelo tecido adiposo inflamado também contribuem para este perfil pró-inflamatório no fígado, resultante da interação entre estes tecidos. Estas citocinas, por sua vez, ao se ligarem em seus receptores nas membranas dos hepatócitos, também contribuem para o estabelecimento da resistência à insulina [23, 24, 37-40].

O tecido adiposo produz hormônios, mediadores lipídicos, adipocinas e fatores de crescimento, como, por exemplo, a leptina, a resistina, a adiponectina, a IL-6 e os LTs, que possuem papel importante no metabolismo da glicose e na regulação da inflamação – neste e nos demais órgãos mencionados anteriormente. No tecido adiposo de indivíduos com DT1 ou obesidade, nota-se perfil semelhante ao observado no fígado e no músculo quanto ao processo inflamatório, sendo este efeito mais intenso na obesidade, com conseqüente prejuízo na função deste tecido. Sendo que o acúmulo de lipídios, juntamente com a presença de macrófagos com perfil pró-inflamatório, responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, pode estimular os receptores expressos nos adipócitos, inibindo a via de sinalização do receptor de insulina [11, 41-44].

Portanto, no DT1 e na obesidade, avaliar o perfil pró-inflamatório dos órgãos metabolicamente ativos tornou-se crucial para a melhor compreensão da fisiopatologia dessas doenças e da interação entre esses tecidos e seus metabólitos.

1.3 Os leucotrienos e o diabetes do tipo 1

Sabe-se que algumas complicações macro e microvasculares, em conseqüência do DT1, ocorrem devido à hiperglicemia, além da produção de alguns mediadores inflamatórios,

caracterizando um quadro conhecido como inflamação de baixo grau. A inflamação de baixo grau é caracterizada pela produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, pela produção do hormônio leptina, pelo aumento na concentração da proteína C reativa (PCR) e pela diminuição de alguns componentes anti-inflamatórios, como a adiponectina. Este tipo de inflamação está geralmente associado à resistência à insulina e ao maior risco de complicações no DT1 [43, 45]. Além dos componentes da inflamação de baixo grau mencionados acima, os LTs destacam-se quanto a sua participação na fisiopatologia do DT1, uma vez que trabalhos do nosso grupo observaram que esses mediadores possuem papel importante na via de sinalização da insulina, na inflamação estéril, na perda de tecido adiposo e no perfil metabólico de macrófagos [46-50].

Nos últimos anos, outros trabalhos mostraram que o mediador lipídico leucotrieno B4 (LTB4) possui papel central no estabelecimento da resistência à insulina e no desenvolvimento da DT2 em modelos animais [13, 32]. Os LTs são gerados pelo metabolismo do ácido arquidônico (AA), pela enzima 5-lipoxigenase (5LO). O AA é liberado pela clivagem dos fosfolipídeos da membrana plasmática pela fosfolipase (PL) A2 ativada. Como as células mieloides possuem grande quantidade de AA esterificado em suas membranas e expressam, de forma constitutiva, tanto a PLA2 como as demais enzimas da via metabólica da 5-LO, elas são capazes de gerar quantidades elevadas de LTs após estimuladas. Em conjunto com a ação da proteína acessória FLAP (*5-lipoxygenase-Activating Protein*), a 5-LO oxida o AA, gerando o intermediário instável LTA4 – que é rapidamente hidrolisado, gerando o LTB4. Se, ao invés de hidrolisado, o LTA4 for conjugado com a forma reduzida da glutathiona, origina-se o grupo dos cisteinil leucotrienos (cysLTs): LTC4, LTD4 e LTE4 (**Fig. 1**) [20, 51, 52].

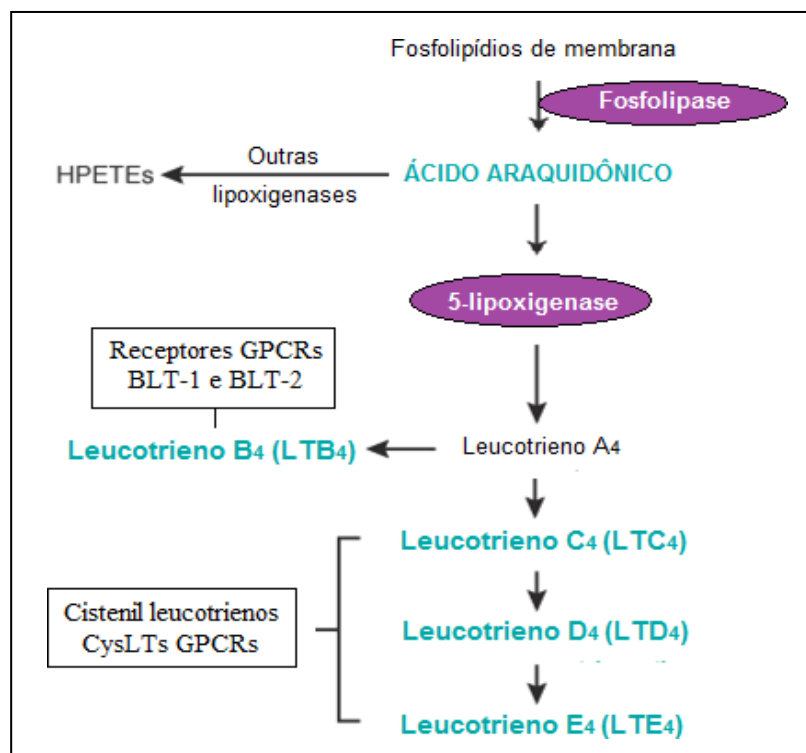


Figura 1. Esquema representativo do metabolismo do ácido araquidônico via 5LO/- adaptado [51]. A ativação da fosfolipase A2 (PLA2) cliva fosfolípidios de membrana, liberando o ácido araquidônico (AA), o qual sofre ação da 5-lipoxigenase (5-LO) para produzir 5-HPETE. Este é então metabolizado em leucotrieno A4 (LTA4), metabólito instável que dá origem ao leucotrieno B4, pela ação da LTA4 hidrolase. Pela ação da LTC4 sintase, que incorpora glutatona na molécula de LTA4, são gerados os cistenil leucotrienos LTC4, LTD4 e LTE4.

O LTB4 liga-se a receptores acoplados à proteína G. O BLT1 é o receptor de alta afinidade e está acoplado à proteína Gi, resultando assim na diminuição intracelular dos níveis intracelulares de AMP cíclico. Em macrófagos, a ativação do BLT1, além de promover a atividade quimiotática, potencializa a fagocitose, a atividade microbica e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Já o BLT2 liga-se ao LTB4 com menor afinidade do que o BLT1 e tem sido pouco estudado [53].

O papel dos LTs nos órgãos metabolicamente ativos também foi observado, sendo que, no tecido adiposo, o recrutamento de monócitos, a polarização de macrófagos para perfil pró-

inflamatório, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a resistência à insulina são influenciados pela produção de LTB₄. De maneira similar, no fígado e no músculo, o LTB₄ promove a inflamação e a resistência à insulina em camundongos DT1 ou obesos [13, 46-48, 54, 55].

Também no DT1, os camundongos apresentaram alta concentração plasmática de LTB₄ no sangue [46]. Ramalho et al. 2018 [56] identificaram que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12) e interferon γ (IFN γ) estavam presentes nos camundongos com DT1, porém, nos animais 5LO^{-/-} DT1, as concentrações dessas citocinas estavam significativamente menores. Além disso, enquanto os macrófagos peritoneais residentes de animais diabéticos 5LO^{-/-} apresentam perfil anti-inflamatório, com alta expressão de arginase 1 (*Arg1*), *chitinase-like 3* (*Chi3l3*) e atividade de arginase, os macrófagos peritoneais obtidos de animais Wt DT1 apresentam perfil pró-inflamatório, com alta expressão de óxido nítrico sintase 2 (*Nos2*), transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (*Stat1*), *Il12* e nitrito, demonstrando papel central dos LTs na polarização de macrófagos no DT1 [56, 57].

Serezani et al. 2011 [58] demonstraram que o LTB₄ aumenta a expressão do MyD88, molécula adaptadora da família de receptores *toll-like receptor* (TLR)/interleucina 1 α (IL1 α), e, desta forma, potencializa a resposta inflamatória induzida pela ativação destes receptores. Isto talvez explique porque o bloqueio de LTB₄, nos camundongos com DT1, diminuiu a concentração de citocinas pró-inflamatórias no plasma destes animais [46]. Estes estudos sugerem que, no DT1, semelhantemente ao que foi descrito no DT2, a inflamação de baixo grau é dependente do LTB₄ que reprograma os macrófagos peritoneais para perfil pró-inflamatório.

Devido ao exposto acima, é possível afirmar a importância da compreensão do papel dos LTs na fisiopatologia do DT1 e sua participação nos mecanismos envolvidos nas complicações desta doença, uma vez que os estudos mais recentes indicam que existe relação deste mediador lipídico com o DT1.

1.4 O sistema renina-angiotensina no diabetes do tipo 1 e na obesidade

Estudos indicam correlações de que, tanto no DT1 quanto na obesidade, pacientes possuem maiores chances de desenvolver doenças cardiovasculares [59, 60]. Neste contexto, um importante sistema destaca-se e está envolvido com estas doenças, sendo conhecido como sistema renina-angiotensina (SRA) – processo fisiológico responsável por ser um dos principais reguladores da pressão arterial e do equilíbrio hídrico [61].

O principal precursor do SRA é o angiotensinogênio (Agt), produzido principalmente pelo fígado, que é convertido em angiotensina I (AngI) pela ação da renina, produzida pelos rins, sendo posteriormente convertida em angiotensina II (AngII), pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo a AngII considerada o principal hormônio bioativo nesse sistema que, quando ativa seus receptores (AT1 e AT2), desencadeia suas funções fisiológicas (**Fig.2**) [61]. Todavia, existem tratamentos farmacológicos para o controle do SRA, como o captopril, medicamento que inibe a ação da ECA, evitando assim a conversão Agt-AngII [62].

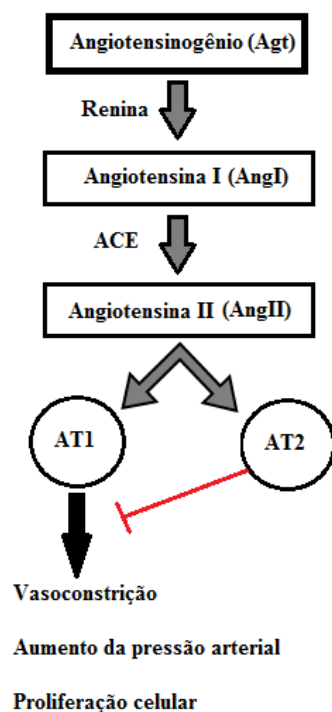


Figura 2. Esquema representativo do sistema renina-angiotensina – adaptado [61]. O angiotensinogênio (Agt) é clivado pela renina e a enzima conversora de angiotensina (ECA) forma a angiotensina II via angiotensina I. A Ang II atua via receptores Ang II tipo 1 (AT1) ou tipo 2 (AT2) para exercer suas ações fisiológicas.

Os subprodutos do SRA estão presentes sistemicamente e localmente em vários órgãos metabolicamente ativos, dentre eles, músculo, tecido adiposo e fígado. Quando o SRA é ativado, seus subprodutos, através da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), levam à produção de citocinas pró-inflamatórias, frequentemente associadas ao desenvolvimento de doenças metabólicas [63, 64].

Já foi descrito que, no tecido adiposo, o desenvolvimento de resistência à insulina e a inflamação estão ligados à superexpressão de SRA. Já, em músculos, estudos demonstraram como os subprodutos do SRA estão envolvidos com a via de sinalização da insulina; todavia, o modo como estas vias se interligam e levam ao desenvolvimento destas desordens metabólicas ainda necessita ser elucidado [61, 64]. A ativação do SRA nestes tecidos exerce efeitos pró-inflamatórios via Agt, frequentemente ligados a disfunções nas vias celulares [65, 66].

No DT1, foi observado que a atividade renal pode ser prejudicada devido à hiperglicemia, o que leva à ativação do SRA e contribui para possíveis complicações renais – situação característica no DT1 [67]. Além disto, pacientes com DT1 costumam apresentar maiores concentrações de componentes do SRA na urina, como o Agt e a ECA, sendo este outro indicativo de que este processo encontra-se ativado no DT1 [68]. Pacientes com DT1 podem desenvolver diversas complicações devido à hiperglicemia, dentre elas a retinopatia, na qual a visão desses pacientes pode ser comprometida devido ao dano nos vasos sanguíneos na retina, causado pelas altas concentrações de glicose no sangue. Foi observado que pacientes tratados com inibidores do AT1, principal receptor ao qual a AngII se liga, apresentaram melhora substancial no quadro de retinopatia, quando comparados com os pacientes do grupo placebo [69].

Já, na obesidade, há a ativação em excesso do SRA, em decorrência de vários fatores, dentre eles, a inflamação do tecido adiposo e a produção exacerbada de componentes do SRA por este tecido, o que explica a interação desta doença com o SRA e o aumento na chance de desenvolvimento de cardiopatias [64]. Assim como no DT1, o tratamento de pacientes obesos com inibidores do AT1 demonstrou ser eficaz na redução do agravo dessa doença, além de reduzir a incidência de cardiopatias nesses pacientes [70, 71]. Em modelo experimental com camundongos obesos que superexpressam angiotensinogênio no tecido adiposo, foi observado também aumento no processo inflamatório, resistência à insulina e intolerância à glicose neste tecido. Porém, uma vez tratados com captopril, esses camundongos apresentaram melhora significativa nestes quadros, corroborando o observado em pacientes com obesidade [63]. Desta forma, torna-se crucial compreender melhor os mecanismos envolvidos na relação dos componentes do SRA, tanto no DT1 quanto na obesidade, uma vez que o tratamento com inibidores deste processo fisiológico aparenta ser benéfico e promissor para os acometidos por ambas as doenças.

1.5 A via de sinalização da insulina no diabetes do tipo 1 e na obesidade

A via de sinalização da insulina é de extrema importância não só pelo seu papel na regulação da glicemia, mas também por estar envolvida com diversas outras vias metabólicas. A insulina promove sua ação a partir do momento que se liga ao seu receptor localizado na superfície da membrana celular, promovendo a fosforilação dos substratos do receptor da insulina, conhecidos como “*irs*”, enumerados de 1 a 4, sendo que o *irs1* possui a principal função de auxiliar na fosforilação da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), transportada pela membrana via fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2). Uma vez recrutada e ativada, a PI3K induz a geração da fosfatidilinositol 4,5 trifosfato (PIP3), que, por sua vez, recruta e ativa a proteína quinase-1 dependente da proteína 3-fosfoinositida (PDK1), responsável por fosforilar a proteína quinase B (AKT), que promoverá a translocação dos transportadores de glicose (GLUT) para a membrana, mais especificamente o GLUT4 nos principais órgãos metabolicamente ativos, como fígado, músculo e tecido adiposo, e GLUT1, no caso de células do sistema imune, como os macrófagos. A AKT também pode fosforilar outros componentes de outras vias celulares, como, por exemplo, as (1) proteínas

FOXO, que estimulam a regulação e a expressão de genes; as (2) caspases, associadas com o processo proteolítico apoptótico; a (3) proteína p21 envolvida no ciclo celular, estimulando a transição da fase G1 para fase S; o (4) coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α), envolvido no metabolismo celular quanto ao processo de gliconeogênese; e o (5) alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), responsável por diversos processos celulares, como o crescimento, a proliferação e a autofagia (processo ao qual iremos abordar com mais detalhes neste trabalho). Portanto, a via de sinalização da insulina é crucial para o bom funcionamento de células/tecidos [72-75] (Fig. 3).

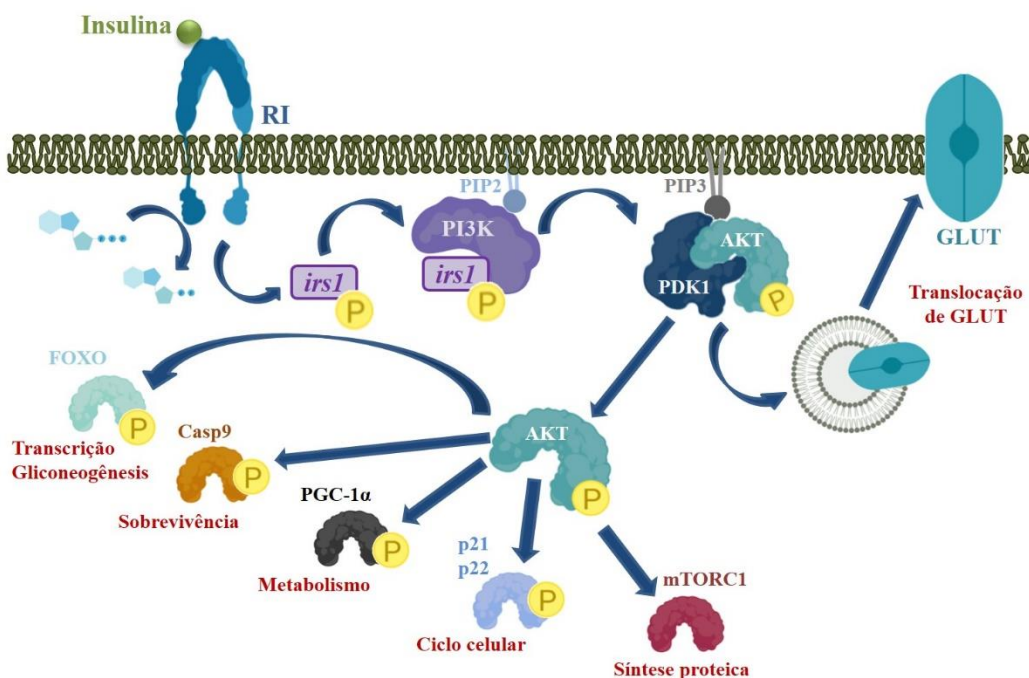


Figura 3. Funcionamento da via de sinalização da insulina. A ativação da via de sinalização da insulina se dá a partir da fosforilação do *irs1*, que, por sua vez, auxilia na fosforilação da PI3K, com subsequente fosforilação da AKT, promovendo a translocação dos transportadores de glicose (GLUT), além da ativação de outros processos celulares metabólicos.

Caso a via de sinalização da insulina torne-se prejudicada, devido à alguma doença, por exemplo, instala-se a resistência à insulina – processo envolvido com a progressão tanto do diabetes quanto da obesidade. Além da ação dos componentes da resposta inflamatória,

a resistência à insulina se estabelece através do excesso desse hormônio, que vai se tornando necessário em maiores quantidades, até o momento que, mesmo em excesso, o organismo não consegue utilizá-lo corretamente, como é o caso do DT2 e da obesidade.

A resistência à insulina também pode ocorrer no caso do DT1, uma vez que já foi observado que, no músculo e no fígado de pacientes com DT1, devido à hiperglicemia, a síntese prejudicada de trifosfato de adenosina (ATP) e o estresse oxidativo colaboram para este processo, que transcorre em conformidade com o observado em modelos murinos, com variações entre os tecidos. Mesmo pelo uso constante e crônico da insulina exócrina por meio do tratamento, o metabolismo da glicose nestes tecidos não é totalmente recuperado, pois apesar de controverso, o processo de resistência à insulina no DT1 pode ocorrer e deve ser investigado, por ter correlação com complicações vasculares, podendo contribuir não só para o melhor entendimento desta via, no DT1, como para melhoria nas terapias disponíveis [2, 10, 22, 72, 76].

Alguns trabalhos observaram que componentes da inflamação podem interferir no funcionamento desta via por meio de seus receptores, como no caso de TNF- α e Il-1, por exemplo. Uma vez que estas citocinas pró-inflamatórias se ligam aos seus respectivos receptores, elas bloqueiam a fosforilação do irs1, conseqüentemente, impedindo a ativação por completo da via de sinalização da insulina [13, 32, 77]. Não obstante, também foi observado que outros componentes da inflamação, como, por exemplo, os mediadores lipídicos, representados aqui pelo LTB₄, são capazes de promover a mesma atividade, quando se ligam ao seu receptor BLT1 [13, 32]. Vale ressaltar que este funcionamento prejudicado da via de sinalização da insulina foi bem descrito e observado, tanto no DT2 quanto na obesidade [78-81]; todavia, mais estudos são necessários para avaliar se, no DT1, isto ocorre, de modo semelhante ou não, independentemente da produção prejudicada de insulina em detrimento da destruição autoimune das células β -pancreáticas [82, 83].

1.6 A via da autofagia no diabetes do tipo 1 e na obesidade

A autofagia é um processo catabólico crucial para a homeostase celular, atuando na degradação e na reciclagem de diversos componentes intracelulares, mediado pelos

autofagolisossomos, podendo ser classificada como macroautofagia (comumente conhecida como autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperona. Quando esse processo ocorre com os lipídios armazenados no interior da célula, o processo autofágico passa a ser chamado de lipofagia [84]. O início do processo de autofagia ocorre quando o conteúdo citoplasmático é internalizado em uma estrutura de membrana dupla única (autofagossomo) que, então, se funde com um lisossomo para completar a degradação, sendo que as principais proteínas envolvidas neste processo de formação do autofagolisossomo são: *autophagy related 6* (Beclin1) e *autophagy related 14* (Atg14), para o estágio de nucleação da membrana; *autophagy related 5* (Atg5), *autophagy related 7* (Atg7) e *autophagy related 12* (Atg12), para o estágio de alongamento e fechamento; e proteína 1 associada a microtúbulos de cadeia leve 3 α (LC3) e Atg7, para o estágio final de formação do fagossomo. Quando todos esses complexos interagem, ocorre então a fusão do fagossomo com o lisossomo e o processo de degradação finalmente ocorre (**Fig. 4**) [85].

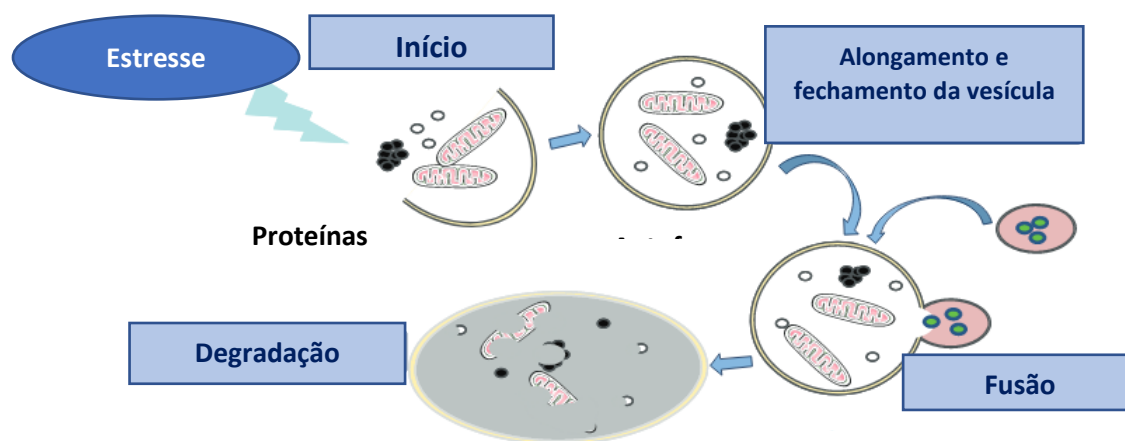


Figura 4. Esquema representativo da autofagia – adaptado [85]. O processo de autofagia envolve a formação de uma vesícula de dupla membrana chamada autofagossomo. Esta estrutura sequestra organelas danificadas, proteínas e lipídeos, entre outros constituintes celulares, que são degradados, em seguida, por enzimas lisossomais após a fusão do lisossomo com o autofagossomo.

A autofagia é considerada um processo metabólico de suma importância para o organismo e está associada a uma gama de doenças, quando prejudicada, dentre elas a obesidade e o diabetes. A autofagia prejudicada está correlacionada à diabetogênese e à obesidade, por

meio do desenvolvimento de inflamação e resistência à insulina no fígado e tecido adiposo [86], como demonstrado em um estudo no qual camundongos, nocautes para Atg7, apresentaram intolerância à glicose no fígado e em um modelo de obesidade, quando o nocaute para Atg7 no fígado induziu aumento no estresse do retículo endoplasmático (ER), seguido por resistência à insulina hepática [87, 88]. Outro estudo observou que, no DT1, os marcadores LC3/LAMP1 no pâncreas encontraram-se reduzidos, indicando que o processo autofágico poderia estar prejudicado no órgão, o que pode explicar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido ao aumento do estresse no retículo endoplasmático e à consequente apoptose das células β -pancreáticas [89]. Em contrapartida, em pacientes obesos, já foi reportado aumento destes marcadores relacionados à via da autofagia, como o LC3 e o Atg5 [90]. Sabe-se que, quando ativada, a autofagia estimula a adipogênese e a diferenciação de adipócitos, além de estimular o acúmulo de tecido adiposo, indo, portanto, de acordo com o porquê de estes marcadores estarem mais expressos na obesidade [91, 92].

Existe uma relação entre os subprodutos do SRA e a autofagia através da ativação do receptor AT1 via AngII. Todavia, a função desencadeada desta ativação depende do tipo celular envolvido, o que reforça a necessidade de mais estudos compreendendo os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos [93]. O modo como o SRA e o processo de autofagia ocorre já foi demonstrado em trabalhos envolvendo outros tipos celulares, principalmente células endoteliais, neuronais e cardíacas, porém, a relação entre esses processos em órgãos metabolicamente ativos ainda necessita de investigações para se compreender o papel das angiotensinas na autofagia, uma vez que sabe-se da importância destes tecidos no desenvolvimento da obesidade ou do diabetes [94-98].

Sabendo-se da interação entre os diversos componentes metabólicos, processos celulares e vias de sinalização expostos acima, visamos investigar o papel dos LTs na resistência à insulina e na expressão de marcadores fenotípicos de macrófagos em músculos de camundongos diabéticos. Em seguida, avaliamos a relação do SRA e dos LTs no DT1 quanto às alterações nas vias de autofagia e insulina. Por último, avaliamos o papel do SRA

tanto no DT1 quanto na obesidade, também com ênfase nas vias de autofagia e insulina, devido às semelhanças encontradas nestas doenças, uma vez que diversos estudos já avaliaram o papel dessas vias e desses processos celulares no DT2 e/ou na obesidade, sendo que, por outro lado, poucos estudos focaram investigar se o mesmo ocorre também no DT1.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

No presente trabalho, objetivamos investigar a interação entre os LTs, o SRA, o DT1 e a obesidade, com ênfase específica no papel da inflamação, da autofagia e da sinalização do receptor de insulina em órgãos metabolicamente ativos.

Objetivos específicos:

I - Avaliar o envolvimento dos LTs no DT1.

II - Avaliar o envolvimento dos LTs e do SRA no DT1.

III - Avaliar e comparar o envolvimento do SRA no DT1 e na obesidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos camundongos de 8 semanas C57bl/6, 129sve e seu respectivo *knockout* para a 5-LO (5LO KO). Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de claro e escuro, com livre acesso à água, porém, com acesso restrito à ração apenas no protocolo de indução do DT1, conforme descrito abaixo. Todos os protocolos seguiram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (#08/15 livro 03).

Em estágio de pesquisa realizado na Texas Tech University (TTU, Lubbock, Texas/EUA), com a supervisão da Profa. Titular Naima Moustaid-Moussa, com bolsa no exterior de doutorado (BEPE - FAPESP, 2019/09983-3), foram utilizadas amostras de camundongos transgênicos C57bl/6 Agt (Agt-Tg), nos quais o angiotensinogênio foi superexpressado especificamente no tecido adiposo (usando o promotor a2). Os animais foram utilizados para o grupo/protocolo de obesidade/HFD, seguindo as diretrizes do Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da TTU e da Universidade do Tennessee.

3.2 Indução de DT1

Durante 5 dias consecutivos, o grupo de camundongos DT1 foi submetido a jejum por 5 horas, seguido por injeção intraperitoneal (i.p.) de STZ (ChemCruz® U-9889, lote F1816) (65 mg/kg diluídos em tampão de citrato 0,1 M, pH 4,5); após 1 hora, os animais foram mantidos com livre acesso a alimentos. Consideramos diabéticos os camundongos que apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL (OneTouch® Select Simple™) 10 dias após a última dose de STZ [46-48, 56]. O grupo controle não diabético recebeu apenas injeção de tampão de citrato. Para avaliar a variação no peso corporal, os animais foram pesados durante a administração de STZ.

3.3 Indução de obesidade

O grupo de camundongos obesos foi induzido com dieta hiperlipídica (HFD: 45%, 20% e 35% de gordura, proteína e carboidrato, respectivamente) por 12 semanas.

3.4 Tratamento com captopril

Os grupos de camundongos DT1 tratados com captopril receberam o tratamento (30 mg/kg diluídos em água potável) diariamente pela técnica de gavagem por 4 semanas. Nos grupos de camundongos obesos/HFD, esse tratamento durou 12 semanas, uma vez que a indução por HFD também durou 12 semanas [63].

3.5 Grupos experimentais

No presente estudo, trabalhamos com os seguintes grupos experimentais:

- Linhagem 129sve e 129sve 5LO KO:

Grupo controle (Wt), grupo tratado com captopril (Cap), grupo de camundongos com DT1 e grupo de camundongos com DT1 tratados com captopril (DT1 + Cap).

- Linhagem C57bl/6:

Grupo controle (Wt), grupo tratado com captopril (Cap), grupo de camundongos com DT1 e grupo de camundongos com DT1 tratados com captopril (DT1 + Cap).

- Linhagem C57bl/6 Agt-Tg:

Grupo HFD controle (HFD Wt), grupo HFD Agt-Tg (HFD Agt-Tg), grupo HFD tratados com captopril (HFD + Cap) e grupo HFD Agt-Tg tratados com captopril (HFD Agt-Tg + Cap).

3.6 Expressão gênica

O RNA das amostras de músculo e fígado foram extraídos através do mini-kit RNeasy e a concentração foi determinada por leitura em espectrofotômetro na absorvância de 260 nm

(Qiagen, Valencia, CA, EUA). Para cada amostra de tecido, o cDNA foi obtido pela reação de transcrição reversa com o supermix iScript (BioRad, Hercules, CA, EUA). Os ensaios de expressão gênica foram realizados com reação quantitativa em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq), utilizando Sybr green master mix (BioRad, Hercules, CA, EUA) e normalizados com os genes Hprt ou 18S (housekeeping) e a expressão relativa foi calculada utilizando-se o limiar (Ct) comparativo e a expressão relativa de acordo com o grupo controle ($\Delta\Delta C_t$ method) de acordo com Schmittgen, T.D et al, 2008 [99]. A **Tabela 1** apresenta a lista de todos os primers utilizados.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nas qPCRs

Primer	Sequência
18S	F: GGACAGGATTGACAGATTGATAGC
	R: TGCCAGAGTCTCGTTCGTTA
Hprt	F: GGCTTACCTCACTGCTTTC
	R: CCTGGTTCATCATCGCTAATC
Mcp1	F: CAAGTTGCCGTCTGAACTGA
	R: TATCTCTGTCATCCCTGTCTCT
Stat1	F: GACTTCAGACACAGAAATCAACTC
	R: TTGACAAAGACCACGCCTT
IL-6	F: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
	R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
Arg1	F: AGTGTGATGTCAGTGTGAGC
	R: GAATGGAAGAGTCAGTGTGGT
Ym1	F: CAGTTATCAGATTCCTTCGTCAAT
	R: TCTCCACAGATTCTTCCTCAA
Agt	F: CTGCTGGCTGAGGACAAG
	R: CGAGGAGGATGCTATTGAGAAC
At1	F: CACTCAAGCCTGTCTACGA
	R: TGTCACTCCACCTCAGAAC
Insr	F: ACCTTCCAGTATGTTCCCTCAG
	R: TGCCTTCAGTCATTACCTCTT
Irs1	F: TCGCTAACTGAGATAGTCATACAA
	R: TCCTGCTAACATCCACCTT
Ampk	F: TCAGCACTCCGACAGACTT
	R: GGCATCCAGCAGCACATT
Beclin1	F: GAGATTGGACCAGGAGGAA
	R: AGGTGGCATTGAAGACATTG
Atg14	F: GGCTGGAGTCTGTTCTGT
	R: TTGCTGTAGGCGGTAGTT
Atg5	F: TCAGAAGGTTATGAGACAAGAAGA
	R: GGATGGACAGTGTAGAAGGT
Atg12	F: AGCAGGAAGAGTGAACCA
	R: AAGCACATAGAGACGAGAAGT
Atg7	F: CCAGGAGATTCAACCAGA
	R: GCAGGACAGAGACCATCA
Lc3	F: CTTCTTCCTGCTGGTCAAC
	R: TCTTCATCCTTCTCCTGTTTATA

3.7 Quantificação de proteínas e western blotting

As amostras de músculo e fígado foram colocadas em tubo de 2 ml contendo bead de metal de 4,8 mm e tampão RIPA (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Triton X-100, 0,1% SDS suplementado com um comprimido contendo inibidor de protease). As amostras foram então maceradas com auxílio do Qiagen Tissue Lyser. Depois disso, os tubos foram centrifugados para se obter o sobrenadante de cada amostra. A concentração total de proteínas foi medida usando o teste de proteína de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Utilizou-se SDS-PAGE a 10% para a separação de lisados proteicos inteiros, seguido de transferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Burlington, MA, EUA). As membranas foram incubadas com anticorpos primários *overnight* com agitação leve a 4 °C. Os anticorpos primários usados foram p-AKT, LC3, p-AMPK, p-mTOR, AKT, AMPK, mTOR, β -Actina e TBP produzidos em coelhos (Cell signaling, Dallas, TX, EUA). As membranas foram então incubadas com anticorpos secundários anti-rabbit por 1 hora (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, EUA), seguido de detecção de fluorescência usando a máquina LI-COR Odyssey para quantificação das bandas de proteínas através dos *pixels* de cada banda; em seguida, os valores obtidos da banda alvo foram divididos pelos valores obtidos da banda da proteína controle respectiva para obtenção do valor proporcional real de cada proteína alvo (TBP, AKT, AMPK ou mTOR) (LI-COR Odyssey CLX, Lincoln, NE, EUA).

3.8 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Após jejum de 6 horas, os camundongos receberam injeção i.p. de insulina (Novolin®, lote CS6G140, 1 (referente aos resultados da parte 1) [47] e 0,75 (referente aos resultados da parte 2) UI /kg). Depois disso, o nível de glicose no sangue foi determinado (OneTouch® Select Simple™) utilizando amostras de sangue coletadas da veia caudal, a cada 30 minutos, durante as 2 horas seguintes.

3.9 Dosagem de triglicerídeos

A concentração de triglicerídeos foi avaliada com amostras de plasma dos camundongos pelo kit Triglyceride Colorimetric Assay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), de acordo com as diretrizes do fabricante.

3.10 Dosagem de ácidos graxos não esteroides (NEFA)

A dosagem de NEFA foi avaliada com amostras de plasma dos camundongos pelo kit Wako NEFA-HR (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Richmond, VA, EUA), de acordo com as diretrizes do fabricante.

3.11 Ensaio multiplex

As concentrações de IL-6, insulina total, leptina e resistina, de amostras de plasma dos camundongos, foram avaliadas, utilizando a tecnologia Luminex XMAP Magpix™, Milliplex® MAP Mouse Metabolic Hormone Expanded Panel (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA, Cat. # MMHE-44K), e a concentração plasmática de adiponectina foi medida com a tecnologia Luminex XMAP Magpix™, kit Milliplex® MAP Mouse Adipokine Magnetic Bead Plex único (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA, Cat. # MADPNMAG-70K01), de acordo com as orientações do fabricante.

3.12 Análise estatística

Os dados foram processados e analisados pela análise de variância (ANOVA) e pelo pós-teste de Bonferroni no *software* GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, EUA). Valores de p bicaudais com intervalos de confiança de 95% foram adquiridos. Os dados foram representados como média \pm erro padrão e os valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e de $p < 0,001$ (***) foram considerados significativos, nos gráficos das análises de peso nas

partes 1, 2 e 3, e nos gráficos de teste de tolerância a insulina das partes 1 e 2 deste trabalho. Nos demais gráficos a representação estatística foi realizada através do uso de letras, interpretando-se da seguinte forma: barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto que barras com letras diferentes apresentam diferença estatística; Quando uma barra apresentar duas letras como por exemplo “ab”, significa ausência de diferença estatística com as barras que possuem apenas as letras “a” ou “b”. Todavia os resultados foram analisados da mesma forma, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni no *software* GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, EUA), também considerando os valores de p bicaudais com intervalos de confiança de 95%, apenas alterando a representação da diferença estatística entre as barras.

4. RESULTADOS

PARTE I – O PAPEL DOS LEUCOTRIENOS NO DT1, COM ÊNFASE NA INFLAMAÇÃO E NA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA

Os resultados apresentados na parte I foram publicados na revista *Mediators of Inflammation* em 2019 [47].

4.1 Padronização do modelo da DT1

Para indução de DT1 em camundongos Wt e 5LO^{-/-}, foi administrada STZ i.p. dividida em 5 doses individuais durante 5 dias. Antes de cada dose, os camundongos ficaram em jejum por 5 horas e, após 30 minutos da inoculação de STZ, foram mantidos com livre acesso à alimentação. Após a última dose, a variação do peso corporal foi acompanhada. Observamos que tanto o grupo Wt quanto o grupo 5LO^{-/-}, inoculados com STZ, apresentaram perda de peso significativa em relação aos seus controles, sendo a perda de peso indicativa, neste modelo, de que o camundongo está se tornando diabético (**Fig. 5A**). Para garantir que os camundongos estavam diabéticos, a glicemia também foi medida 10 dias após a última dose de STZ, de modo que apenas os camundongos com glicemia maior do que 300 mg/dL foram utilizados para os experimentos (**Fig. 5B**).

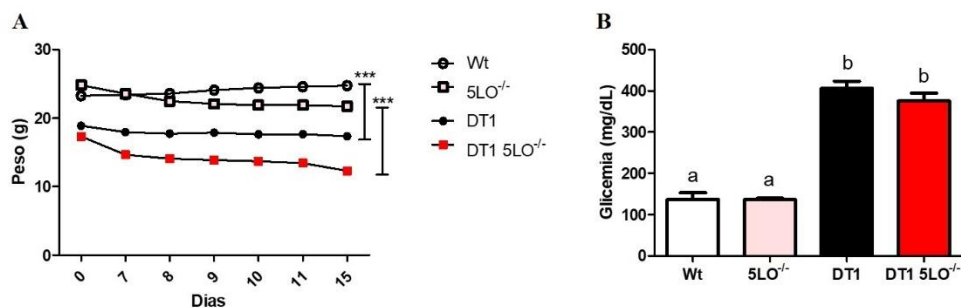


Figura 5. Variação de peso e glicemia de camundongos Wt e 5LO^{-/-}. **A:** Avaliação do peso dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. **B:** Avaliação da glicemia dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. O peso dos camundongos foi avaliado ao longo do protocolo de indução e a glicemia foi verificada 10 dias após a última dose de STZ. Foram considerados diabéticos os camundongos que apresentaram perda de peso juntamente com glicemia acima de 300 mg/dL. n=4-7 animais por grupo e os valores são a média ± SEM. ***p <0,001.

Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.2 Avaliação da insulina em camundongos Wt e 5LO^{-/-}

Após submetermos os camundongos ao teste de tolerância à insulina, observamos que camundongos 5LO^{-/-} DT1 controlaram a glicemia ao longo do tempo. Em contraste, os camundongos Wt DT1 apresentaram capacidade reduzida no controle glicêmico, em comparação ao grupo *knockout*, sugerindo papel significativo dos LTs na via de sinalização da insulina (Fig. 6A). Para avaliar a produção de insulina por camundongos Wt e 5LO^{-/-}, dosamos a insulina do plasma desses camundongos por ELISA e constatamos que ambos os grupos DT1 apresentaram baixa produção, em comparação com seus controles, confirmando mais uma vez nosso modelo (Fig. 6B).

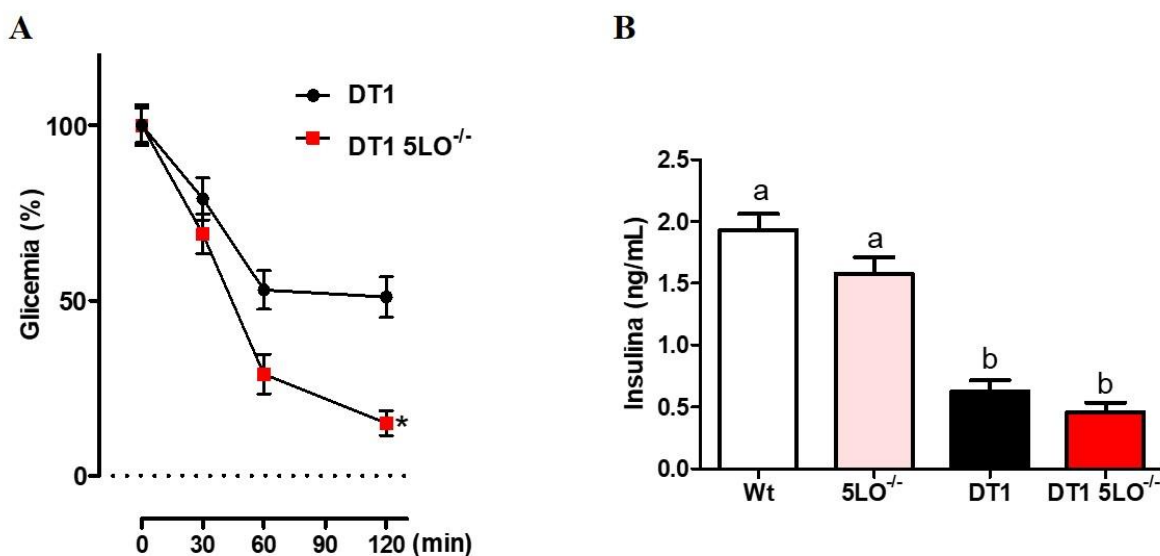


Figura 6. Teste de tolerância à insulina e dosagem de insulina de camundongos Wt e 5LO^{-/-}.

A: Teste de tolerância à insulina dos grupos de camundongos DT1 e DT1 5LO^{-/-} avaliando o nível de glicose no sangue utilizando amostras de sangue coletadas da veia caudal, a cada 30 minutos, durante as 2 horas seguintes. **B:** Dosagem de insulina dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. Após a administração de insulina (1 IU/kg), o plasma foi retirado dos camundongos para avaliar a concentração de glicose e insulina. n=4-5 animais por grupo e os valores são a média

± SEM. *p <0,05 e ***p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.3 Avaliação da expressão gênica da via de sinalização da insulina em camundongos Wt e 5LO^{-/-}

Verificamos que, em camundongos DT1, a expressão de *Insr* nos músculos quadríceps e gastrocnêmio é menor em comparação com camundongos saudáveis. No entanto, camundongos 5LO^{-/-} DT1 expressaram nível semelhante de *Insr*, assim como camundongos saudáveis, sugerindo que os níveis aumentados de LTs relatados no DT1 controlam a expressão do receptor de insulina (**Fig. 7A e 7C**). Ambos os músculos dos camundongos 5LO^{-/-} DT1, que foram tratados com insulina antes da coleta das amostras, apresentaram maior nível de pAKT em comparação com camundongos Wt DT1 (**Fig. 7B e 7D**). Nossos resultados sugerem que os LTs no DT1 afetam a sinalização da insulina, desregulando essa via e, como consequência, contribuindo com o desenvolvimento de resistência à insulina nos músculos.

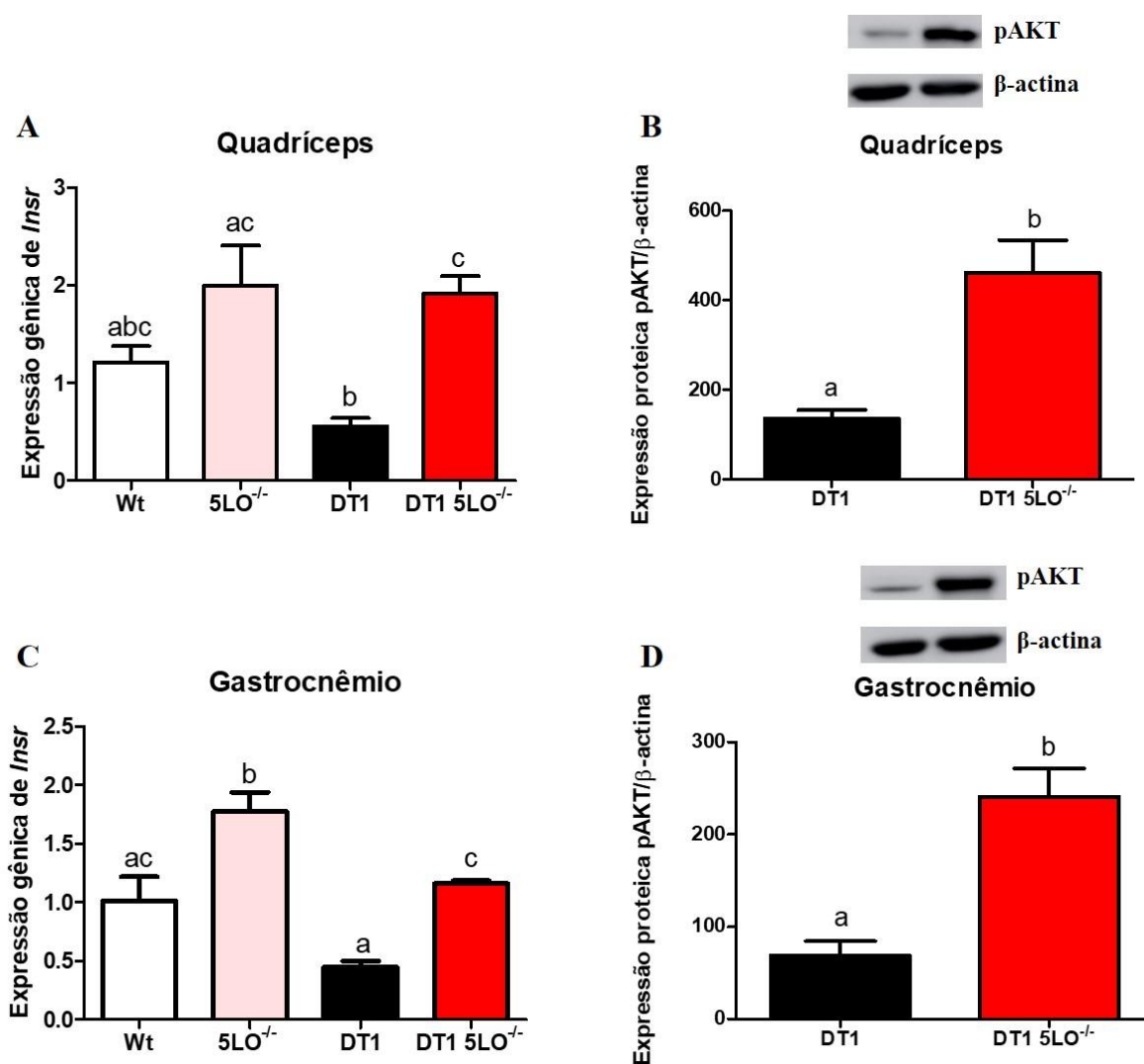


Figura 7. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-}. **A e C:** Expressão de *Insr* no quadríceps e no gastrocnêmio dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. **B e D:** Expressão proteica de pAKT no quadríceps e no gastrocnêmio dos grupos de camundongos DT1 e DT1 5LO^{-/-}. Avaliação da expressão do gene do receptor de insulina (*Insr*) e da fosforilação de AKT nos homogenatos de quadríceps e gastrocnêmio. n=4-6 animais por grupo. Para western blot, n = 3. Os valores são a média \pm SEM. *p <0,05 e **p <0,01. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores da inflamação no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-}

A expressão de alguns marcadores relacionados com diferentes perfis de macrófagos foi avaliada por qPCR. A expressão de marcadores anti-inflamatórios em músculos de camundongos Wt DT1 foi menor do que em músculos de camundongos 5LO^{-/-} DT1. No quadríceps de camundongos 5LO^{-/-} DT1, observamos alta expressão dos marcadores *Yml* e *Arg1* e baixa expressão do marcador *Mcp1* (**Fig. 8A-8D**), enquanto que, no gastrocnêmio de camundongos 5LO^{-/-} DT1, observamos alta expressão dos marcadores *Yml* e baixa expressão do marcador *Mcp1* (**Fig. 9A-9D**). Além da alta expressão de marcadores anti-inflamatórios em músculos de camundongos 5LO^{-/-} DT1, observamos maiores concentrações de IL-10 em comparação com camundongos Wt DT1 (**Fig. 8F e Fig. 9F**). Quando avaliamos o efeito dos LTs em relação à expressão de *IL-6*, nos músculos de camundongos Wt DT1 e 5LO^{-/-} DT1, a expressão de *IL-6* foi maior nos camundongos Wt DT1, de modo mais evidenciado no quadríceps (**Fig. 8E e Fig. 9E**). Estes resultados indicam o efeito dos LTs no músculo, uma vez que, na ausência dos LTs, o microambiente muscular apresenta aumento da expressão de marcadores anti-inflamatórios.

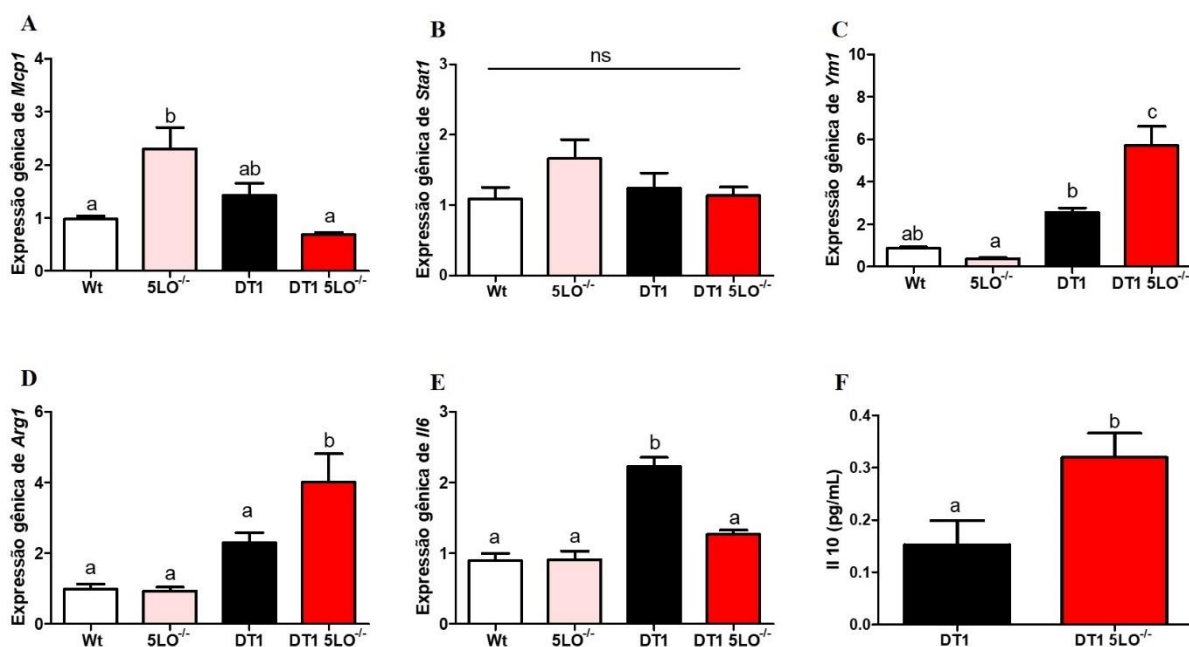


Figura 8. Expressão de marcadores da inflamação no músculo quadríceps de camundongos Wt e 5LO^{-/-}. **A, B, D e E:** Expressão de *Mcp1*, *Stat1*, *IL-6*, *Yml* e *Arg1* no quadríceps dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. **C e F:** Dosagem de IL-10 no quadríceps dos grupos de camundongos DT1 e DT1 5LO^{-/-}. Homogenatos de músculo quadríceps de camundongos diabéticos foram analisados quanto à expressão de marcadores anti-inflamatórios (*Yml*, *Arg1* e IL-10) e marcadores pró-inflamatórios (*Mcp1*, *Stat1* e *IL-6*). n=4-5 animais por grupo. Os valores são a média ± SEM. **p <0,01 e ***p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

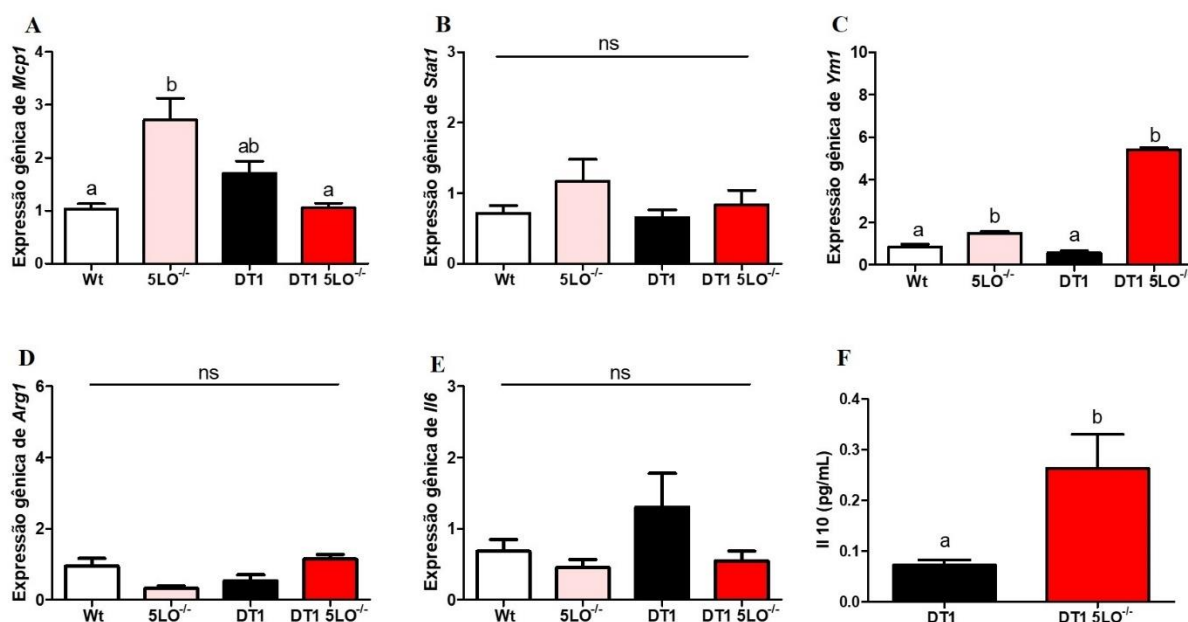


Figura 9. Expressão de marcadores da inflamação no músculo gastrocnêmio de camundongos Wt e 5LO^{-/-}. **A, B, D e E:** Expressão de *Mcp1*, *Stat1*, *IL-6*, *Yml* e *Arg1* no gastrocnêmio dos grupos de camundongos Wt, 5LO^{-/-}, DT1 e DT1 5LO^{-/-}. **C e F:** Dosagem de IL-10 no gastrocnêmio dos grupos de camundongos DT1 e DT1 5LO^{-/-}. Homogenatos de músculo gastrocnêmio de camundongos diabéticos foram analisados quanto à expressão de marcadores anti-inflamatórios (*Yml*, *Arg1* e IL-10) e marcadores pró-inflamatórios (*Mcp1*, *Stat1* e *IL-6*). n=4-5 animais por grupo. Os valores são a média ± SEM. **p <0,01 e ***p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4. RESULTADOS

**PARTE II – O PAPEL DOS LEUCOTRIENOS E DO SRA NO DT1, COM ÊNFASE
NA AUTOFAGIA E NA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA**

Os resultados apresentados na parte II estão em fase de redação para submissão futura.

4.5 Avaliação do peso e da glicemia em camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Ao induzirmos o DT1 com STZ, observamos que, mesmo após 30 dias depois da primeira verificação de glicemia, os camundongos permaneceram hiperglicêmicos, uma vez que, para iniciarmos o tratamento com captopril pelas próximas 4 semanas nos grupos DT1+Captopril e 5LO^{-/-} DT1+Captopril, primeiramente, teríamos que confirmar a hiperglicemia no 15º. dia após os camundongos serem induzidos com STZ. Depois da verificação de hiperglicemia, a metade dos grupos de camundongos DT1 foi submetida a tratamento com captopril diariamente, via gavagem (30mg/L), por 30 dias. Após 45 dias, os camundongos tratados ou não com captopril foram ressubmetidos à dosagem de glicemia, quando os camundongos com concentração superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. Assim como em nossos resultados anteriores, os camundongos dos grupos diabéticos perderam peso quando comparados aos seus controles. O tratamento de ambos os camundongos WT e 5LO^{-/-} com captopril não influenciou no ganho de peso desses camundongos, tampouco no controle da glicemia (**Fig. 10**).

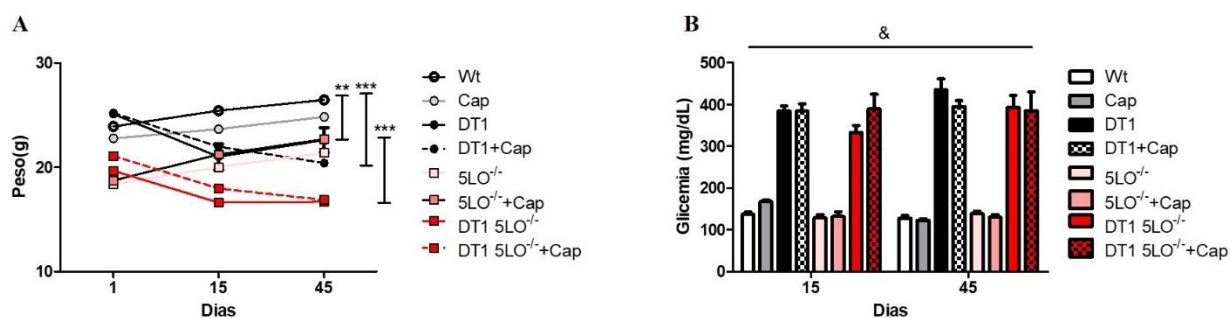


Figura 10. Variação de peso e glicemia de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados com captopril.

A: Avaliação do peso dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **B:** Avaliação da glicemia dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. O peso dos camundongos foi

avaliado ao longo do protocolo de indução de DT1 e tratamento com captopril. A glicemia foi verificada 10 dias após a última dose de STZ e 4 semanas depois do tratamento com captopril. Foram considerados diabéticos os camundongos que apresentaram perda de peso juntamente com glicemia acima de 300 mg/dL. n=5-7 animais por grupo e os valores são a média \pm SEM. ***p <0,001, &= ***p<0,001, entre Wt vs DT1 e DT1+Cap, e entre 5LO^{-/-} vs DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap.

4.6 Avaliação da insulina em camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Verificamos que os camundongos Wt apresentam capacidade reduzida de controlar a glicemia, mesmo após o tratamento com insulina. Todavia, de modo similar ao que observamos na primeira parte deste trabalho, camundongos DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-} tratados com captopril, ao receberem insulina, apresentaram menor porcentagem de glicose no sangue (**Fig. 11A e 11B**). Em relação à insulinemia no plasma desses animais, observamos, como esperado, que a concentração de insulina em ambos os grupos (tratados ou não com captopril) dos camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 apresentou-se menor quando comparada com a de seus respectivos grupos controles (**Fig. 11C e 11D**).

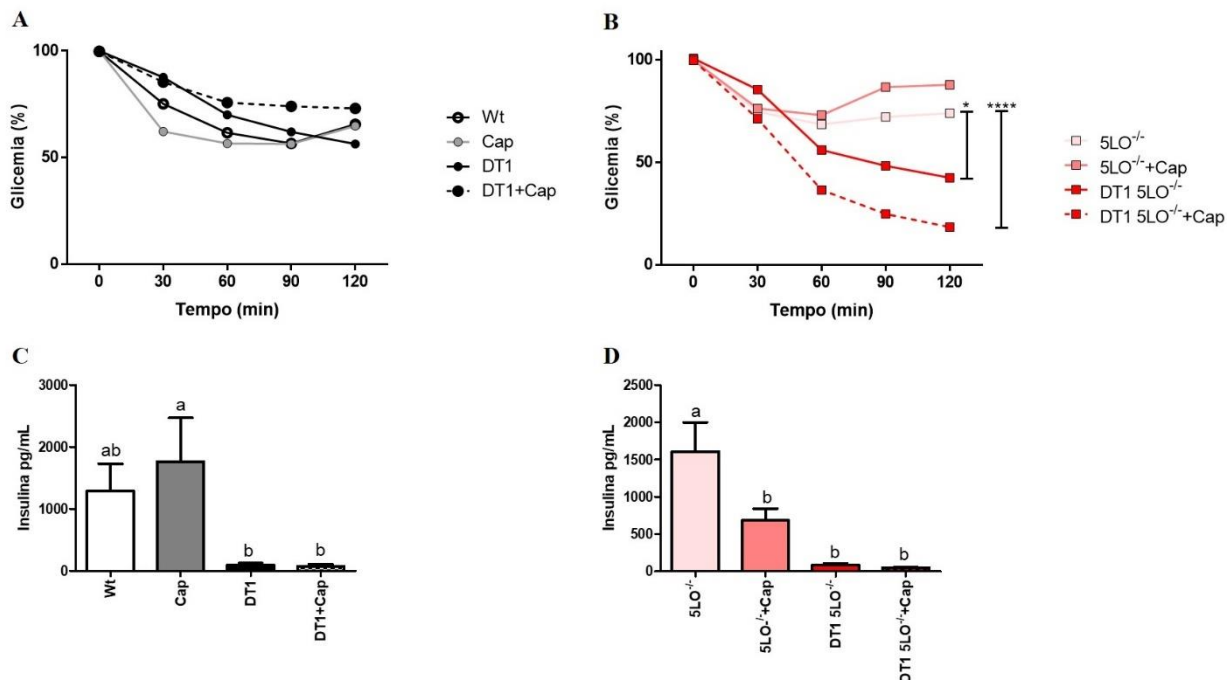


Figura 11. Teste de tolerância à insulina e dosagem de insulina de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados com captopril. A e B: Teste de tolerância à insulina dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** Dosagem de insulina dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. Após a administração de insulina (0.75 IU/kg), a porcentagem de glicose no sangue desses animais foi mensurada a cada 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A concentração plasmática de insulina foi analisada após retirarmos o plasma desses camundongos, sem nenhum tratamento com insulina, para não interferir na dosagem. n=5-9 animais por grupo e os valores são a média ± SEM. *p <0,05 e ****p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.7 Dosagem das principais adipocinas no plasma de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Em relação à concentração plasmática de IL-6, não observamos nenhuma diferença entre os grupos, independentemente da presença dos LTs e do tratamento com captopril (**Fig. 12A e 12B**). De modo interessante, observamos que a concentração plasmática de leptina estava reduzida também nos camundongos Wt DT1, independentemente da presença dos

LTs e do tratamento com captopril (**Fig. 12E e 12F**). Da mesma forma que observamos com a leptina, a concentração plasmática de resistina estava reduzida nos camundongos Wt DT1, independentemente da presença dos LTs e do tratamento com captopril (**Fig. 12I e 12J**). Ao avaliarmos a concentração plasmática de triglicerídeos (TG) nos camundongos Wt e 5LO^{-/-}, observamos, de modo interessante, aumento nas concentrações de TG apenas no plasma de camundongos 5LO^{-/-} DT1 e DT1 tratados com captopril (**Fig. 12C e 12D**). Em relação à dosagem de adiponectina, observamos, de modo interessante, diminuição na concentração desta adipocina apenas no plasma de camundongos 5LO^{-/-} DT1 e 5LO^{-/-} DT1 tratados com captopril (**Fig. 12H**). Ao avaliarmos a concentração de NEFA, no plasma dos camundongos Wt e 5LO^{-/-}, observamos aumento nas concentrações desses ácidos graxos apenas no plasma de camundongos 5LO^{-/-} DT1. Contudo, no plasma dos camundongos 5LO^{-/-} DT1 tratados com captopril, foi possível observar redução na concentração basal desses ácidos graxos (**Fig. 12L**). Estes resultados sugerem que o tratamento com captopril, nesses camundongos, pode auxiliar no controle da concentração plasmática de NEFA em camundongos diabéticos, porém de modo mais evidente na ausência dos LTs.

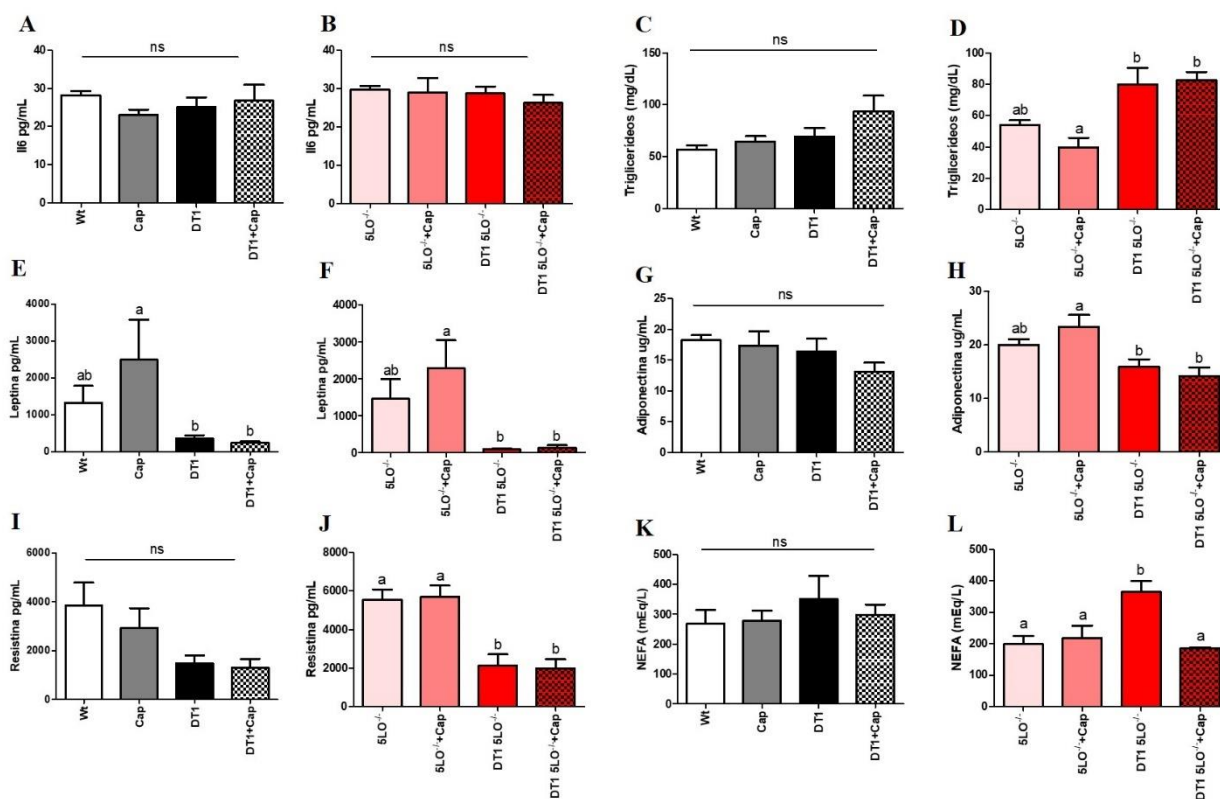


Figura 12. Concentração plasmática de adipocinas em camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril. **A e B:** Concentração plasmática de IL-6, **C e D:** triglicerídeos, **E e F:** leptina, **G e H:** adiponectina, **I e J:** resistina, **K e L:** ácidos graxos não esteroides (NEFA). A dosagem foi realizada a partir do plasma de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-9 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Observamos que, no músculo desses animais, houve aumento na expressão de *Agt*, nos camundongos Wt DT1 tratados com captopril, e que esta expressão aparentou ser independente da presença dos LTs, uma vez que a expressão deste gene mostrou-se similar entre ambos os grupos de camundongos Wt e 5LO^{-/-} (**Fig. 13A e 13B**). Interessantemente, observamos padrão semelhante também em relação à expressão gênica de *At1*, gene responsável por codificar o receptor que se liga à angiotensina II. Independentemente da presença de leucotrienos, o tratamento dos camundongos DT1 com captopril aumentou a expressão de ambos os genes: *Agt* e *At1* (**Fig. 13C e 13D**).

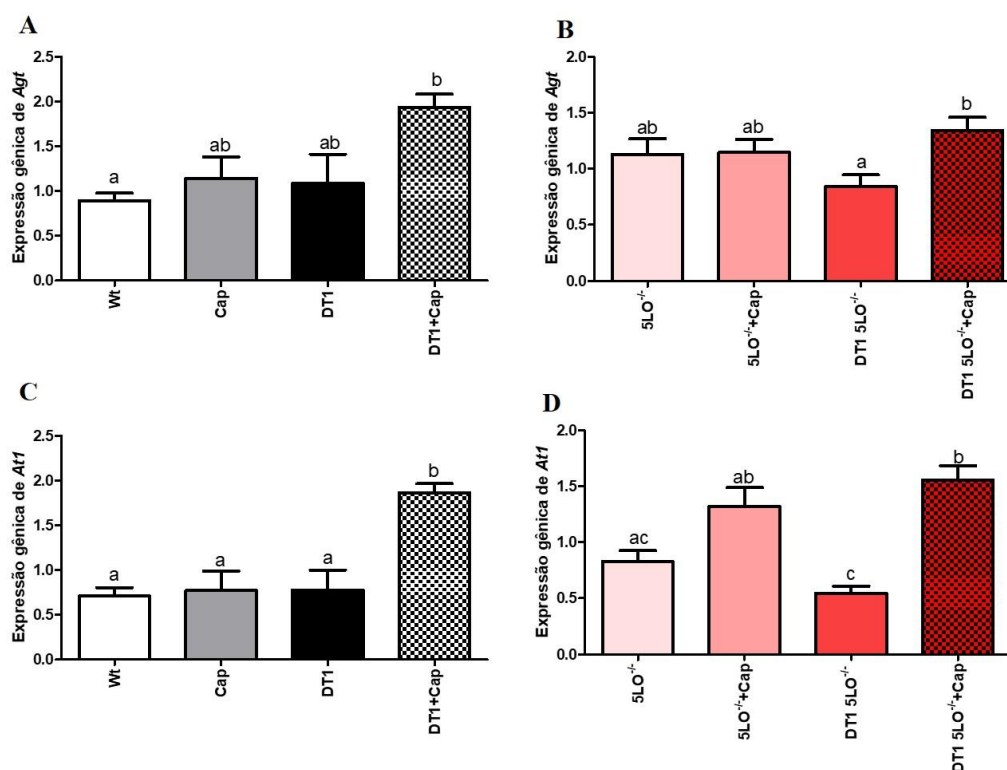


Figura 13. Expressão de marcadores do SRA no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. A e B: Expressão gênica de *Agt* no músculo dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** Expressão gênica de *At1* no músculo dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão gênica de *Agt* e *At1* foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-7 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.9 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Quando avaliamos a expressão desses marcadores nas amostras de fígado desses camundongos, observamos que houve aumento na expressão de *Agt* e *At1*, tanto nos camundongos Wt DT1 quanto nos camundongos Wt DT1 tratados com captopril, e que,

diferentemente do que foi observado no músculo desses animais, no caso do fígado, esta expressão aparenta ser dependente da presença dos LTs, uma vez que não observamos nenhuma diferença na expressão destes genes nos grupos dos camundongos $5LO^{-/-}$ (**Fig. 14A-14D**). O tratamento dos camundongos DT1 com captopril, neste caso, não aparenta ser a causa do aumento da expressão destes genes, uma vez que foi possível observar que o DT1 sozinho gerou este tipo de estímulo no fígado destes animais (**Fig. 14A-14D**).

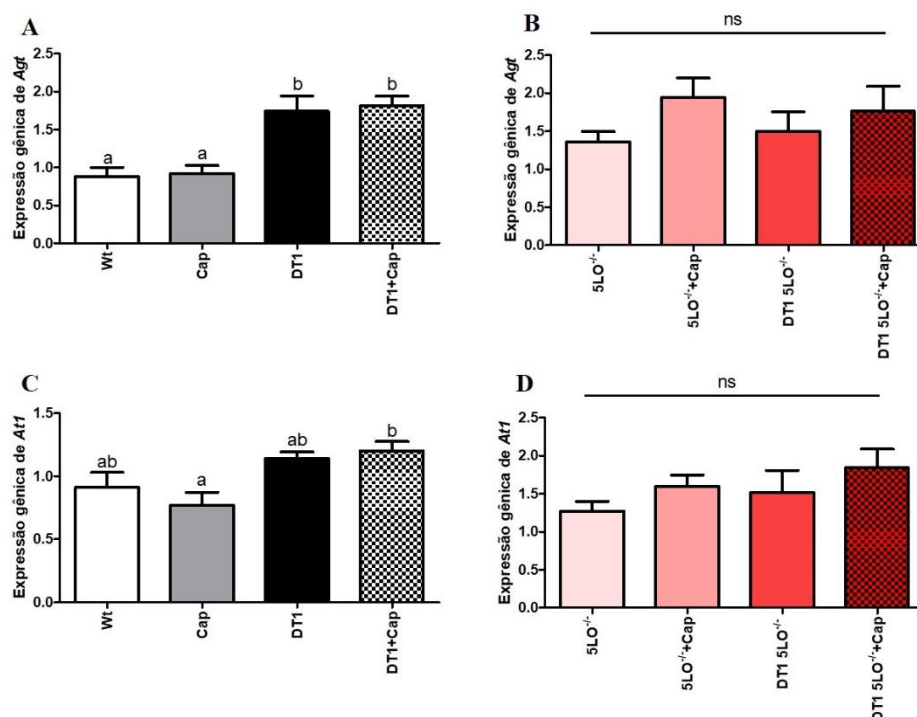


Figura 14. Expressão de marcadores do SRA no fígado de camundongos Wt e $5LO^{-/-}$ tratados ou não com captopril. A e B: Expressão gênica de *Agt* no fígado dos animais dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, $5LO^{-/-}$, $5LO^{-/-}$ +Cap, DT1 $5LO^{-/-}$ e DT1 $5LO^{-/-}$ +Cap. **C e D:** Expressão gênica de *Atf1* no fígado de animais dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, $5LO^{-/-}$, $5LO^{-/-}$ +Cap, DT1 $5LO^{-/-}$ e DT1 $5LO^{-/-}$ +Cap. A expressão gênica de *Agt* e *Atf1* foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt e $5LO^{-/-}$ saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=5-8 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05 e **p < 0,01. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.10 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Notamos que a expressão dos genes referentes ao receptor de insulina (*Insr* e *Irs1*) se apresentou reduzida nos músculos dos camundongos DT1, tanto Wt quanto 5LO^{-/-}, porém o tratamento com captopril estimulou o aumento da expressão destes genes, de modo mais acentuado na ausência dos LTs (**Fig. 15A, 15B, 15E e 15F**). Seguindo padrão semelhante, observamos o mesmo fenômeno relacionado aos genes que codificam o transportador de glicose 4 (*Glut4*) e a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (*Ampk*), responsáveis pela captação da glicose, pela oxidação de ácidos graxos e pela homeostase energética nos músculos, porém apenas nos músculos dos camundongos 5LO^{-/-} (**Fig. 15C, 15D, 15G e 15H**). Estes resultados sugerem que o tratamento com captopril pode estimular e auxiliar no funcionamento da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos com DT1.

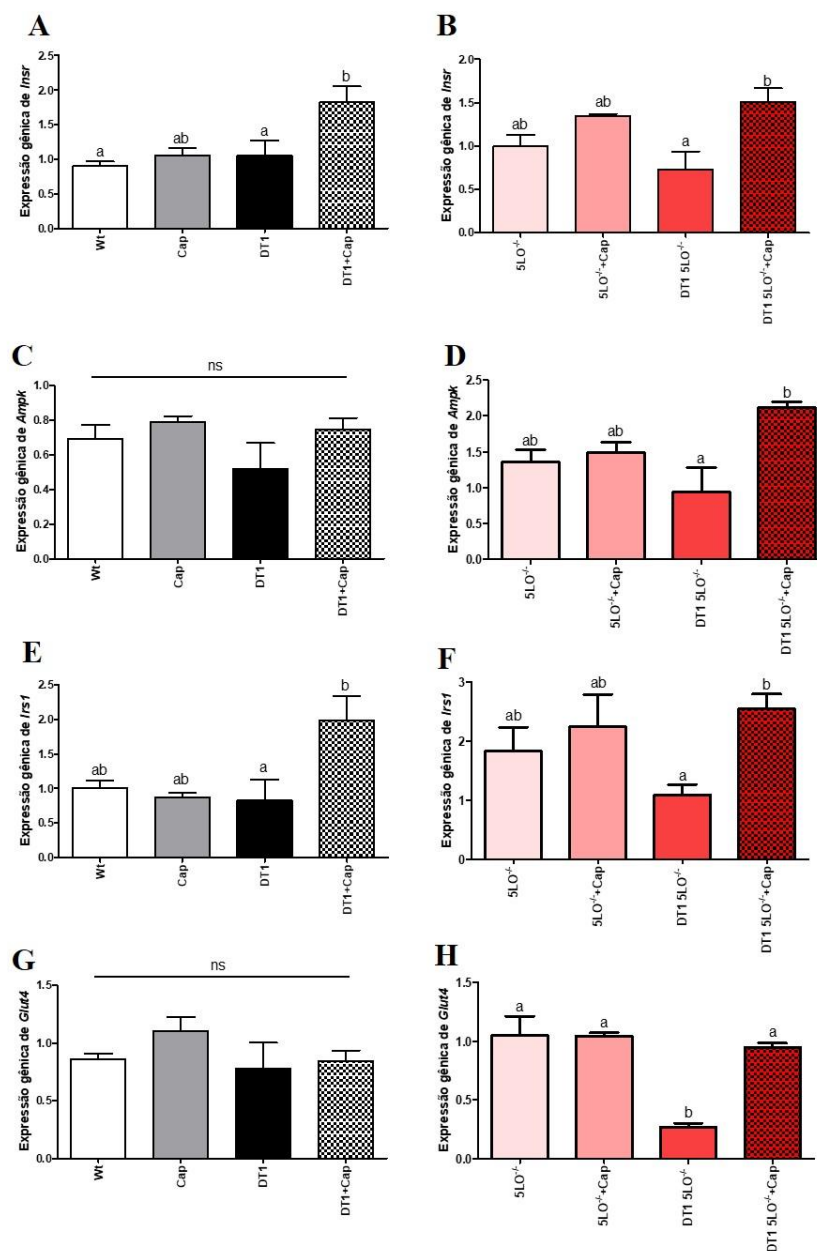


Figura 15. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** expressão gênica de *Insr*, **C e D:** *Ampk*, **E e F:** *Irs1*, **G e H:** *Glut4* no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão gênica dos marcadores da via de sinalização da insulina foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-8 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.11 Avaliação da expressão proteica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Após avaliarmos a expressão gênica de alguns marcadores relacionados à via de sinalização da insulina, avaliamos a presença proteica de pAKT e pAMPK no músculo desses camundongos. Não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos Wt, quanto em camundongos 5LO^{-/-} (**Fig. 16A-D**). Estes resultados sugerem que o tratamento com captopril não alterou estas vias em nível proteico.

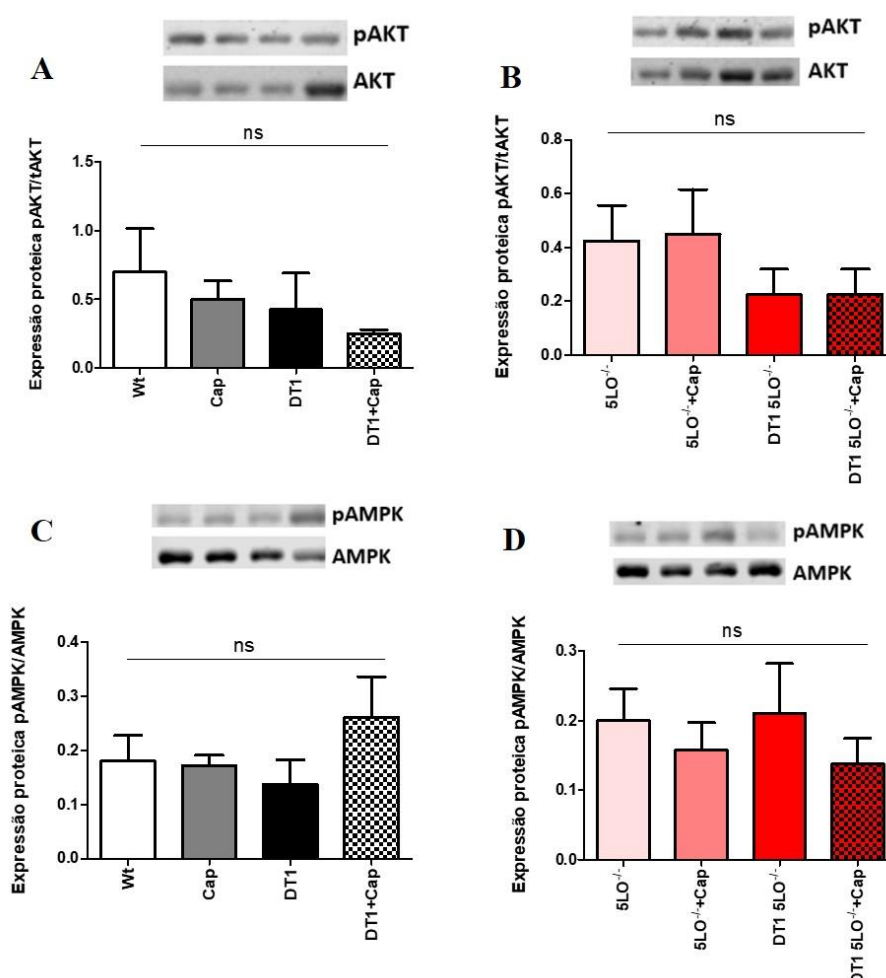


Figura 16. Expressão proteica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** Expressão proteica de pAKT no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** pAMPK no

músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão proteica de pAKT e pAMPK foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-5 camundongos por grupo.

4.12 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Em relação à via de sinalização da insulina no fígado destes camundongos, de modo interessante, observamos que a expressão dos genes referentes ao receptor de insulina (*Insr* e *Irs1*) e *Ampk* não apresentou nenhuma diferença entre os grupos, porém, no fígado dos camundongos 5LO^{-/-} DT1, houve diminuição na expressão destes genes; contudo, o tratamento com captopril estimulou o aumento da expressão destes genes – do mesmo modo que observamos nos músculos destes camundongos, de maneira mais similar quanto aos + camundongos 5LO^{-/-} (**Fig. 17A-17F**). Estes resultados sugerem que o tratamento com captopril pode estimular e auxiliar no funcionamento da via de sinalização da insulina, desta vez, em relação ao fígado, em camundongos com DT1, e que a ausência dos LTs pode estar relacionada com o funcionamento desta via.

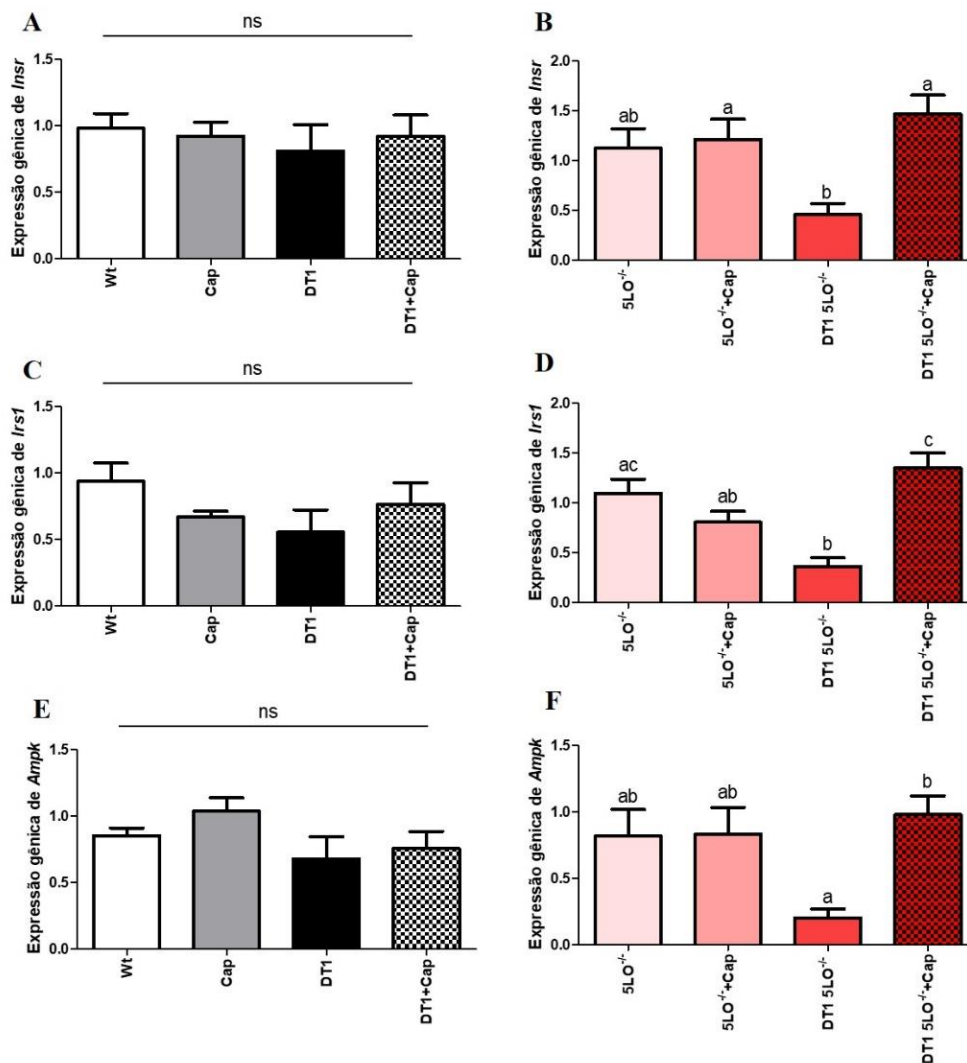


Figura 17. Expressão de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** expressão gênica de *Insr*, **C e D:** *Irs1*, **E e F:** *Ampk* no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão gênica dos marcadores da via de sinalização da insulina foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-7 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.13 Avaliação da expressão proteica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Avaliamos a expressão proteica de pAKT e pAMPK no fígado dos animais e, assim como observado nos resultados dos músculos desses camundongos, não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos Wt, quanto em camundongos 5LO^{-/-} (Fig. 18A-18D). Estes resultados sugerem que o tratamento com captopril não alterou estas vias em nível proteico.

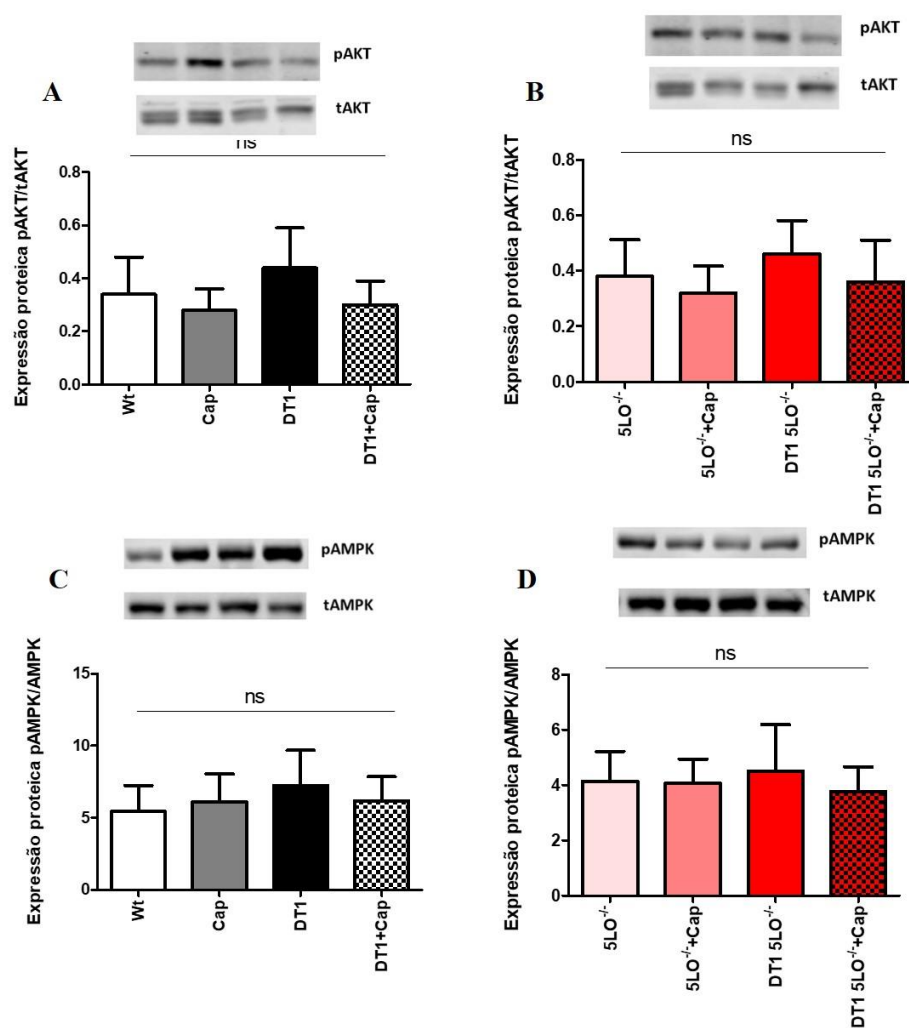


Figura 18. Expressão proteica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** Expressão proteica de pAKT no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** pAMPK no

fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão proteica de pAKT e pAMPK foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n = 5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.14 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Quando avaliamos a expressão gênica dos principais marcadores relacionados à via da autofagia, observamos aumento na expressão de alguns destes marcadores, tanto nos camundongos Wt DT1 quanto nos camundongos Wt DT1 tratados com captopril (**Fig. 19A, 19C, 19E, 19G, 19I e 19K**). Porém, em camundongos 5LO^{-/-} DT1, houve diminuição da expressão de *Atg12* e *LC3*, indicando que a presença dos LTs pode estar relacionada com o funcionamento desta via. Além disto, observou-se que a expressão destes genes, nos músculos dos camundongos 5LO^{-/-}, foi menor quando comparada com a dos camundongos Wt (**Fig. 19B, 19D, 19F, 19H, 19J e 19L**).

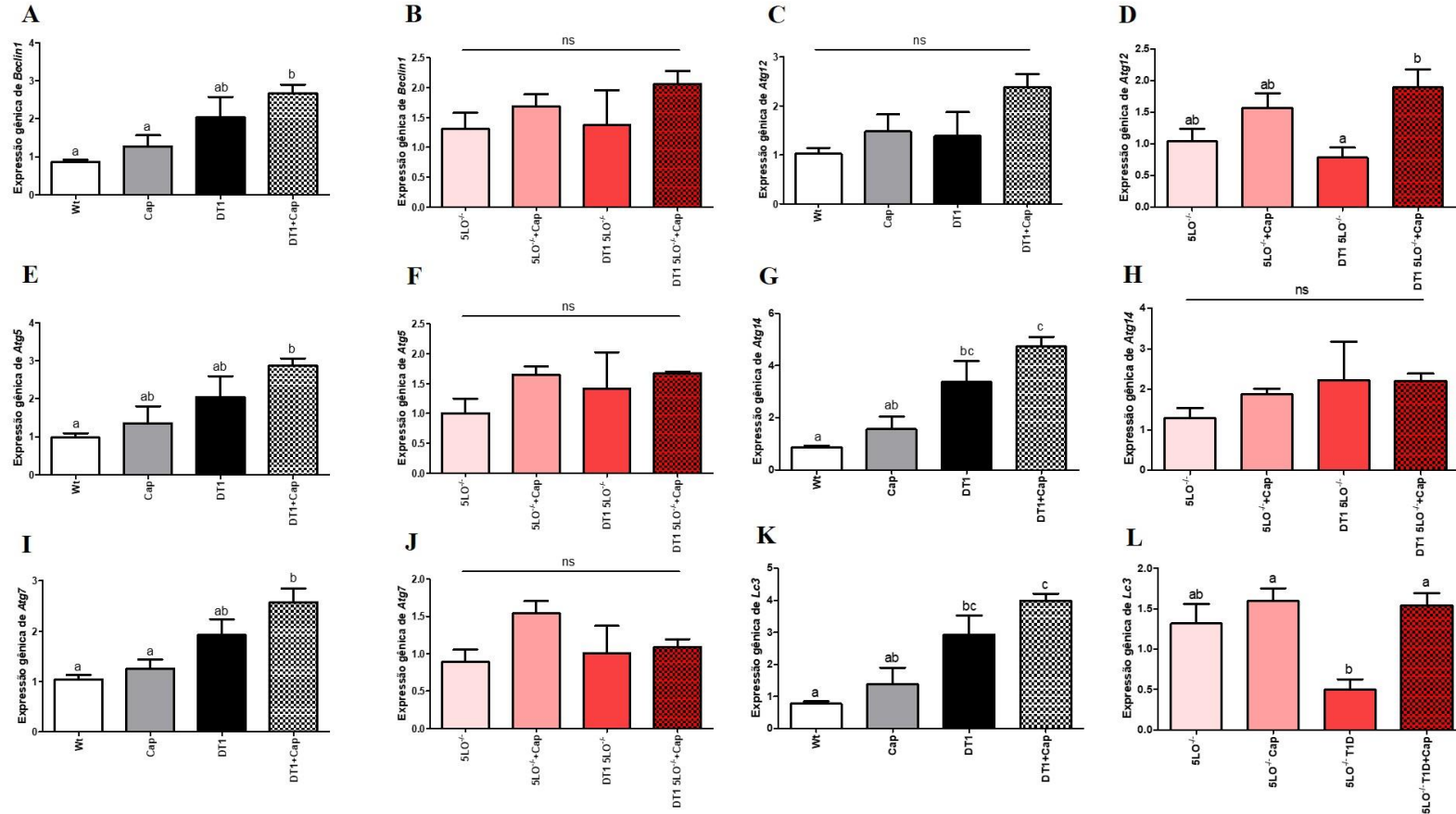


Figura 19. Expressão de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** expressão gênica de *Beclin1*, **C e D:** *Atg12*, **E e F:** *Atg5*, **G e H:** *Atg14*, **I e J:** *Atg7*, **K e L:** *LC3* no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão gênica dos principais marcadores da via da autofagia foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-6 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.15 Avaliação da expressão proteica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Avaliamos os níveis de expressão proteica de algumas proteínas relacionadas, pMTOR e LC3, ao processo de autofagia no músculo destes camundongos. Não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos Wt, quanto em camundongos 5LO^{-/-} (Fig. 20A-20D).

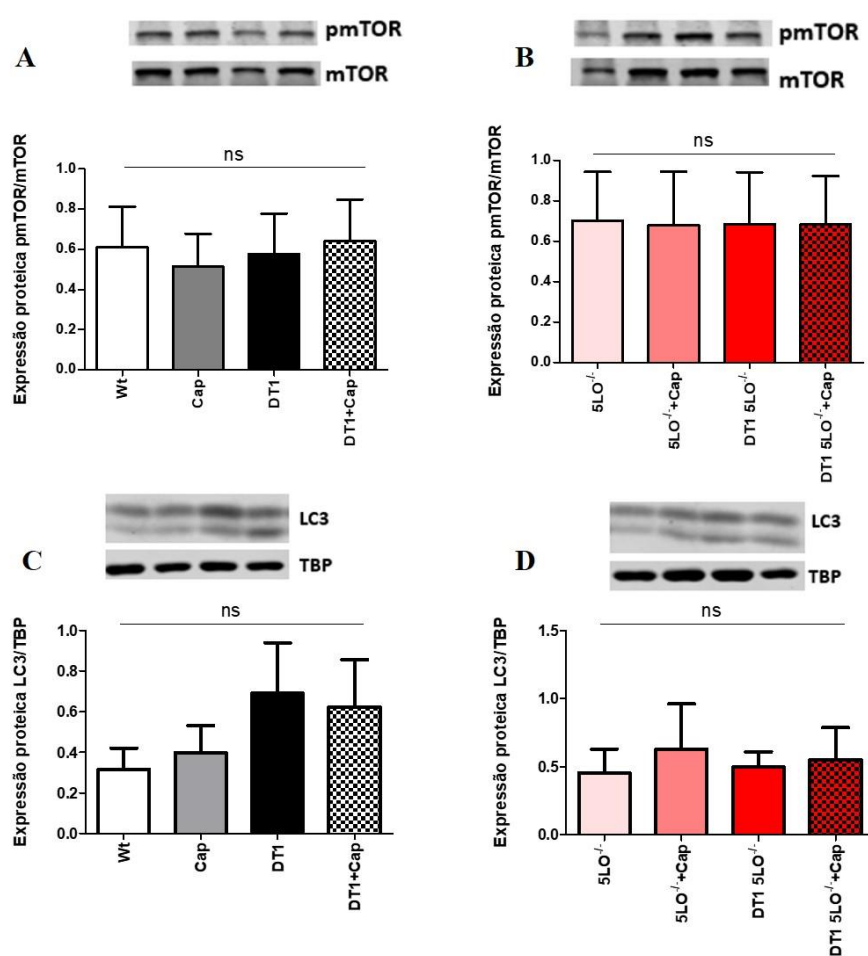


Figura 20. Expressão proteica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** Expressão proteica de pmTOR no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** LC3 no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão proteica de pmTOR e LC3 foi analisada a partir do homogenato de

músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.16 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Ao avaliarmos os níveis de expressão de alguns dos genes constituintes da via da autofagia, no fígado destes camundongos, observamos que houve aumento na expressão de *Agt12* e *Agt14*, em camundongos DT1 e 5LO^{-/-} DT1 tratados com captopril, e que, ao contrário do que observamos nos músculos destes camundongos, a expressão de alguns dos genes desta via ocorre independentemente da presença dos LTs (**Fig. 21A- 21L**).

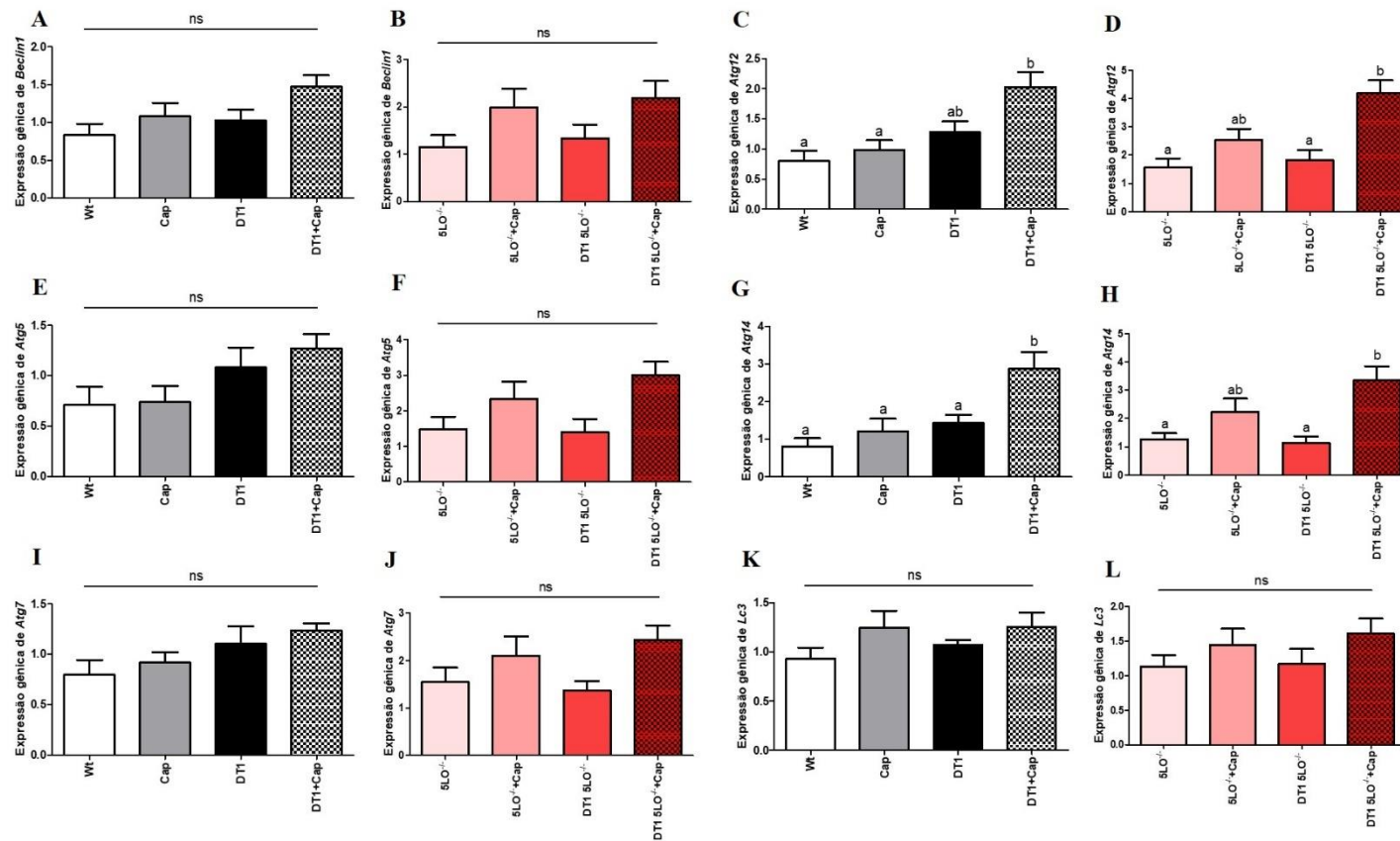


Figura 21. Expressão de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** expressão gênica de *Beclin1*, **C e D:** *Atg12*, **E e F:** *Atg5*, **G e H:** *Atg14*, **I e J:** *Atg7*, **K e L:** *LC3* no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A expressão gênica dos principais marcadores da via da autofagia foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=4-5 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05 e **p < 0,01. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.17 Avaliação da expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} DT1 tratados ou não com captopril

Avaliamos os níveis de expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado destes camundongos. Também não foi possível observar nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos Wt, quanto em camundongos 5LO^{-/-}, apesar de observarmos tendência na diminuição da expressão proteica de LC3 nos camundongos 5LO^{-/-} DT1 e 5LO^{-/-} DT1 tratados com captopril. Estes resultados sugerem que em nível proteico, somente este tratamento não aparentou alterar esta via (Fig. 22A-22D).

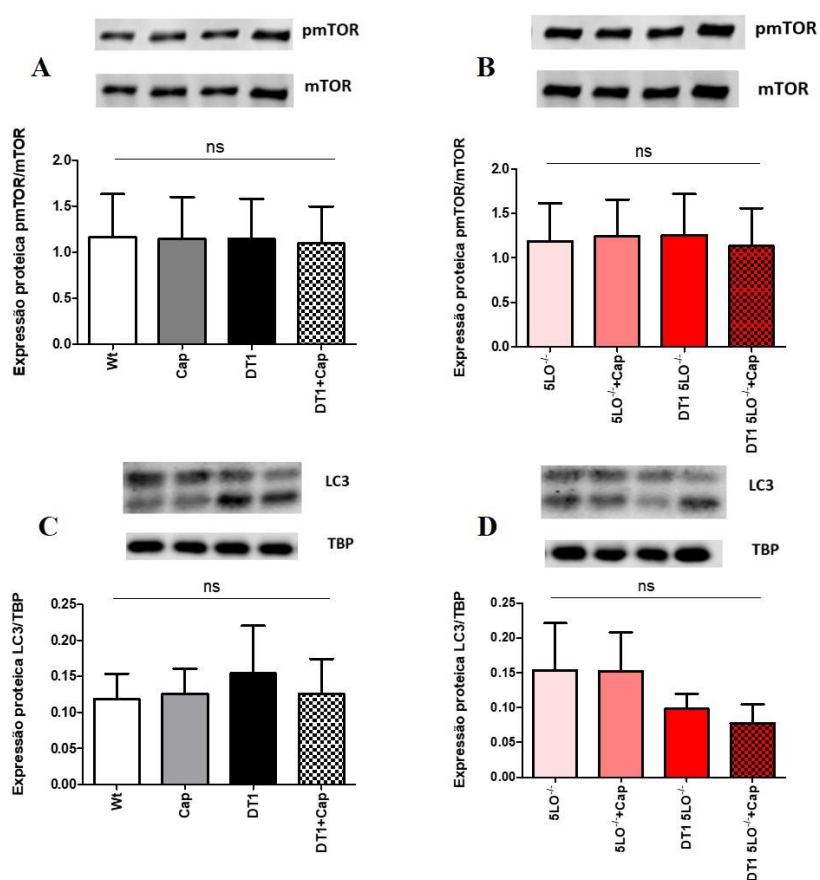


Figura 22. Expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados ou não com captopril. **A e B:** Expressão proteica de pmTOR no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. **C e D:** LC3 no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, 5LO^{-/-}, 5LO^{-/-}+Cap, DT1 5LO^{-/-} e DT1 5LO^{-/-}+Cap. A

expressão proteica de pmTOR e LC3 foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} saudáveis, diabéticos e tratados com captopril. n=5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4. RESULTADOS

**PARTE III – O PAPEL DOS DO SRA NO DT1 E NA OBESIDADE, COM ÊNFASE
NA AUTOFAGIA E NA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA**

Os resultados apresentados na parte III estão presentes em novo manuscrito já em processo de revisão final para submissão na revista “Scientific Reports”.

4.18 Avaliação do peso e da glicemia em camundongos da linhagem C57bl/6 DT1 tratados ou não com captopril

Observamos que, mesmo após 30 dias passados da primeira verificação da glicemia, os níveis glicêmicos continuaram altos suficientes para considerarmos diabéticos os camundongos que receberam STZ, validando nosso protocolo de indução para esta linhagem, da mesma forma que observamos nos resultados parte II deste projeto. Os camundongos dos grupos diabéticos perderam peso e apresentaram hiperglicemia, independentemente do tratamento com captopril (**Fig. 23A e 23B**).

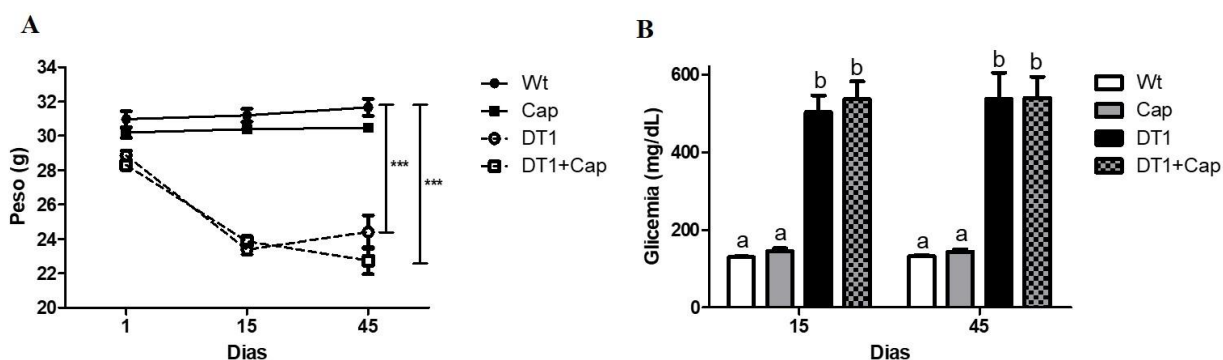


Figura 23. Avaliação do peso e da glicemia de camundongos da linhagem C57bl/6. A: Avaliação do peso dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap. **B:** Avaliação da glicemia dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap. Camundongos C57bl/6 foram pesados diariamente durante o protocolo de indução com STZ. Dez dias após a última injeção de STZ, a concentração de glicose no sangue dos camundongos foi analisada; após confirmação de hiperglicemia, a metade dos camundongos foi submetida a tratamento com captopril diariamente, via gavagem (30mg/L), por 30 dias. 45 dias depois, os camundongos tratados ou não com captopril foram ressubmetidos à dosagem de glicemia, quando os camundongos com concentração superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. n=7-13 camundongos por grupo. Os valores são a

média \pm SEM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.19 Dosagem das principais adipocinas e da insulina no plasma de camundongos da linhagem C57bl/6 tratados ou não com captopril

Avaliamos a concentração plasmática de IL-6, leptina, resistina, insulina, adiponectina, TG e NEFA, em camundongos saudáveis, diabéticos e tratados com captopril, e observamos que a concentração plasmática de IL-6 não foi alterada entre os grupos (**Fig. 24A**). Como esperado, a insulinemia nos grupos DT1 estava reduzida, independentemente do tratamento com captopril (**Fig. 24D**). Interessantemente, a concentração plasmática de leptina também diminuiu, não apenas em camundongos DT1 e camundongos DT1 tratados com captopril, mas também em camundongos Wt que receberam captopril (**Fig. 24B**). De modo semelhante ao que observamos com a leptina, os camundongos DT1 tratados ou não com captopril apresentaram menor concentração de resistina no plasma em comparação com os camundongos Wt. No entanto, a concentração plasmática de resistina, em camundongos Wt tratados com captopril, não se reduziu – em comparação com os camundongos Wt (**Fig. 24C**). Assim como observamos na dosagem de IL-6, não identificamos diferenças na concentração plasmática de adiponectina em entre os grupos (**Fig. 24E**). Curiosamente, as concentrações plasmáticas de TG foram maiores em camundongos DT1 tratados com captopril, em comparação com os camundongos Wt; no entanto, o tratamento com captopril não afetou a concentração de TG em camundongos não diabéticos (**Fig. 24F**). Também observamos concentração plasmática aumentada de NEFA em ambos os camundongos, DT1 e DT1, tratados com captopril (**Fig. 24G**).

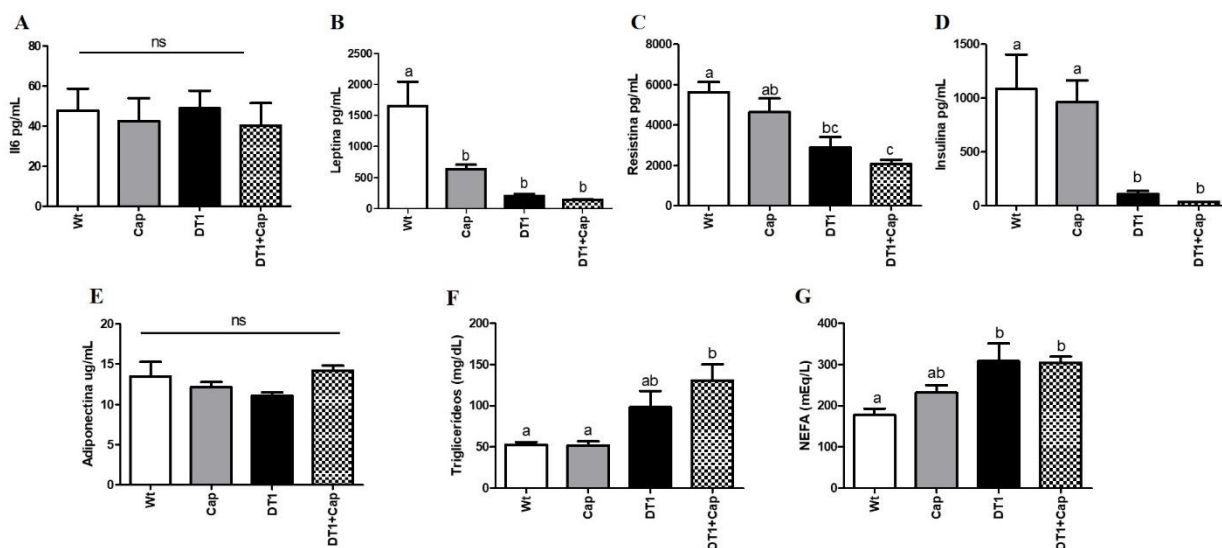


Figura 24. Concentração plasmática de adipocinas e insulina em camundongos da linhagem C57bl/6 tratados ou não com captopril. A: Concentração plasmática de IL-6, B: leptina, C: resistina, D: insulina, E: adiponectina, F: triglicerídeos e G: ácidos graxos não esteroides (NEFA) foi dosada a partir do plasma de camundongos C57bl/6 Wt, diabéticos e tratados com captopril. n =4-9 camundongos por grupo. Os valores são a média \pm SEM. *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.20 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril.

Observamos que, no músculo, houve aumento na expressão de *Agt* de camundongos DT1 tratados com captopril, em comparação com os camundongos Wt (**Fig. 25A**). Em relação à expressão de *At1*, observamos aumento apenas em camundongos DT1 tratados com captopril (**Fig. 25B**). Em amostras de músculo de camundongos obesos, a expressão de *Agt* foi maior apenas em camundongos obesos Agt-Tg tratados com captopril, em comparação com camundongos obesos tratados com captopril (**Fig. 25C**). Curiosamente, não houve

diferença na expressão do gene *At1* no músculo dos camundongos obesos ou obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril (Fig. 25D).

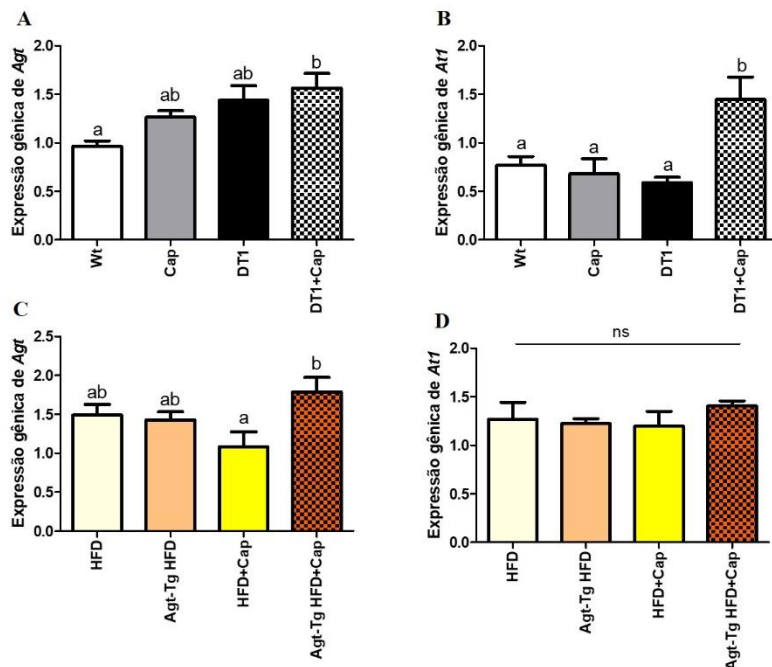


Figura 25. Expressão gênica de marcadores relacionados ao SRA no músculo de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e C: Expressão gênica de *Agt* no músculo dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** Expressão gênica de *At1* no músculo dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica de *Agt* e *At1* foi analisada em homogenato de músculo de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=4-6 camundongos por grupo. Os valores são a média \pm SEM. *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.21 Avaliação da expressão gênica de marcadores do SRA no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril

Observamos padrão semelhante ao verificado nos músculos em relação ao aumento da expressão de *Agt* e *At1* no fígado de camundongos tratados com captopril, DT1 e DT1

tratados com captopril (**Fig. 26A e 26B**). Em relação aos camundongos com obesidade, observamos diminuição na expressão de *Agt* e *At1* no fígado de camundongos obesos tratados com captopril e camundongos obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril (**Fig. 26C e 26D**).

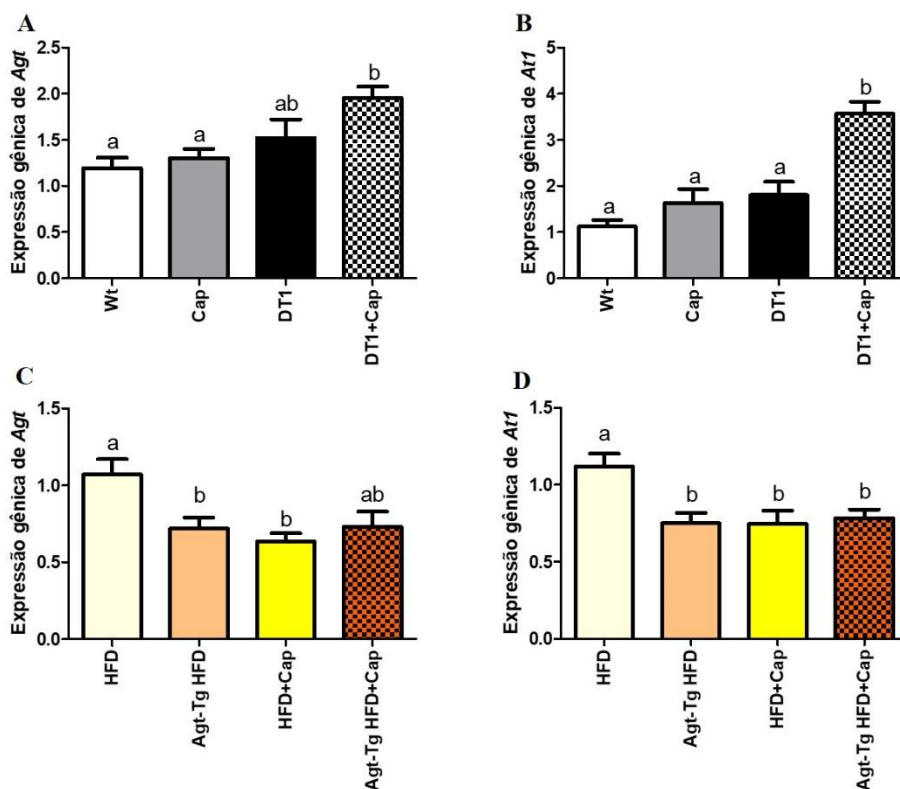


Figura 26. Expressão gênica de marcadores relacionados ao SRA no fígado de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e C: Expressão gênica de *Agt* no fígado dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** Expressão gênica de *At1* no fígado dos grupos de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica de *Agt* e *At1* foi analisada em homogenato de fígado de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=5-6 camundongos por grupo. Os valores são a média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.22 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril

O aumento na expressão *Insr* foi observado no músculo de camundongos DT1 tratados com captopril em comparação com outros grupos (**Fig. 27A**). Não observamos diferença na expressão *Irs1*, no músculo de camundongos Wt tratados ou não captopril; todavia, observamos que a expressão de *Irs1* estava aumentada em camundongos DT1 tratados com captopril, quando comparados com os camundongos DT1 (**Fig. 27B**). No entanto, não houve diferença na expressão de *Ampk* em camundongos Wt tratados ou não com captopril e DT1. Porém, os níveis de expressão de *Ampk* estavam aumentados no músculo de camundongos DT1 tratados com captopril em comparação com os camundongos Wt tratados ou não com captopril (**Fig. 27C**). Aparentemente, o tratamento com captopril nos camundongos DT1 não foi suficiente para resgatar a expressão de *Glut4* (**Fig. 27D**). No entanto, em músculos de camundongos obesos, não observamos diferença na expressão de *Insr* e *Ampk*; apenas observamos aumento da expressão de *Irs1*, em grupos de camundongos obesos tratados com captopril, independentemente da superexpressão de Agt (**Fig. 27E-27G**).

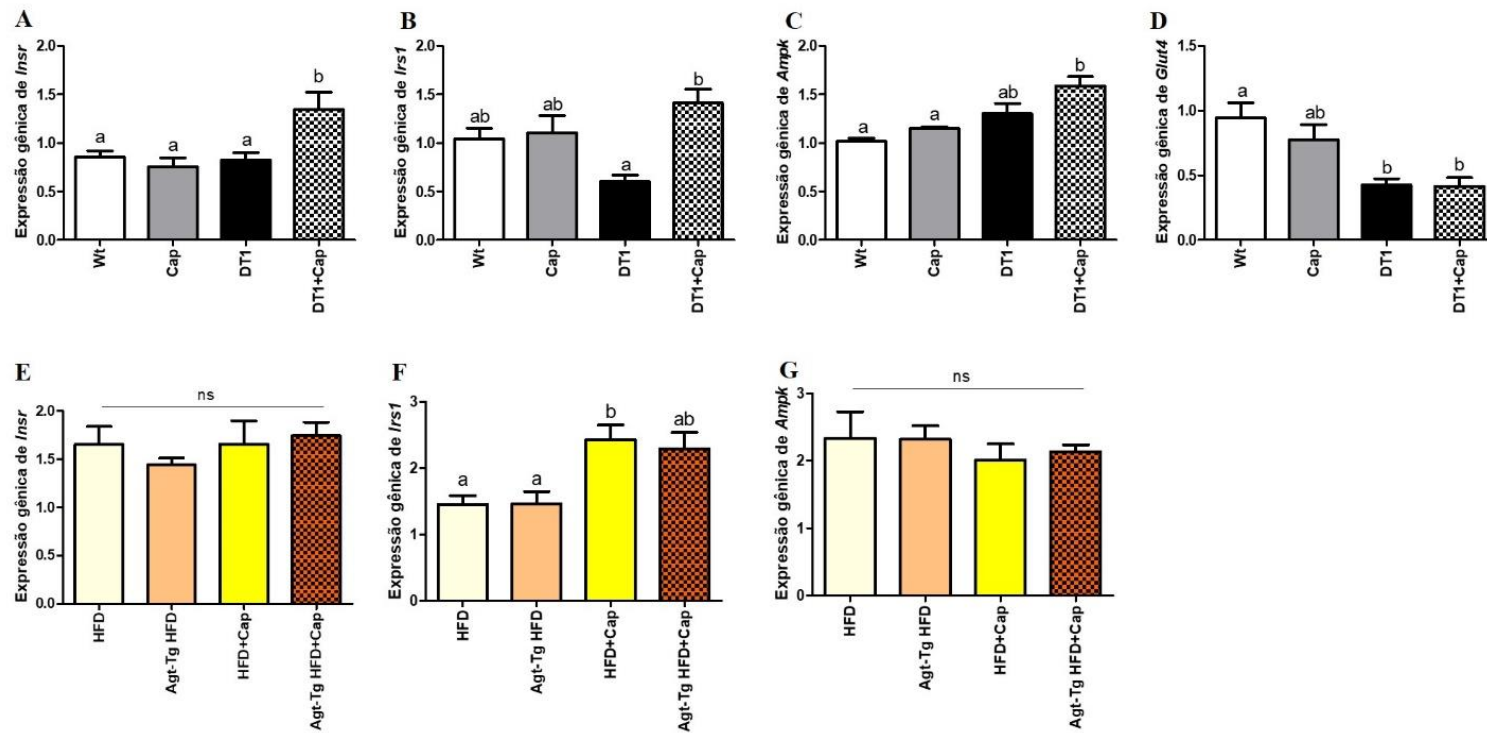


Figura 27. Expressão gênica de marcadores relacionados à via de sinalização da insulina no músculo de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e E: expressão gênica de *Insr*, **B e F:** *Irs1*, **C e G:** *Ampk* e **D:** *Glut4* no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica dos marcadores da via de sinalização da insulina foi analisada a partir de homogenato de músculo de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n = 4-5 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.23 Avaliação da expressão proteica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril.

Após avaliarmos a expressão gênica de alguns marcadores relacionados à via de sinalização da insulina, fomos avaliar a expressão proteica de pAKT e pAMPK no músculo destes camundongos. Não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos diabéticos quanto em camundongos obesos (**Fig. 28A-D**).

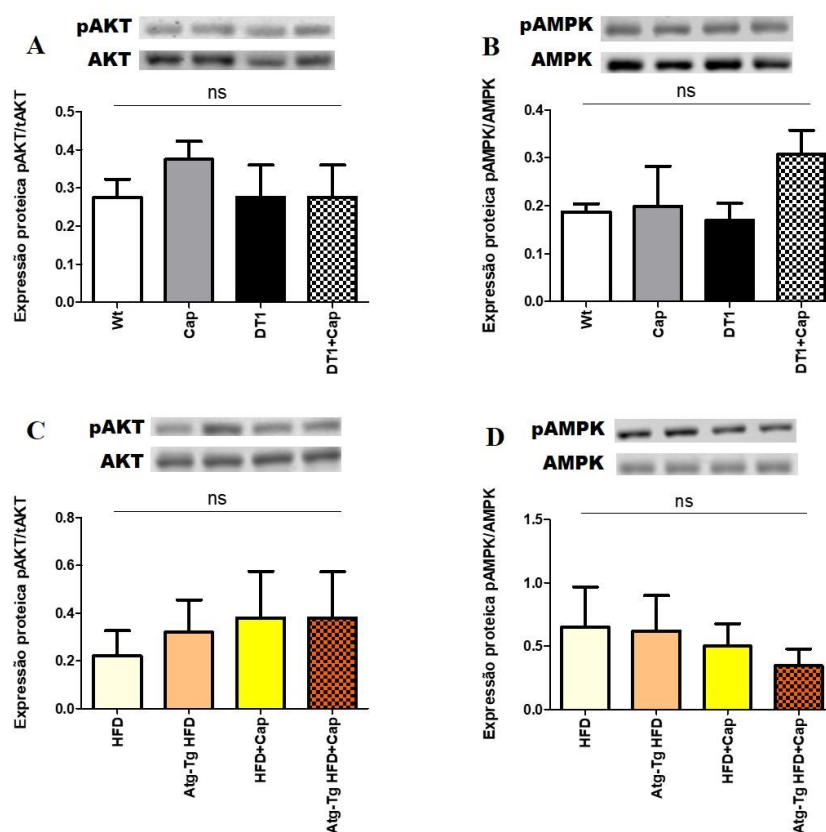


Figura 28. Expressão proteica de pAKT e pAMPK no músculo de camundongos diabéticos ou obesos. **A e C:** pAKT no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** pAMPK no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão proteica de pAKT e pAMPK foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=4-5 camundongos por grupo. Barras com letras

iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.24 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via de sinalização da insulina no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril.

Notamos que a expressão de *Insr* e *Irs1* também estava aumentada no fígado de camundongos DT1 tratados com captopril (Fig. 29A e 29B), assim como observado no músculo, apesar de não haver diferença na expressão de *Ampk* entre os grupos DT1 tratados ou não com captopril (Fig. 29C). No entanto, no fígado de camundongos obesos, observamos redução da expressão de *Insr* e *Ampk*, em camundongos obesos tratados com captopril e em camundongos obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril, em comparação com os camundongos obesos Wt (Fig. 29D-29F).

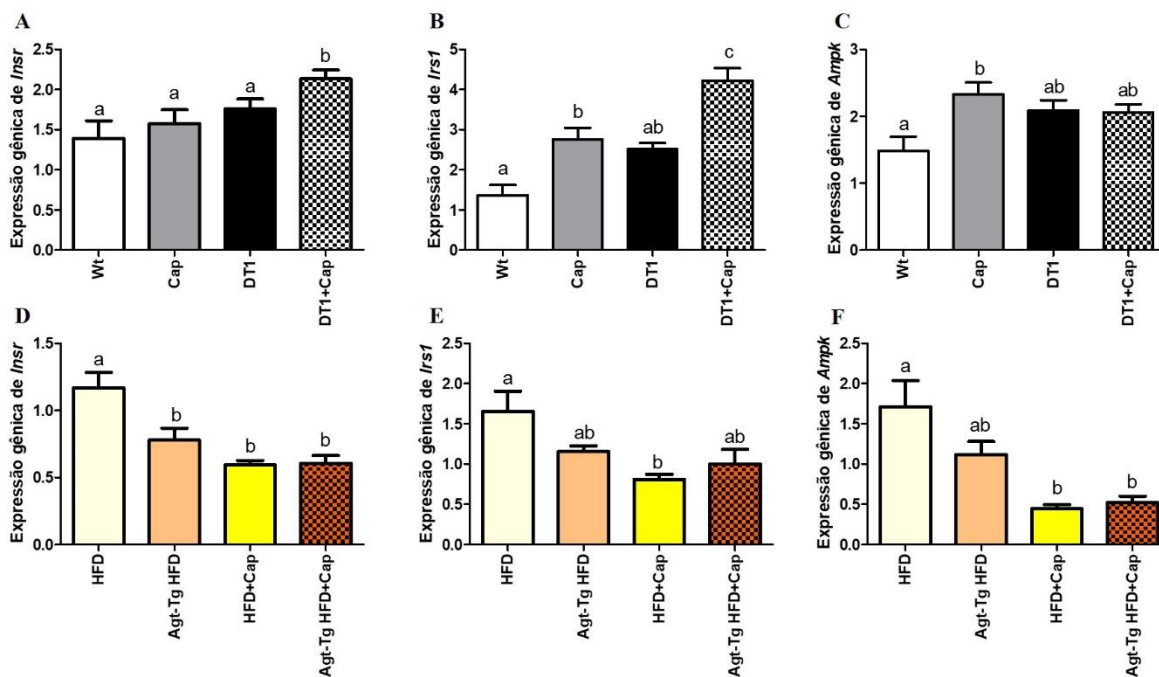


Figura 29. Expressão gênica de marcadores relacionados à via de sinalização da insulina no fígado de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e D: expressão gênica de *Insr*, B e E: *Irs1* e C e F: *Ampk* no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica dos marcadores da via de sinalização da insulina foi analisada a partir de homogenato de fígado de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=5-6 camundongos por grupo. Os valores são a média \pm SEM. *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.25 Avaliação da expressão proteica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril.

Como observamos que, no músculo destes camundongos, não havia nenhuma diferença na expressão proteica de pAKT e pAMPK entre os grupos, optamos por verificar também no fígado destes camundongos – e isso foi confirmado, tanto em camundongos diabéticos quanto em camundongos obesos (**Fig. 30A-D**).

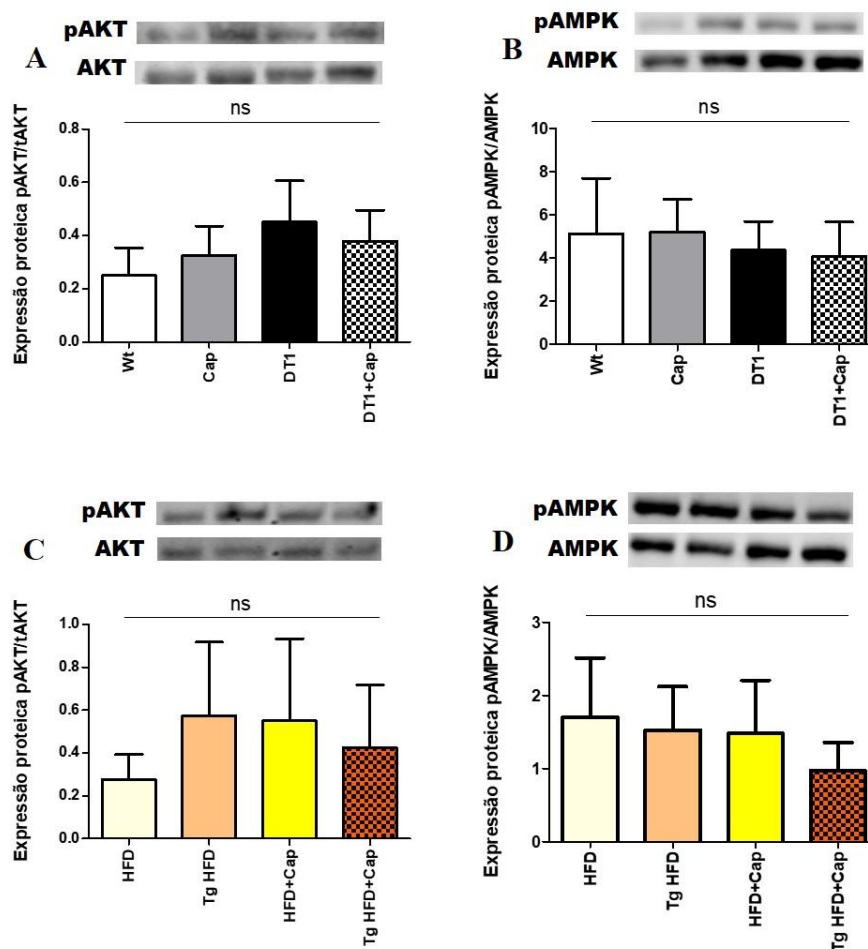


Figura 30. Expressão proteica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. **A e C:** Expressão proteica de pAKT no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** pAMPK no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão proteica de pAKT e pAMPK foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=4-5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.26 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril

Observamos aumento na expressão de *Beclin1*, *Atg14* e *LC3* no músculo de camundongos DT1 tratados com captopril, em comparação com os camundongos Wt (**Fig. 31A, 31E e 31F**). Não observamos nenhuma diferença no músculo de camundongos com obesidade, independentemente de tratamento com captopril ou superexpressão de Agt (**Fig. 31G-31L**).

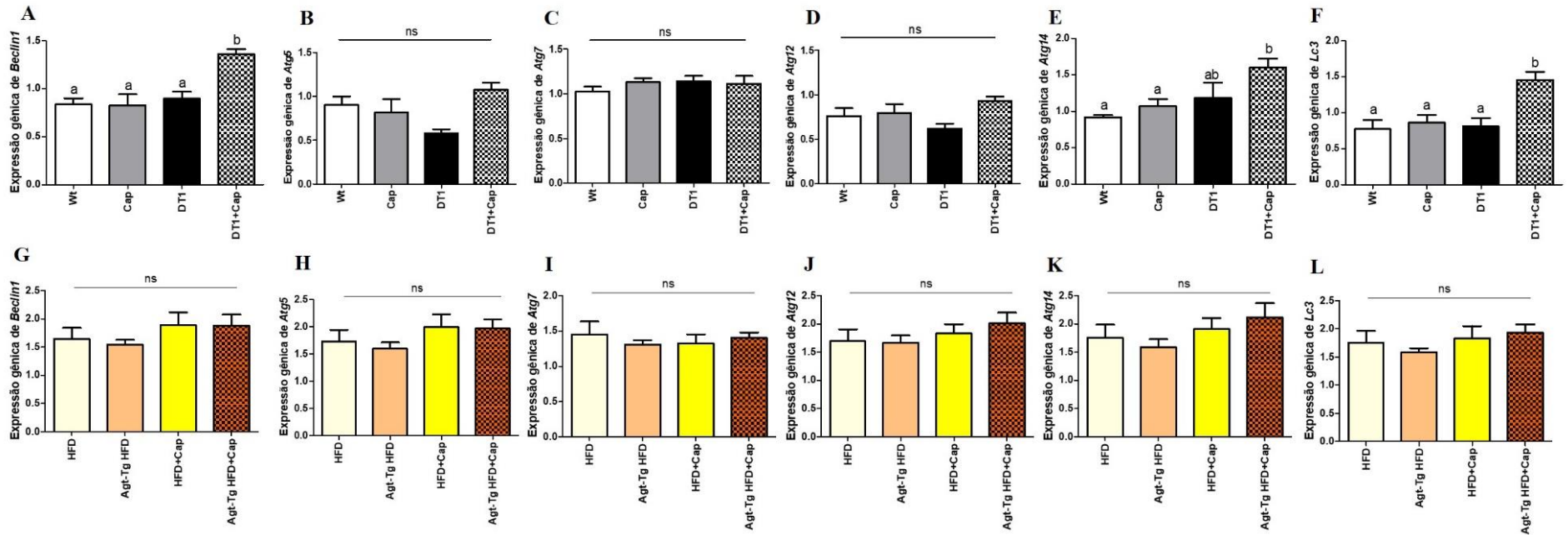


Figura 31. Expressão de marcadores da via da autofagia no músculo de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. **A e G:** expressão gênica de *Beclin1*, **B e H:** *Atg5*, **C e I:** *Atg7*, **D e J:** *Atg12*, **E e K:** *Atg14*, **F e L:** *LC3* no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica dos principais marcadores da via da autofagia foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n = 4-7 camundongos por grupo. Os valores são a média \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.27 Avaliação da expressão proteica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril

Avaliamos a expressão proteica de pmTOR e LC3, no músculo destes camundongos, e não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos diabéticos quanto em camundongos obesos, tratados ou não com captopril (**Fig. 32A-32D**).

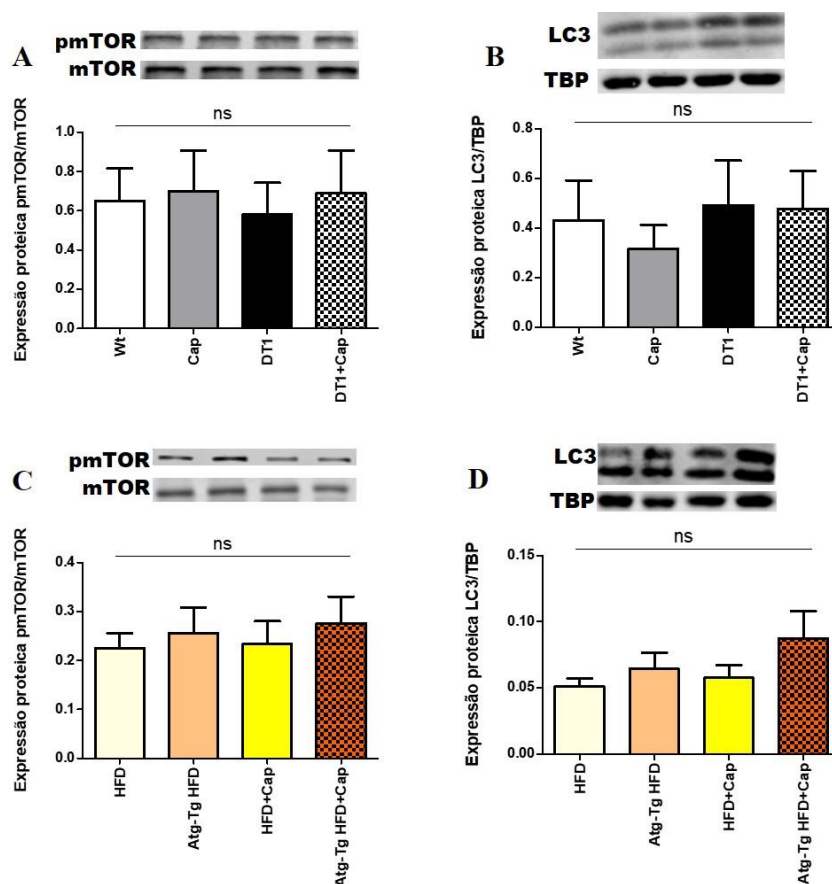


Figura 32. Expressão proteica de pmTOR e LC3 no músculo de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e C: pmTOR no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** LC3 no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão proteica de pmTOR e LC3 foi analisada a partir do homogenato de músculo de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística

4.28 Avaliação da expressão gênica de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril

Observamos aumento na expressão de *Beclin1*, *Atg5*, *Atg7* e *Atg12* no fígado de camundongos DT1 tratados com captopril, em comparação com os camundongos Wt (**Fig. 33A-33D**). De modo interessante, observamos padrão oposto quanto à expressão de *Beclin1*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg12* e *LC3* no fígado de camundongos com obesidade, independentemente de tratamento com captopril ou superexpressão de *Agt* (**Fig. 33G-33L**).

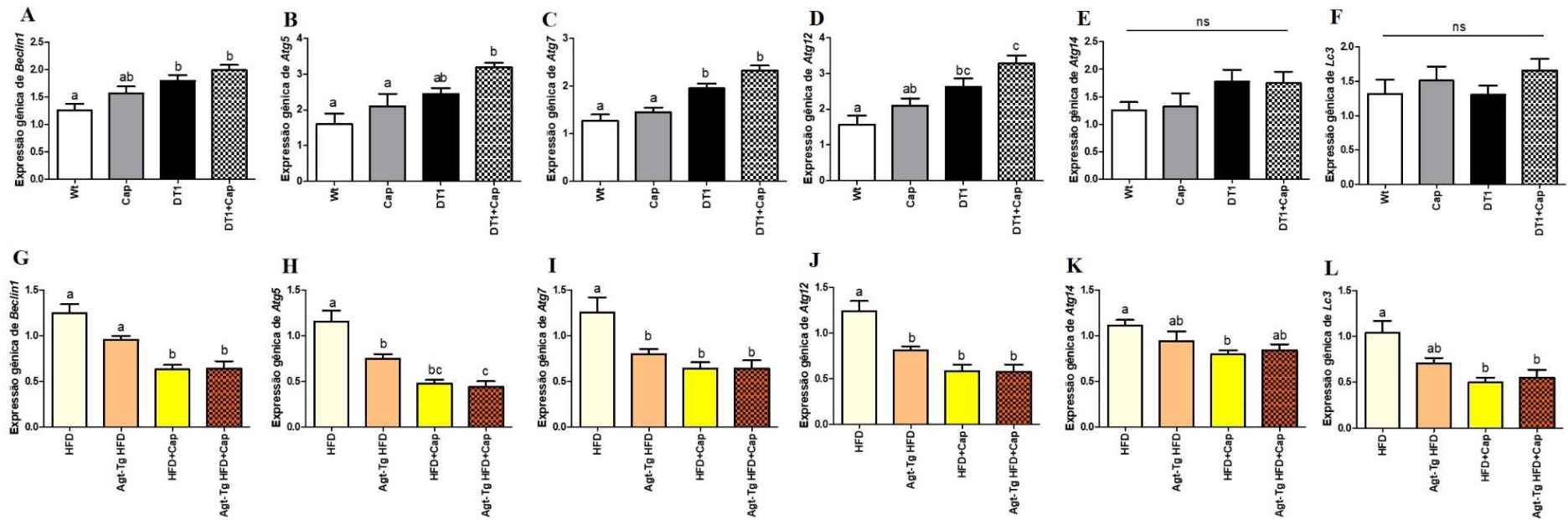


Figura 33. Expressão de marcadores da via da autofagia no fígado de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e G: expressão gênica de *Beclin1*, **B e H:** *Atg5*, **C e I:** *Atg7*, **D e J:** *Atg12*, **E e K:** *Atg14*, **F e L:** *LC3* no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. A expressão gênica dos principais marcadores da via da autofagia foi analisada a partir do homogenato de fígado de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n = 5-6 camundongos por grupo. Os valores são a média ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

4.29 Avaliação da expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos da linhagem C57bl/6 diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril.

Avaliamos os níveis de expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado destes camundongos. Também não observamos nenhuma diferença entre os grupos, tanto em camundongos diabéticos quanto em camundongos obesos (Fig. 34A-34D).

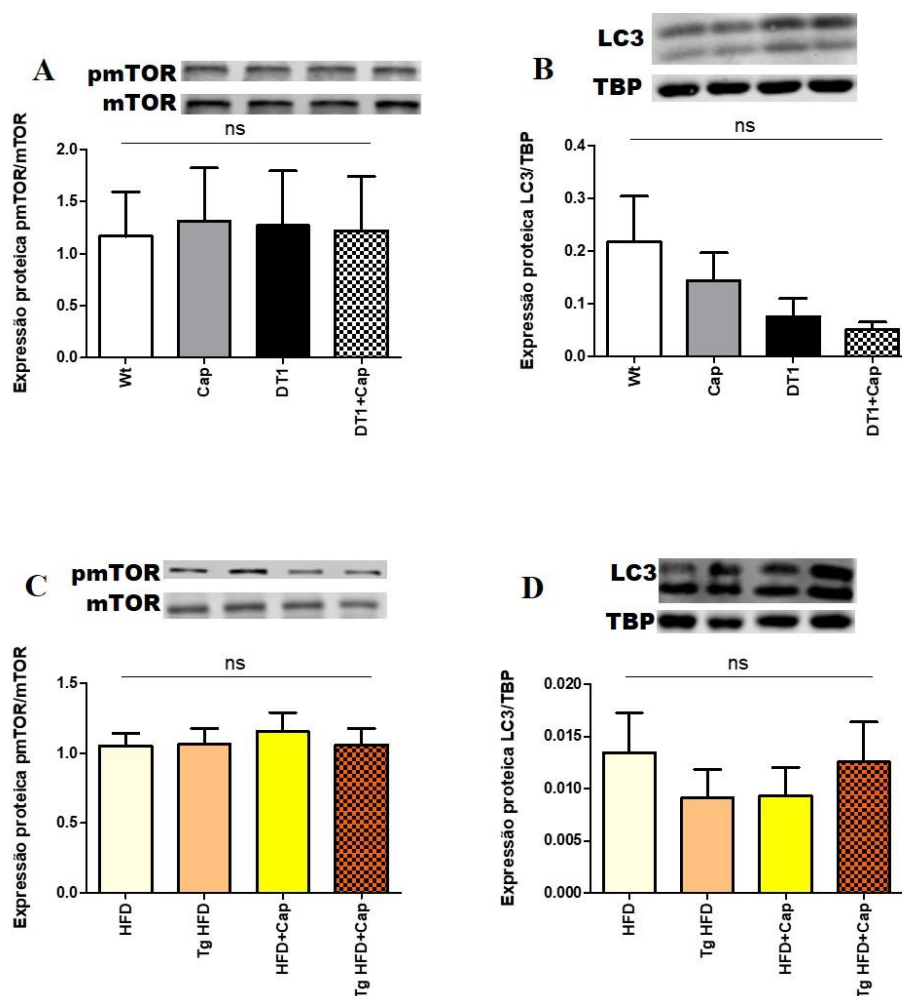


Figura 34. Expressão proteica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos diabéticos ou obesos tratados ou não com captopril. A e C: Expressão proteica de pmTOR no fígado de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. **B e D:** LC3 no músculo de camundongos Wt, Cap, DT1, DT1+Cap, HFD, Agt-Tg HFD, HFD+Cap e Agt-Tg HFD+Cap. expressão proteica de pmTOR e LC3 foi analisada a partir do homogenato de

fígado de camundongos Wt, diabéticos, obesos e obesos Agt-Tg tratados ou não com captopril. n=4-5 camundongos por grupo. Barras com letras iguais não possuem diferença estatística, enquanto barras com letras diferentes apresentam diferença estatística.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, visamos avaliar os possíveis efeitos dos LTs nos camundongos com DT1. Os mecanismos envolvidos na resistência à insulina têm sido bem descritos no DT2, mas, no DT1, esses mecanismos, embora importantes, são menos estudados. Por conta disso, investigamos o envolvimento dos LTs no desenvolvimento de resistência à insulina no músculo. Verificamos que, em camundongos diabéticos, os LTs diminuíram a regulação da via de sinalização da insulina em músculos de animais pré-tratados com insulina. Além disso, a ausência dos LTs alterou o perfil de citocinas associadas ao músculo para um fenótipo anti-inflamatório [47]. Em seguida, avaliamos se efeitos similares aos observados anteriormente também estariam presentes no fígado destes camundongos. Sabendo do risco de pacientes com DT1 desenvolverem doenças cardiovasculares, além da influência das vias da insulina e da autofagia prejudicadas nesta doença, incluímos mais um componente em nosso estudo, o SRA, devido a sua participação e sua importância nestas complicações. Assim, tratamos parte destes animais com captopril, para inibir a atividade da enzima ECA. Após isso, observamos a influência do SRA e suas complicações nos órgãos metabolicamente ativos, músculo e fígado, em camundongos DT1. Com isso, investigamos a resposta/influência da insulina na autofagia e a participação do SRA em camundongos com obesidade, que superexpressam ou não Agt, de modo a compararmos com os achados dos camundongos DT1.

A estreptozotocina (STZ) é um fármaco que foi isolado a partir da bactéria Gram-positiva *Streptomyces achromogenes* [100], possuindo a estrutura de uma molécula de glicosídeo nitrosoureia natural lipofílica e análoga a nitrosoureia animal, com a principal característica de apresentar absorção seletiva para as células β do pâncreas, através dos receptores GLUT2 [101, 102]. Seu mecanismo de ação consiste na capacidade de este fármaco transferir seu grupamento metil para o DNA da célula, resultando na fragmentação do material genético dela, induzindo necrose celular. Além disso, a hiperglicemia crônica consequente da ação da STZ aumenta a resposta inflamatória sistêmica e em órgãos metabolicamente ativos, levando a complicações associadas à doença [102, 103].

Em nosso estudo, o DT1 foi induzido quimicamente usando STZ, devido ao fato de que os efeitos deste fármaco se assemelham aos do DT1 em humanos; além disto, o uso da STZ tornou-se popular como modelo de DT1 em ratos e camundongos [100]. Em 2015, Wu et al. [101] mostraram que uma dose única de STZ, embora não suficiente para induzir resistência à insulina, foi capaz de manter a hiperglicemia. Nós adaptamos o modelo de indução, com cinco doses ao longo de uma semana, devido ao fato do uso de dose única de STZ, em maior concentração, estar associado com maior mortalidade e efeitos adversos. Em contrapartida, o uso prolongado de STZ em doses menores contribui para a diminuição desses possíveis efeitos colaterais [104]. Após a última dose de STZ, observamos que os camundongos perderam peso significativo, embora tenha ocorrido aumento de consumo de ração, insulinemia, polidipsia e poliúria, além de ter ocorrido concentração elevada de glicose no sangue [47].

Ao introduzir o tratamento com captopril, que seria realizado durante 4 semanas, foi necessário investigar se nosso modelo de indução de DT1 seria compatível com este tratamento. Para isso, após verificarmos a glicemia dos camundongos, no 15º. dia, seguimos com o tratamento com captopril nos grupos que iriam receber o fármaco diariamente pelas 4 semanas seguintes. Durante este tempo, continuamos com a pesagem dos animais. Ao longo do processo, observamos que os camundongos DT1 continuaram com peso reduzido, quando comparados aos seus respectivos controles, independentemente da presença dos LTs. Além disso, os camundongos DT1 mantiveram-se hiperglicêmicos, mesmo após as 4 semanas de tratamento.

A via de sinalização da insulina é importante para a manutenção de diversos mecanismos celulares, compartilhando componentes de outras vias em comum como mTOR, AMPK, PKC – dentre outras proteínas fundamentais para o funcionamento das principais vias de sinalização intracelulares envolvidas na síntese de proteínas, na sobrevivência celular e na síntese de glicogênio. Esta via possui ação mais pronunciada em órgãos metabolicamente ativos, como músculo, tecido adiposo e fígado, nos quais a demanda energética é alta e dependente do uso do receptor GLUT4, responsável, nestes tecidos, por transportar a glicose para o meio intracelular. Sua ativação, nestes tecidos, auxilia principalmente na

captação de glicose, na síntese proteica e no aumento do uso da glicose. O mal funcionamento desta via e a hiperglicemia no DT1 também se associam à resposta imunológica prejudicada [105, 106]. Quando o receptor da insulina é ativado, inicia-se a fosforilação de diversos substratos, dentre eles os *irs*, marcando o início da via de sinalização até a fosforilação da AKT. Uma vez fosforilada, a AKT desempenha diversas funções, envolvendo a regulação, a expressão e a atividade de ampla gama de proteínas, incluindo enzimas, fatores de transcrição e proteínas reguladoras do ciclo celular/apoptose, apresentando, portanto, papel central no funcionamento desta via [72, 73].

Em nosso estudo, observamos que os LTs participam da ativação da via de insulina em relação à fosforilação de AKT, contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina [47]. A deficiência na produção de insulina leva ao desequilíbrio nos sistemas regulatórios para o armazenamento e o uso de metabólitos importantes para o funcionamento da célula, levando a anormalidades no catabolismo e no anabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas, afetando principalmente os órgãos metabolicamente ativos e gerando os estados de hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular [107].

Observamos que, após uma única dose de insulina, os camundongos 5LO^{-/-} diabéticos controlaram a glicemia de modo mais eficaz do que os camundongos diabéticos Wt [47]. Li et al. [32] e Spite et al. [13] demonstraram que, no DT2, a ativação do receptor BLT1 de LTB₄, juntamente com a ativação dos receptores de IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos órgãos alvo da insulina, também leva à regulação negativa da cascata do receptor de insulina, bloqueando a ação dos substratos deste receptor e levando à resistência à insulina. Esses autores também observaram que o tratamento com LTB₄ levou à inibição da translocação de GLUT4, reforçando a participação dos LTs não só no bloqueio da ativação das *irs* e na posterior fosforilação de AKT, mas também implicando no estabelecimento de resistência à insulina.

Quando avaliamos os efeitos dos LTs nos músculos desses camundongos DT1, observamos que a fosforilação da AKT no músculo também foi alterada, indicando que, no DT1, os

LTs também influenciam na cascata de sinalização da insulina, o que pode levar ao desenvolvimento de resistência à insulina neste tecido [47]. Observamos que, mesmo com baixa concentração plasmática de insulina, os camundongos 5LO^{-/-} diabéticos exibiram maior expressão gênica do receptor de insulina, em ambos os músculos avaliados; porém, após o tratamento com uma dose de insulina, somente os camundongos 5LO^{-/-} diabéticos restauraram a fosforilação da AKT. Esses dados sugerem que, da mesma forma que ocorre na DT2, os LTs também afetam a cascata de sinalização da insulina no DT1.

Também verificamos a insulinemia desses animais e, como esperado, ela estava reduzida em ambos os grupos, independentemente da presença dos LTs ou do tratamento com captopril. Ao avaliarmos a capacidade de os camundongos Wt e 5LO^{-/-} tratados com captopril controlarem a glicemia, após administrarmos insulina, observamos que os animais DT1 Wt apresentaram dificuldade em reduzir a concentração de glicose plasmática, mesmo com o tratamento com insulina; porém, assim como verificado anteriormente em nosso trabalho [47], os camundongos DT1 5LO^{-/-} reduziram a hiperglicemia – e de modo mais acentuado, no grupo que recebeu o tratamento com o captopril, indicando o possível papel dos LTs na redução da funcionalidade da via de sinalização da insulina, assim como observado em outros estudos [13, 32], neste caso, também no DT1 [47]. Além disso, observamos que o captopril estimula a via de sinalização da insulina [108-111], o que pode ser um fator benéfico para melhorar a sensibilidade à insulina no DT1 e, portanto, tratar a doença.

Estudos indicam que o uso do captopril está relacionado com a melhora no controle glicêmico, bem como com o melhor funcionamento da via de sinalização da insulina [108-111]. Nossos resultados corroboram estes achados na literatura, nos quais a expressão dos genes referentes ao receptor de insulina (*insr* e *irs1*) se apresentou reduzida nos músculos dos camundongos DT1, tanto em Wt quanto 5LO^{-/-}, porém, o tratamento com captopril estimulou o aumento da expressão destes genes, de modo mais acentuado na ausência dos LTs. O *Irs1* é considerado um importante componente que pode indicar a ativação da via de sinalização da insulina e que geralmente é alvo de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos. Sabe-se que, quando essas moléculas se ligam a seus receptores,

desencadeiam o bloqueio de Irs1, levando à fosforilação prejudicada de AKT e impedindo a translocação de GLUT [13, 32].

Seguindo padrão semelhante, observamos o mesmo fenômeno relacionado aos genes que codificam GLUT4 e Ampk, responsáveis pela captação da glicose, pela oxidação de ácidos graxos e pela homeostase energética nos músculos, porém, apenas nos músculos dos camundongos 5LO^{-/-}. Observamos padrão semelhante no fígado destes camundongos, porém, apenas nos camundongos 5LO^{-/-}, indicando que, no caso do fígado, os LTs interferem na expressão dos marcadores desta via, mesmo com o tratamento com captopril. Portanto, o tratamento com captopril pode estimular e auxiliar no funcionamento da via de sinalização da insulina no músculo e no fígado de camundongos com DT1; todavia, a presença dos LTs pode interferir no funcionamento desta via [47]. Não identificamos nenhuma alteração em nível de expressão proteica de AKT e AMPK, proteínas indicativas do funcionamento desta via; contudo, vale ressaltar que estes animais não receberam nenhum tipo de estímulo, como a insulina, por exemplo, como foi feito na primeira parte deste trabalho, o que pode explicar a ausência de alteração na fosforilação destas proteínas. Além disso, sabe-se que esta via na obesidade também encontra-se prejudicada devido aos mediadores inflamatórios produzidos e sua capacidade de alterar esta via [2, 112]. Observamos que o tratamento com captopril aumentou a expressão de *irs1* em músculos de camundongos obesos, com a mesma tendência em músculos de camundongos Agt-Tg obesos. Mas, no fígado de camundongos obesos, o tratamento com captopril não induziu aumento da expressão gênica de genes relacionados à via de sinalização da insulina. O Ampk é outro componente importante da via de sinalização da insulina, promovendo a sensibilidade à insulina [113, 114]. A expressão de Ampk foi aumentada no músculo de camundongos DT1 tratados com captopril. Interessantemente, observamos aumento na expressão de *Ampk* no fígado de camundongos saudáveis tratados com captopril.

Ao contrário do que observamos nos camundongos DT1, o Ampk foi comparável no músculo de camundongos obesos, independentemente do tratamento com captopril ou da superexpressão de Agt. No entanto, no fígado de camundongos Agt-Tg obesos, tratados ou não com captopril, e em camundongos Agt-Tg obesos, a expressão de Ampk diminuiu,

indicando que no fígado destes camundongos, mesmo com a superexpressão de Agt ou com o tratamento com captopril. Esses resultados sugerem que, de modo mais acentuado no DT1, mas também na obesidade, o tratamento com captopril pode ajudar a estimular essa via, que, quando prejudicada, em ambas as doenças, pode contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina.

Tanto no músculo quanto no fígado de camundongos DT1, o tratamento com captopril mostrou-se útil para restaurar a expressão gênica de marcadores importantes relacionados à via de sinalização da insulina que frequentemente estão associados à resistência à insulina. Por outro lado, em camundongos obesos, o efeito oposto foi identificado no fígado, mas não no músculo, sugerindo que o mesmo tratamento pode estimular respostas diferentes, em doenças semelhantes.

Estudos observaram que a indução de diabetes com STZ em animais aumentou a concentração sérica de LTs, além disso, a urina de pacientes com DT1 possui LTs em sua composição [115, 116]. Os LTs induzem a ativação de NFκB, o que leva à produção de outros mediadores inflamatórios por macrófagos no DT1 e em outras doenças inflamatórias [58]. Assim, Ramalho et al. 2018 [56] demonstraram, em seu trabalho, que os LTs promovem a inflamação sistêmica no DT1, visto que concentrações aumentadas de TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-10 foram encontradas no plasma de camundongos diabéticos capazes de produzir leucotrienos; em contraste, a concentração destas citocinas foi menos intensa em camundongos 5LO^{-/-} DT1, quando comparados com os Wt DT1. Além disso, foi demonstrado que, em macrófagos peritoneais de camundongos DT1 5LO^{-/-}, a expressão de marcadores anti-inflamatórios de macrófagos (*Arg1*, *Ym1*) foi aumentada, enquanto os macrófagos Wt expressaram níveis mais altos de marcadores pró-inflamatórios. Tais fenômenos indicam um papel importante dos LTs no estabelecimento da inflamação sistêmica no diabetes e na reprogramação de macrófagos. Foi descrito que, no tecido muscular estriado esquelético, incluindo o quadríceps e o gastrocnêmio, o DT2 induz a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e a redução nos níveis de IL-10 [117]. Nossos resultados mostram que este fenômeno também ocorreu nos músculos de camundongos com DT1. Além disso, observamos que camundongos DT1 incapazes de produzir LTs

(5LO^{-/-}) produziram uma quantidade maior da citocina anti-inflamatória IL-10 [47]. Kim et al. [118] mostraram que a IL-6 diminuiu a ação e a sinalização da insulina no músculo esquelético, o que corrobora nossos resultados, mostrando que a maior expressão de IL-6 foi correlacionada com a menor expressão do receptor de insulina e fosforilação de AKT nos músculos de camundongos diabéticos WT. Hong et al. [117] mostraram, em um modelo de resistência à insulina induzida por dieta, que o tratamento com IL-10 preveniu a resistência à insulina e aumentou a fosforilação da AKT.

Esses achados são semelhantes aos encontrados nos músculos dos camundongos 5LO^{-/-} diabéticos, em nosso estudo, no qual foram observados níveis aumentados de expressão proteica de pAKT e níveis aumentados da produção de IL-10 [47]. Também observamos que tanto no quadríceps quanto no gastrocnêmio de camundongos 5LO^{-/-}, houve aumento inesperado na expressão de Mcp1, e portanto, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo por trás deste efeito observado, já que alguns estudos mostram que, no bloqueio ou *knockout* da 5LO, ocorre a diminuição desta quimiocina [119, 120]. Contudo, observamos nos músculos dos camundongos DT1 5LO^{-/-} diminuição na expressão de Mcp1, indicando que no DT1, a ausência de leucotrienos contribui com a diminuição da expressão desta quimiocina, juntamente com o aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como Ym1 e Arg1, contribuindo para o estabelecimento de um perfil anti-inflamatório neste tecido. Observou-se, ainda, que os LTs possuem papel importante na (1) inflamação de baixo grau, nos músculos de camundongos DT1; na (2) regulação negativada da via do receptor de insulina, nos músculos dos camundongos DT1; e no (3) estabelecimento de um perfil anti-inflamatório no músculo de camundongos DT1, quando ausentes [47].

Além das citocinas pró-inflamatórias e dos LTs, outros mediadores lipídicos, adipocinas e/ou hormônios importantes para o estabelecimento da fisiopatologia do DT1 foram avaliados. Neste sentido, avaliamos a produção das principais adipocinas no plasma dos nossos grupos de camundongos. Estudos identificaram que pacientes com DT1 podem apresentar concentrações elevadas de TGs e NEFA, dentre outras adipocinas, o que pode ser prejudicial quanto ao aumento da resposta inflamatória no DT1 [10, 121-124].

Curiosamente, observamos que os camundongos $5LO^{-/-}$ apresentaram concentrações maiores, tanto de TGs quanto de NEFA, em camundongos DT1, sendo que o tratamento com captopril contribuiu na redução apenas de NEFA no plasma destes camundongos. Em outras palavras, ao mesmo tempo que a ausência dos LTs relacionou-se com o aumento desses lipídeos, a ausência dos LTs também contribuiu para melhor eficácia do tratamento com o captopril para a redução de NEFA.

A leptina e a resistina são hormônios relacionados com o controle do apetite [125-127]. Um achado interessante foi que os camundongos DT1, independentemente do tratamento com captopril, apresentaram concentrações reduzidas destes hormônios – e isto pode estar relacionado com o porquê de os camundongos DT1 apresentarem polifagia durante e após o protocolo de indução com STZ, devido à falta destes dois hormônios envolvidos no processo de saciedade. No DT1, a perda de peso é uma característica comum; relacionado a isso, observamos que nossos camundongos DT1 apresentavam quantidade reduzida de tecido adiposo, o que pode explicar as quantidades reduzidas destes hormônios, que são produzidos por este tecido [128, 129]. Vale ressaltar que camundongos DT1 apresentam polifagia, o que pode ser explicado pela demanda energética nestes animais, devido à capacidade reduzida de capturar glicose por déficit de insulina e/ou devido à ação da leptina e da resistina, envolvidas na regulação do apetite [130]. De fato, camundongos DT1 apresentam baixa quantidade de tecido adiposo e, portanto, baixa produção de leptina e resistina [131].

Não encontramos nenhuma diferença quanto à concentração plasmática de IL-6. Alguns estudos descreveram que a IL-6 pode não estar alterada em pacientes com DT1 durante os estágios iniciais da doença. Vale ressaltar que, em nosso estudo, os camundongos foram observados 30 dias após a confirmação do diabetes, o que pode explicar porque a IL-6 não foi diferente entre os grupos [132, 133]. Este fator também pode ser explicado pela falta de tecido adiposo em camundongos DT1 e DT1 tratados com captopril, já que esse tecido também é responsável pela produção de IL-6 [134, 135].

Observamos a diminuição nas concentrações plasmáticas de adiponectina em camundongos DT1 e DT1 tratados com captopril, nocautes para LTs. A baixa concentração desta adipocina pode ser relacionada com a resistência à insulina [136, 137]. O tratamento com captopril em camundongos 5LO^{-/-} DT1 não foi suficiente para resgatar a concentração plasmática desta adipocina, porém mais estudos relacionados a estes hormônios são necessários, uma vez que a sinergia entre adiponectina e leptina, dentre outros, pode influenciar na resposta à insulina, de modo que esses hormônios não devem ser analisados individualmente. Outra hipótese que pode explicar estes resultados são que este hormônio também é produzido pelo tecido adiposo [138]; portanto, devemos considerar que o fato dos nossos camundongos DT1 apresentarem redução considerada desse tecido – que foi notada de modo ainda mais intenso nos camundongos 5LO^{-/-} – pode explicar a sua concentração reduzida.

Além do mais, a superexpressão de Agt no tecido adiposo contribuiu para o aumento da concentração plasmática de Agt e leptina juntamente com o aumento do peso do tecido adiposo, em comparação com camundongos Wt, mas as concentrações plasmáticas de insulina, adiponectina e resistina (além de outras adipocinas) não mudaram, sugerindo que, em camundongos Agt-Tg tratados com dieta com baixo teor de gordura, a superexpressão de Agt não interferiu diretamente na produção de adipocinas [63]. Observamos aumento relativo na expressão do gene que codifica este precursor da angiotensina II, tanto no músculo quanto no fígado dos camundongos DT1 tratados com captopril, em que esta expressão parece ser independente da presença dos LTs, uma vez que o nível de expressão deste gene mostrou-se similar entre ambos os grupos de camundongos Wt e 5LO^{-/-}. Interessantemente, observamos padrão semelhante em relação aos níveis de expressão gênica do *At1*, gene responsável por codificar o receptor que se liga à angiotensina II, no músculo destes camundongos, independentemente da presença dos LTs, porém, o mesmo não se aplicou ao fígado de camundongos 5LO^{-/-}, indicando possível função dos LTs no fígado quanto à expressão de *At1*.

O tratamento dos camundongos DT1 com captopril aumentou os níveis de ambos os genes *Agt* e *At1*. Como o captopril tem a capacidade de bloquear a conversão de AngI em AngII,

esperávamos certa diminuição da expressão desses genes, mas o bloqueio da ECA pode ativar alternativamente outras vias que levam à produção de Ang II [139, 140]. Porém, esse aumento na expressão gênica também pode ser explicado por um mecanismo de retroalimentação positivo, uma vez que a conversão de Agt em AngII está sendo bloqueada pela ação do captopril sobre a ECA, não representando exatamente o aumento desses componentes em nível proteico.

Também identificamos que o músculo de camundongos obesos Agt-Tg tratados com captopril apresentou expressão aumentada de *Agt*. Outra observação interessante foi que a expressão gênica de marcadores do SRA, em camundongos obesos Agt-Tg, tratados ou não com captopril, foi diminuída em comparação com camundongos obesos. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que, no músculo e no fígado de camundongos DT1, tratados ou não com captopril, há aumento da expressão de genes do SRA, mas o efeito oposto foi observado no músculo e no fígado de camundongos obesos Agt-Tg e que foram tratados com captopril. Desta forma, os mecanismos envolvidos na regulação dos genes do SRA junto ao tratamento com captopril podem ser diferentes entre o DT1 e a obesidade.

A autofagia é um importante processo de homeostase celular durante períodos de estresse celular, além de auxiliar nos processos de reciclagem de organelas e outros componentes presentes no citoplasma [141] que, quando prejudicados, podem levar ao acúmulo de lipídeos, resistência à insulina e estresse do retículo endoplasmático (RE), entre outras disfunções [141, 142]. No fígado, a diminuição da atividade autofágica está ligada à resistência à insulina, ao estresse do RE e ao acúmulo de lipídeos [88], enquanto no músculo o mesmo padrão é observado quando a atividade autofágica é aumentada [143, 144], ou seja, dependendo do tecido, o aumento ou a diminuição da atividade autofágica pode ser benéfico ou prejudicial para o tecido. Em pacientes obesos e diabéticos, foi relatada expressão aumentada de marcadores de autofagia, como *Atg5* e *LC3* [145].

No diabetes, sabe-se que, quando o processo de autofagia é prejudicado, ele pode contribuir para a resistência à insulina, participando assim na cronicidade do quadro de hiperglicemia nos pacientes [143, 146, 147]. Observamos que, em camundongos 5LO^{-/-} DT1, houve

diminuição da expressão de *Atg12* e *LC3*, indicando que a presença dos LTs pode interferir na funcionalidade desta via. Vale ressaltar que este processo, tanto ativado em excesso, quanto com atividade reduzida, pode gerar complicações e que, portanto, o aumento na expressão destes genes, nos camundongos 5LO^{-/-} DT1 tratados com captopril, não indica necessariamente atividade prejudicial desta via. Além disto, foi possível observar que os níveis de expressão destes genes nos músculos dos camundongos 5LO^{-/-} foi menor quando comparados com os níveis dos camundongos Wt. Ao avaliarmos os níveis de expressão destes marcadores no fígado destes camundongos, observamos que, em alguns casos, houve aumento da expressão em camundongos DT1 tratados com captopril e que, no caso deste órgão, diferentemente do que observamos nos músculos destes animais, aparentemente a ativação desta via ocorre independentemente da presença de LTs. A redução da atividade da autofagia no fígado está associada com o aumento do acúmulo de lipídeos, com o estresse oxidativo e com a resistência à insulina; portanto, neste caso, o aumento da expressão destes marcadores no fígado pode ser benéfico.

Em ambos os modelos de animais do presente estudo, a ausência de insulina, devido ao DT1, ou a resistência à insulina, conferida pela obesidade, podem ser uma das razões pelas quais os marcadores de autofagia encontram-se desequilibrados, tanto no músculo quanto no fígado de camundongos DT1 e obesos. Observamos aumento da expressão gênica de *Beclin1* e *LC3* no músculo de camundongos DT1 tratados com captopril, ao passo que, no músculo de camundongos obesos, tratados ou não com captopril, independentemente da superexpressão de *Agt*, não foram observadas diferenças substanciais nos níveis de expressão destes genes. Todavia, no fígado, observamos que o tratamento com captopril em camundongos DT1 aumentou alguns marcadores de autofagia, o que, neste órgão, poderia ser um indicativo positivo, em relação ao processo de autofagia prejudicado no fígado e suas consequências [88]. Esses resultados indicam que o captopril induziu algumas alterações quanto ao aumento, de modo mais evidenciado, no DT1, ou à diminuição, de modo mais evidenciado, na obesidade, na expressão gênica dos marcadores relacionados à via da autofagia – e que essas alterações variam com o tecido no DT1 e na obesidade.

Nossos resultados em conjunto indicam que o bloqueio da ECA pode regular o SRA e as vias da insulina e da autofagia, tanto no músculo quanto no fígado, indicando um possível papel na sensibilidade à insulina e na ativação da autofagia. O melhor entendimento desses mecanismos moleculares sinaliza que essas vias são prováveis alvos terapêuticos, numa tentativa de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com obesidade ou com diabetes, bem como reduzir os gastos públicos decorrentes das complicações dessas doenças.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Concluimos, com este trabalho, que os LTs possuem papel fundamental quanto ao desenvolvimento da resistência à insulina no músculo e no fígado de camundongos com DT1. Além disso, observamos que o bloqueio da ECA restaurou a expressão gênica de vários marcadores da via de sinalização da insulina, bem como de marcadores referentes ao funcionamento da via da autofagia nesses tecidos, tanto no DT1 quanto na obesidade, indicando um possível papel do bloqueio da ECA na sensibilidade à insulina e na ativação da autofagia nessas doenças.

7. REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
2. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2169-80.
3. Navab, M., N. Gharavi, and A.D. Watson, *Inflammation and metabolic disorders*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(4): p. 459-64.
4. Federation, I.D., *Diabetes Atlas, 9th edition*, in *International Diabetes Federation Atlas*. 2019, World Health Organization (2019).
5. Organization, W.H. *Obesity and overweight*. 2020 01/05/2020]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
6. DIABETES, S.B.D., *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020*. Clannad, 2019.
7. Reusch, J.E., *Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 2002. **90**(5A): p. 19G-26G.
8. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
9. Daneman, D., *Type 1 diabetes*. Lancet, 2006. **367**(9513): p. 847-58.
10. Cleland, S.J., et al., *Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks?* Diabetologia, 2013. **56**(7): p. 1462-70.
11. van Greevenbroek, M.M., C.G. Schalkwijk, and C.D. Stehouwer, *Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences*. Neth J Med, 2013. **71**(4): p. 174-87.
12. Natali, A., et al., *Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1133-40.
13. Spite, M., et al., *Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity*. J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1942-9.
14. Bluher, M., *Obesity: global epidemiology and pathogenesis*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(5): p. 288-298.
15. Rasouli, N. and P.A. Kern, *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S64-73.
16. Yudkin, J.S., *Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome*. Horm Metab Res, 2007. **39**(10): p. 707-9.
17. Bianchini, F., R. Kaaks, and H. Vainio, *Overweight, obesity, and cancer risk*. Lancet Oncol, 2002. **3**(9): p. 565-74.
18. Scheen, A.J., *From obesity to diabetes: why, when and who?* Acta Clin Belg, 2000. **55**(1): p. 9-15.
19. Corbin, K.D., et al., *Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms*. Endocr Rev, 2018. **39**(5): p. 629-663.
20. Tessaro, F.H., T.S. Ayala, and J.O. Martins, *Lipid mediators are critical in resolving inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 568408.
21. Bergman, B.C., et al., *Features of hepatic and skeletal muscle insulin resistance unique to type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(5): p. 1663-72.
22. Kaul, K., M. Apostolopoulou, and M. Roden, *Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus*. Metabolism, 2015. **64**(12): p. 1629-39.
23. Arkkila, P.E., et al., *Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2001. **52**(2): p. 113-8.

24. Regnell, S.E. and A. Lernmark, *Hepatic steatosis in type 1 diabetes*. Rev Diabet Stud, 2011. **8**(4): p. 454-67.
25. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
26. Marchesini, G., et al., *Obesity-associated liver disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S74-80.
27. Hulver, M.W., et al., *Skeletal muscle lipid metabolism with obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(4): p. E741-7.
28. Rios, F.J., N. Moustaid-Moussa, and J.O. Martins, *Interplay between Hormones, the Immune System, and Metabolic Disorders*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 8654212.
29. Bowman-Colin, C., L.A. Salazar, and J.O. Martins, *The Role of Endocrine System in the Inflammatory Process*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 6081752.
30. Carvalho, L.A., et al., *Interplay between the Endocrine System and Immune Cells*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 986742.
31. Ramos, P.A., et al., *Insulin-Stimulated Muscle Glucose Uptake and Insulin Signaling in Lean and Obese Humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2021. **106**(4): p. e1631-e1646.
32. Li, P., et al., *LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes*. Nat Med, 2015. **21**(3): p. 239-247.
33. Boon, J., et al., *Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance*. Diabetes, 2013. **62**(2): p. 401-10.
34. Wu, H. and C.M. Ballantyne, *Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 43-54.
35. Mendes-Braz, M. and J.O. Martins, *Diabetes Mellitus and Liver Surgery: The Effect of Diabetes on Oxidative Stress and Inflammation*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 2456579.
36. Nolasco, E.L., et al., *Insulin Modulates Liver Function in a Type I Diabetes Rat Model*. Cell Physiol Biochem, 2015. **36**(4): p. 1467-79.
37. Fabbrini, E., S. Sullivan, and S. Klein, *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 679-89.
38. Kotronen, A., et al., *Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 122-30.
39. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 177-81.
40. Fujimoto, M., et al., *A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1340-8.
41. Pereira, S.S. and J.I. Alvarez-Leite, *Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes*. Curr Obes Rep, 2014. **3**(4): p. 422-31.
42. Heilbronn, L.K. and L.V. Campbell, *Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(12): p. 1225-30.
43. Llauro, G., et al., *Insulin resistance, low-grade inflammation and type 1 diabetes mellitus*. Acta Diabetol, 2012. **49**(1): p. 33-9.
44. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
45. Alexandraki, K.I., et al., *Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation*. J Clin Immunol, 2008. **28**(4): p. 314-21.
46. Filgueiras, L.R., et al., *Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes*. Sci Signal, 2015. **8**(361): p. ra10.

47. Guimaraes, J.P.T., et al., *Leukotriene Involvement in the Insulin Receptor Pathway and Macrophage Profiles in Muscles from Type 1 Diabetic Mice*. *Mediators Inflamm*, 2019. **2019**: p. 4596127.
48. Ramalho, T., et al., *Leukotriene-B4 modulates macrophage metabolism and fat loss in type 1 diabetic mice*. *J Leukoc Biol*, 2019. **106**(3): p. 665-675.
49. Tessaro, F.H.G., et al., *Insulin Influences LPS-Induced TNF-alpha and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **42**(5): p. 2093-2104.
50. Galvao Tessaro, F.H., et al., *Macrophages from a type 1 diabetes mouse model present dysregulated PI3K/AKT, ERK 1/2 and SAPK/JNK levels*. *Immunobiology*, 2020. **225**(2): p. 151879.
51. Peters-Golden, M. and W.R. Henderson, Jr., *Leukotrienes*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(18): p. 1841-54.
52. Camara, N.O., et al., *Emerging roles for eicosanoids in renal diseases*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(1): p. 21-7.
53. Filgueiras, L.R., C.H. Serezani, and S. Jancar, *Leukotriene B4 as a Potential Therapeutic Target for the Treatment of Metabolic Disorders*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 515.
54. Pardo, V., et al., *Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(18): p. 11663-77.
55. Mothe-Satney, I., et al., *Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice*. *Diabetes*, 2012. **61**(9): p. 2311-9.
56. Ramalho, T., et al., *Impaired wound healing in type 1 diabetes is dependent on 5-lipoxygenase products*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 14164.
57. Sunahara, K.K. and J.O. Martins, *Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes?* *J Leukoc Biol*, 2012. **91**(6): p. 871-6.
58. Serezani, C.H., et al., *Leukotriene B4 amplifies NF-kappaB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(2): p. 671-82.
59. Conget Donlo, I. and M. Gimenez Donlo, *[Cardiovascular disease in type 1 diabetes mellitus. More than single chance]*. *Med Clin (Barc)*, 2013. **141**(11): p. 482-3.
60. Sowers, J.R., *Obesity as a cardiovascular risk factor*. *Am J Med*, 2003. **115 Suppl 8A**: p. 37S-41S.
61. Putnam, K., et al., *The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(6): p. H1219-30.
62. Heel, R.C., et al., *Captopril: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy*. *Drugs*, 1980. **20**(6): p. 409-52.
63. Kalupahana, N.S., et al., *Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. **20**(1): p. 48-56.
64. Kalupahana, N.S. and N. Moustaid-Moussa, *The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance*. *Obes Rev*, 2012. **13**(2): p. 136-49.
65. Ramalingam, L., et al., *The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(5): p. 1106-1114.
66. de Kloet, A.D., E.G. Krause, and S.C. Woods, *The renin angiotensin system and the metabolic syndrome*. *Physiol Behav*, 2010. **100**(5): p. 525-34.
67. Miller, J.A., *Impact of hyperglycemia on the renin angiotensin system in early human type 1 diabetes mellitus*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(8): p. 1778-85.
68. Burns, K.D., et al., *The relationship between urinary renin-angiotensin system markers, renal function, and blood pressure in adolescents with type 1 diabetes*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017. **312**(2): p. F335-F342.

69. Harindhanavudhi, T., et al., *Benefits of Renin-Angiotensin blockade on retinopathy in type 1 diabetes vary with glycemic control*. Diabetes Care, 2011. **34**(8): p. 1838-42.
70. Segura, J. and L.M. Ruilope, *Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system*. Public Health Nutr, 2007. **10**(10A): p. 1151-5.
71. Cassis, L.A., et al., *Local adipose tissue renin-angiotensin system*. Curr Hypertens Rep, 2008. **10**(2): p. 93-8.
72. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
73. Haeusler, R.A., T.E. McGraw, and D. Accili, *Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(1): p. 31-44.
74. Sunahara, K.K., et al., *Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments*. Cell Physiol Biochem, 2014. **34**(6): p. 2017-26.
75. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1)*. Autophagy, 2021. **17**(1): p. 1-382.
76. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
77. Dandona, P., A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 4-7.
78. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux*. J Clin Invest, 2016. **126**(1): p. 12-22.
79. Kubota, T., et al., *Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle*. Cell Metab, 2011. **13**(3): p. 294-307.
80. Leng, Y., H.K. Karlsson, and J.R. Zierath, *Insulin signaling defects in type 2 diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2004. **5**(2): p. 111-7.
81. Frojdo, S., H. Vidal, and L. Pirola, *Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(2): p. 83-92.
82. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
83. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
84. Menikdiwela, K.R., et al., *Autophagy in metabolic syndrome: breaking the wheel by targeting the renin-angiotensin system*. Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 87.
85. Lavallard, V.J., et al., *Autophagy, signaling and obesity*. Pharmacol Res, 2012. **66**(6): p. 513-25.
86. Moulis, M. and C. Vindis, *Autophagy in Metabolic Age-Related Human Diseases*. Cells, 2018. **7**(10).
87. Yamamoto, S., et al., *Autophagy Differentially Regulates Insulin Production and Insulin Sensitivity*. Cell Rep, 2018. **23**(11): p. 3286-3299.
88. Yang, L., et al., *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance*. Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 467-78.
89. Muralidharan, C., et al., *Pancreatic beta cell autophagy is impaired in type 1 diabetes*. Diabetologia, 2021. **64**(4): p. 865-877.
90. Kovsan, J., et al., *Altered autophagy in human adipose tissues in obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(2): p. E268-77.
91. Singh, R., et al., *Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3329-39.
92. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 282041.
93. Porrello, E.R., et al., *Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 1032-40.
94. Dai, D.F., et al., *Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure*. Circ Res, 2011. **108**(7): p. 837-46.

95. Lin, L., et al., *Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress.* J Cell Mol Med, 2016. **20**(1): p. 48-57.
96. Mao, N., et al., *Ginsenoside Rg1 inhibits angiotensin II-induced podocyte autophagy via AMPK/mTOR/PI3K pathway.* Cell Biol Int, 2016. **40**(8): p. 917-25.
97. Chen, F., et al., *Autophagy protects against senescence and apoptosis via the RAS-mitochondria in high-glucose-induced endothelial cells.* Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(4): p. 1058-74.
98. Jiang, T., et al., *Angiotensin-(1-7) inhibits autophagy in the brain of spontaneously hypertensive rats.* Pharmacol Res, 2013. **71**: p. 61-8.
99. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.* Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
100. Furman, B.L., *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats.* Curr Protoc Pharmacol, 2015. **70**: p. 5 47 1-5 47 20.
101. Wu, J. and L.J. Yan, *Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity.* Diabetes Metab Syndr Obes, 2015. **8**: p. 181-8.
102. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.* Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
103. Samarghandian, S., M. Azimi-Nezhad, and F. Samini, *Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 920857.
104. Wilson, G.L. and E.H. Leiter, *Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes.* Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **156**: p. 27-54.
105. Sunahara, K.K., P. Sannomiya, and J.O. Martins, *Briefs on insulin and innate immune response.* Cell Physiol Biochem, 2012. **29**(1-2): p. 1-8.
106. Casagrande, F.B., et al., *Insulin Modulates Inflammatory Cytokine Release in Acute Stages and Augments Expression of Adhesion Molecules and Leukocytes in Lungs on Chronic Stages of Paracoccidioidomycosis.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 583385.
107. Kharroubi, A.T. and H.M. Darwish, *Diabetes mellitus: The epidemic of the century.* World J Diabetes, 2015. **6**(6): p. 850-67.
108. Jauch, K.W., et al., *Captopril enhances insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Eur J Clin Invest, 1987. **17**(5): p. 448-54.
109. Lithell, H.O., T. Pollare, and C. Berne, *Insulin sensitivity in newly detected hypertensive patients: influence of captopril and other antihypertensive agents on insulin sensitivity and related biological parameters.* J Cardiovasc Pharmacol, 1990. **15 Suppl 5**: p. S46-52.
110. Ferriere, M., et al., *Captopril and insulin sensitivity.* Ann Intern Med, 1985. **102**(1): p. 134-5.
111. Donnelly, R., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes, and heart failure.* J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 11**: p. S38-44.
112. Wu, H. and C.M. Ballantyne, *Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity.* Circ Res, 2020. **126**(11): p. 1549-1564.
113. Long, Y.C., et al., *Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(3): p. 430-41.
114. Ruderman, N.B., et al., *AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome.* J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2764-72.
115. Talahalli, R., et al., *Increased synthesis of leukotrienes in the mouse model of diabetic retinopathy.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(3): p. 1699-708.

116. Boizel, R., et al., *Regulation of oxidative stress and inflammation by glycaemic control: evidence for reversible activation of the 5-lipoxygenase pathway in type 1, but not in type 2 diabetes*. Diabetologia, 2010. **53**(9): p. 2068-70.
117. Hong, E.G., et al., *Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2525-35.
118. Kim, H.J., et al., *Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1060-7.
119. Guimaraes, F.R., et al., *The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B4 (LTB4) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing*. Clin Immunol, 2018. **190**: p. 74-83.
120. Monteiro, A.P., et al., *Pivotal role of the 5-lipoxygenase pathway in lung injury after experimental sepsis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 87-95.
121. Kershner, A.K., et al., *Lipid abnormalities are prevalent in youth with type 1 and type 2 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth Study*. J Pediatr, 2006. **149**(3): p. 314-9.
122. Hadjadj, S., et al., *Serum triglycerides are a predictive factor for the development and the progression of renal and retinal complications in patients with type 1 diabetes*. Diabetes Metab, 2004. **30**(1): p. 43-51.
123. Williams, K.V., et al., *Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes?* Diabetes, 2000. **49**(4): p. 626-32.
124. Davis, S.N., S. Fowler, and F. Costa, *Hypoglycemic counterregulatory responses differ between men and women with type 1 diabetes*. Diabetes, 2000. **49**(1): p. 65-72.
125. Yadav, V.K., et al., *A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure*. Cell, 2009. **138**(5): p. 976-89.
126. Zieba, D.A., W. Biernat, and J. Barc, *Roles of leptin and resistin in metabolism, reproduction, and leptin resistance*. Domest Anim Endocrinol, 2020. **73**: p. 106472.
127. Stepien, M., et al., *Serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, ghrelin and insulin and their association with obesity indices in obese normo- and hypertensive patients - pilot study*. Arch Med Sci, 2012. **8**(3): p. 431-6.
128. Klein, S., et al., *Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans*. Diabetes, 1996. **45**(7): p. 984-7.
129. Qatanani, M., et al., *Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 531-9.
130. R, A., R.P. K, and S.S. K, *Leptin: A biomolecule for enhancing livestock productivity* Indian Journal of Biotechnology 2009. **8**: p. 7.
131. Havel, P.J., *Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(3): p. 359-71.
132. Alnek, K., et al., *Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0142976.
133. Heier, M., et al., *Inflammation in childhood type 1 diabetes; influence of glycemic control*. Atherosclerosis, 2015. **238**(1): p. 33-7.
134. Saraheimo, M., et al., *Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients*. Diabetologia, 2003. **46**(10): p. 1402-7.
135. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 349-56.
136. Mojiminiyi, O.A., et al., *Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(2): p. 213-20.
137. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1784-92.

138. Hoffstedt, J., et al., *Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1391-6.
139. Becari, C., E.B. Oliveira, and M.C. Salgado, *Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(9): p. 914-9.
140. Ferrario, C.M., et al., *Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7)*. Adv Pharmacol, 2010. **59**: p. 197-233.
141. Yu, L., Y. Chen, and S.A. Tooze, *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 207-215.
142. Saha, S., et al., *Autophagy in health and disease: A comprehensive review*. Biomed Pharmacother, 2018. **104**: p. 485-495.
143. Zhang, N., et al., *Autophagy regulates insulin resistance following endoplasmic reticulum stress in diabetes*. J Physiol Biochem, 2015. **71**(2): p. 319-27.
144. Shi, L., et al., *Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **409**: p. 92-102.
145. Alers, S., et al., *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 2-11.
146. Barlow, A.D. and D.C. Thomas, *Autophagy in diabetes: beta-cell dysfunction, insulin resistance, and complications*. DNA Cell Biol, 2015. **34**(4): p. 252-60.
147. Gonzalez, C.D., et al., *The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus*. Autophagy, 2011. **7**(1): p. 2-11.

8. APÊNDICES

Ficha do aluno, artigo publicado durante o doutorado e valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) dos resultados apresentados nesta tese.



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
FICHA DO ALUNO

42133 - 10507810/1 - João Pedro Tórres Guimarães

Email: joaopedro@icb.usp.br
Data de Nascimento: 18/02/1993
Cédula de Identidade: RG - 4832224 - GO
Local de Nascimento: Estado de Goiás
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade Federal de Goiás - Goiás - Brasil - 2015
Mestrado: Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública - Área de Concentração: Imunologia (1) - Universidade Federal de Goiás - Goiás - Brasil - 2017

Curso: Doutorado
Programa: Imunologia
Data de Matrícula: 22/06/2017
Início da Contagem de Prazo: 22/06/2017
Data Limite para o Depósito: 22/02/2022
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sonia Jancar Negro - 22/06/2017 até 25/10/2017. Email: sojancar@icb.usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 10/10/2017 até 25/10/2017. Email: martinsj@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 26/10/2017 até 07/07/2021. Email: martinsj@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Sonia Jancar Negro - 26/10/2017 até 07/07/2021. Email: sojancar@icb.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 22/06/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/03/2019
Estágio no Exterior: Texas Tech University, Estados Unidos da América - Período de 01/12/2019 até 30/11/2020
Data do Depósito do Trabalho: 26/05/2021
Título do Trabalho: "Avaliação do efeito dos leucotrienos e do sistema renina-angiotensina em órgãos metabolicamente ativos de camundongos com diabetes do tipo 1 e obesidade"
Data Máxima para Aprovação da Banca: 12/07/2021
Data de Aprovação da Banca: 08/06/2021
Data Máxima para Defesa: 21/09/2021
Data da Defesa: 07/07/2021
Resultado da Defesa: Aprovado
Acesso à dissertação/tese: 'Banco de Teses da USP'
A titulação é: Somente USP
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 22/06/2017
Mudança de Nível/Curso em 05/07/2017
Titulado em 07/07/2021

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Titulado em 07/07/2021



**Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

FICHA DO ALUNO

42133 - 10507810/1 - João Pedro Tôrres Guimarães

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5902-1/1	Interações Imuno-Metabólicas	03/08/2017	09/11/2017	60	4	80	A	N	Concluída
BMI5863-9/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia II	17/08/2017	29/11/2017	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5764-1/1	Hormônios e Processos Inflamatórios	02/04/2018	22/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "Leukotriene involvement in the insulin receptor pathway and macrophage profiles in muscles from type 1 diabetic mice", no periódico Mediators of Inflammation, páginas 1-8, volume 2019, Egito (2)	28/01/2019	28/01/2019	-	6	-	-	-	-
BMI5881-6/2	Regulação da Resposta Imune	11/03/2019	05/05/2019	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	12	24	26
Estágios:			
Total:	12	24	26

Créditos Atribuídos à Tese: 136

Observações:

- 1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012.
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 12/02/2019

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Titulado em 07/07/2021

Impresso em: 16/07/2021 13:41:50

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

FICHA DO ALUNO

42133 - 10507810/1 - João Pedro Tôrres Guimarães

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2221164	Joilson de Oliveira Martins	FCF - USP	Presidente
51428	Jose Alexandre Marzagao Barbuto	ICB - USP	
12636311	Rosália Santos Amorim Jesuino	UFG - Externo	
642618	Ana Cristina Breithaupt Faloppa	HCFMUSP(FM)	

Última ocorrência: Titulado em 07/07/2021

Research Article

Leukotriene Involvement in the Insulin Receptor Pathway and Macrophage Profiles in Muscles from Type 1 Diabetic Mice

João Pedro Tórres Guimarães ^{1,2}, Luciano Ribeiro Filgueiras,¹ Jilson Oliveira Martins ², and Sonia Jancar ¹

¹Laboratory of Immunopharmacology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB/USP), São Paulo, Brazil

²Laboratory of Immunoendocrinology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of University São Paulo (FCF/USP), São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Jilson Oliveira Martins; martinsj@usp.br and Sonia Jancar; sojancar@icb.usp.br

Received 5 November 2018; Accepted 15 January 2019; Published 28 January 2019

Guest Editor: Qingdong Guan

Copyright © 2019 João Pedro Tórres Guimarães et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Type 1 diabetes (T1D) is a metabolic disease associated with systemic low-grade inflammation and macrophage reprogramming. There is evidence that this inflammation depends on the increased systemic levels of leukotriene (LT) B₄ found in T1D mice, which shifts macrophages towards the proinflammatory (M1) phenotype. Although T1D can be corrected by insulin administration, over time T1D patients can develop insulin resistance that hinders glycemic control. Here, we sought to investigate the role of leukotrienes (LTs) in a metabolically active tissue such as muscle, focusing on the insulin signaling pathway and muscle-associated macrophage profiles. Type 1 diabetes was induced in the I29/SvE mouse strain by streptozotocin (STZ) in mice deficient in the enzyme responsible for LT synthesis (*5LO*^{-/-}) and the LT-sufficient wild type (WT). The response to insulin was evaluated by the insulin tolerance test (ITT), insulin concentration by ELISA, and Akt phosphorylation by western blotting. The gene expression levels of the insulin receptor and macrophage markers *Stat1*, *MCP-1*, *Ym1*, *Arg1*, and *IL-6* were evaluated by qPCR, and that of *IL-10* by ELISA. We observed that after administration of a single dose of insulin to diabetic mice, the reduction in glycemia was more pronounced in *5LO*^{-/-} than in WT mice. When muscle homogenates were analyzed, diabetic *5LO*^{-/-} mice showed a higher expression of the insulin receptor gene and higher Akt phosphorylation. Moreover, in muscle homogenates from diabetic *5LO*^{-/-} mice, the expression of anti-inflammatory macrophage markers *Ym1*, *Arg1*, and *IL-10* was increased, and the relative expression of the proinflammatory cytokine *IL-6* was reduced compared with WT diabetic mice. These results suggest that LTs have an impact on the insulin receptor signaling pathway and modulate the inflammatory profile of muscle-resident macrophages from T1D mice.

1. Introduction

The incidence of metabolic disorders is increasing dramatically and is now widely considered a serious threat to public health. In diseases such as diabetes, obesity, atherosclerosis, and gout, metabolic imbalance is associated with the establishment of low-grade systemic inflammation, which in turn is a determining factor in the pathophysiology of these diseases. This happens as a consequence of the accumulation of certain metabolic products, such as glucose, fatty acids, uric acid, and cholesterol, which activate

receptors of innate immunity in leukocytes and induce the chronic production of proinflammatory cytokines and lipid mediators [1–3].

Characterized by chronic hyperglycemia with changes in the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins [4], diabetes is classically divided into two forms. In type 2 diabetes (T2D), hyperglycemia is due to insulin resistance established in the liver, muscle, and adipose tissue, and the main risk factor for this condition is obesity [5]. In T1D, hyperglycemia results from deficient insulin production as a consequence of the destruction of pancreatic β cells by

Tabelas 2. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 5, na caracterização do modelo de DT1 de acordo com a glicemia e peso da seção resultados parte I.

Glicemia (mg/dL)				
Animal	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	212	127	361	416
2	142	144	385	327
3	124	133	348	427
4	101	135	423	403
5	127	143	403	324
6	116		456	360
7			468	
Média	137	136,4	406,3	376,2
DP	39,13	7,127	45,59	45,37
EPM	15,97	3,187	17,23	18,52

Peso (g)								
Dia	Wt				Média	DP	EPM	
0	21,9	23,1	24,8	23,2	23,25	1,190238	0,5951189	
7	22,1	23,4	24,4	23,7	23,4	0,962635	0,4813175	
8	22,5	23,4	24,5	23,9	23,575	0,8460693	0,4230346	
9	22,8	23,8	24,4	25,3	24,075	1,05	0,525	
10	23,2	24,4	25	25,1	24,425	0,8732122	0,4366061	
11	23,3	24,3	25,6	25,2	24,6	1,023068	0,511534	
15	23,7	24,6	25,4	25,2	24,725	0,7632166	0,3816083	
Dia	5LO ^{-/-}				Média	DP	EPM	
0	22,2	24,8	25	25,6	26,5	24,82	1,60686	0,7186096
7	19	23,6	24,5	24,2	26,5	23,56	2,771822	1,239597
8	18,5	22,2	23,1	22,8	25,7	22,46	2,587084	1,156979
9	18	22,1	22,9	22,4	25	22,08	2,546959	1,139035
10	17,7	21,7	22,8	22,2	25,1	21,9	2,684213	1,200417
11	17,5	21,8	22,8	22,3	25	21,88	2,736238	1,223683
15	17,5	21,6	22,8	22	24,8	21,74	2,671703	1,194822
Dia	DT1				Média	DP	EPM	
0	20,3	18,5	16,9	19,9	18,9	1,540563	0,7702813	
7	18,9	18,4	16,7	17,8	17,95	0,9469243	0,4734622	
8	19,2	17,3	16,8	17,6	17,725	1,037225	0,5186123	
9	20	17,3	17,1	17,1	17,875	1,4198	0,7099002	
10	20	17,1	16,4	17	17,625	1,613227	0,8066133	
11	20,1	16,4	16,4	17,8	17,675	1,746187	0,8730934	
15	20	15,5	16,3	17,6	17,35	1,967232	0,9836158	

Dia	DT1 5LO ^{-/-}					Média	DP	EPM
0	18,1	18,2	16,1	17,5	16,8	17,34	0,8905057	0,3982463
7	16,4	15,4	12,7	13,7	15,1	14,66	1,460479	0,6531462
8	15,8	15,2	12,1	13,2	14,1	14,08	1,492314	0,6673829
9	15,7	15,1	11,7	13,2	13,8	13,9	1,582719	0,7078136
10	15,3	15	11,5	13,2	13,6	13,72	1,528725	0,6836666
11	15,2	14,5	11	13,1	13,4	13,44	1,604057	0,7173563
15	13,2	12,7		12,1	11,3	12,325	0,8180259	0,4090129

Tabelas 3. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 6, quanto ao teste de tolerância a insulina e a dosagem de insulina da seção resultados parte I.

ITT (%)		
Tempo (min)	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
0	100	100
30	79	69
60	53	29
120	51	15

Insulina (ng/mL)				
Animal	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	2,28	1,25	0,61	0,25
2	2,14	1,9	0,41	0,46
3	1,54	1,56	0,85	0,6
4	1,93	1,6	0,63	0,52
5	1,76			
Média	1,93	1,578	0,625	0,4575
DP	0,2948	0,2659	0,1799	0,1497
EPM	0,1318	0,1329	0,08995	0,07487

Tabelas 4. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 7, quanto à expressão gênica de *insr* e expressão protéica de pAKT em músculos da seção resultados parte I.

Insr Quadriceps (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,944902	0,854281	0,85885	1,884957
2	1	2,42771	0,697977	1,544947
3	1,659896	2,713891	0,63765	2,394882
4	1,244283	1,998639	0,430114	1,84166
Média	1,212	1,999	0,6561	1,917
DP	0,3255	0,8176	0,1773	0,3528
EPM	0,1628	0,4088	0,08863	0,1764

pAKT Quadriceps		
Sample	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	100	491,3
2	165,7	570,3
3	140,8	325,7
Média	135,5	462,4
DP	33,17	124,8
EPM	19,15	72,07

Insr Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,509429	1,436094	0,538295	1,134248
2	1	1,671092	0,435404	1,194809
3	1,523891	2,212059	0,307924	1,202181
4	1,011251	1,773080	0,509916	1,117080
Média	1,011	1,773	0,4479	1,162
DP	0,4142	0,3249	0,1016	0,04274
EPM	0,2071	0,1624	0,0508	0,02137

pAKT Gastrocnêmio		
Sample	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	100	211,7
2	50,6	208,7
3	55,9	302,1
Média	68,83	240,8
DP	27,12	53,08
EPM	15,66	30,65

Tabelas 5. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 8, quanto à expressão gênica de *Mcp1*, *Ym1*, *Stat1*, *Arg1*, *IL-6* e dosagem de IL-10 em músculos da seção resultados parte I.

Mcp1 Quadriceps (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,818422	1,544632	1,378776	0,591771
2	1	1,892316	1,961454	0,768739
3	1,112148	3,387403	0,8356754	0,755003
4	0,966850	2,374857	1,410302	0,605192
Média	0,9744	2,3	1,422	0,6802
DP	0,1211	0,801	0,4635	0,09466
EPM	0,06056	0,4005	0,2317	0,04733

Stat1 Quadriceps (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,742803	1,170758	0,9647525	1,48761
2	1	2,425561	0,7638749	0,9699897
3	1,53966	1,459474	1,922602	1,130206
4	1,06415	1,584260	1,583387	0,9436906
5			0,9427839	
Média	1,087	1,66	1,235	1,133
DP	0,3324	0,5389	0,4936	0,2504
EPM	0,1662	0,2695	0,2207	0,1252

IL-6 Quadriceps (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1,113106	0,6802404	1,855105	1,278913
2	0,640872	0,7458836	2,277604	1,241155
3	1	1,149641	2,46322	1,131048
4	0,817993	1,072283	2,29634	1,417040
Média	0,893	0,912	2,223	1,267
DP	0,2074	0,2334	0,2591	0,118
EPM	0,1037	0,1167	0,1296	0,05902

Ym1 Quadriceps (expressão gênica)				
-----------------------------------	--	--	--	--

Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,71091	0,2910724	1,909261	7,677627
2	0,889213	0,570027	2,843868	6,59563
3	1	0,3105326	2,754332	3,599012
4	0,886708	0,295504	2,702490	4,957420
Média	0,8717	0,3668	2,552	5,707
DP	0,1195	0,1358	0,4328	1,796
EPM	0,05975	0,06788	0,2164	0,8981

Arg1 Quadriceps (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1,499158	0,7207671	2,997452	3,373548
2	1	0,654272	2,572737	5,605115
3	0,809879	0,6733409	1,725835	3,040674
4	1	1,113272	2,581064	3,006554
5	0,600333	1,058742		
Média	0,9819	0,9273	2,293	4,006
DP	0,3329	0,2853	0,4914	1,394
EPM	0,1489	0,1165	0,2837	0,8051

IL-10 Quadriceps (pg/ml)		
Sample	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,221117	0,4539275
2	0,124558	0,300162
3	0,039834	0,2830055
4	0,08831	0,2418179
5	0,292133	
Média	0,1532	0,3197
DP	0,1022	0,09276
EPM	0,04572	0,04638

Tabelas 6. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 9, quanto à expressão gênica de *Mcp1*, *Ym1*, *Stat1*, *Arg1*, *IL-6* e dosagem de IL-10 em músculos da seção resultados parte I.

Mcp1 Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1	3,912211	1,282405	0,8599722
2	1,309132	2,490772	1,444199	1,100706
3	0,837479	2,399642	1,325195	1,272546
4	0,986654	2,060643	2,222054	1,000254
5			2,291386	
Média	1,033	2,716	1,713	1,058
DP	0,1981	0,8188	0,5004	0,1736
EPM	0,09904	0,4094	0,2238	0,0868

Stat1 Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1	0,2805393	1,0077	0,5212878
2	0,70463	1,679649	0,812719	1,372148
3	0,468826	1,443959	0,49851	0,5128435
4	0,688974	1,282166	0,45937	0,9307252
5			0,496729	
Média	0,7156	1,172	0,655	0,8343
DP	0,218	0,616	0,2435	0,4082
EPM	0,109	0,308	0,1089	0,2041

IL-6 Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1	0,7713287	0,468517	0,9018466
2	0,931447	0,3929449	1,425927	0,339327
3	0,384757	0,4114296	0,734358	0,3250042
4	0,4195	0,2261453	2,590523	0,622049
Média	0,6839	0,4505	1,305	0,5471
DP	0,3269	0,2296	0,9474	0,2732
EPM	0,1635	0,1148	0,4737	0,1366

Ym1 Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1	1,794671	0,79973	5,519606
2	1	1,290023	0,307555	5,209591
3	0,44853	1,278	0,542392	5,299489
4	0,931106	1,48316	0,607555	5,629807
5		1,58017		
Média	0,8449	1,485	0,5643	5,415
DP	0,2662	0,2155	0,2031	0,1938
EPM	0,1331	0,09639	0,1015	0,09688

Arg1 Gastrocnêmio (expressão gênica)				
Sample	WT	5LO ^{-/-}	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	1,521236	0,3119526	0,345562	1,349544
2	0,739773	0,3689494	0,64544	1,37453
3	1	0,140536	0,208617	1,04006
4	0,534768	0,4649954	0,950679	0,8122134
Média	0,9489	0,3216	0,5376	1,144
DP	0,4264	0,1362	0,3303	0,2685
EPM	0,2132	0,06812	0,1652	0,1343

IL-10 Gastrocnêmio (pg/ml)		
Sample	DT1	DT1 5LO ^{-/-}
1	0,103354	0,1911342
2	0,058709	0,1831142
3	0,062478	0,2156028
4	0,063544	0,4633105
Média	0,07202	0,2633
DP	0,02099	0,1341
EPM	0,0105	0,06703

Tabelas 7. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 10, quanto ao modelo de DT1 de acordo com a glicemia e peso da seção resultados parte II.

Peso (g)										
Day	Wt					Média	DP	EPM		
0	24,4	21,2	25,2	23,8	24,9	23,9	1,6	0,715542		
15	26,8	23	26,6	24,9	25,8	25,42	1,546609	0,691665		
45	23,8	28	27,3	25,9	27,3	26,46	1,671227	0,747396		
Day	Captopril					Média	DP	EPM		
0	23	20,9	22,5	23,1	24,3	22,76	1,232071	0,550999		
15	23,8	21,4	23,7	24,7	24,7	23,66	1,350186	0,603821		
45	23,2	25,4	25,7	24,4	25,4	24,82	1,030534	0,460869		
Day	DT1					Média	DP	EPM		
0	25,8	24,4	24,6	24,8	25,9	25,1	0,7	0,313049		
15	17,9	24,9	21,3	18,9	22	21	2,75318	1,23126		
45	25,1	21,3	19,2	21,9	25,5	22,6	2,664582	1,191638		
Day	DT1+Captopril					Média	DP	EPM	DP	EPM
0	25,5	26,1	26,7	26,6	24,9	23,6	22,9	25,18571	1,474708	0,557387
15	23,5	21,5	22,9	25,5	21,4	22,5	16,4	21,95714	2,814165	1,063654
45	22,4	20	21,3	25,7	21,3	20	12,2	20,41429	4,108296	1,55279

Peso (g)										
Day	5LO-/-					Média	DP	EPM		
0	19,1	17,1	19,3	19,2	18,5	17,2	18,4	1,007968	0,411501	
15	21,1	18,9	21	20	19,1	20	20,01667	0,919602	0,375426	
45	22,2	21,4	22,9	21,8	20	20	21,38333	1,180537	0,481952	
Day	5LO-/- +Cap					Média	DP	EPM		
0	19,3	19,4	16,9	18,5	20	18,3	18,73333	1,093008	0,446219	
15	21,5	21,6	21,2	19,4	22,5	21,1	21,21667	1,018659	0,415866	
45	23,5	23	21,9	20	23,1	24,7	22,7	1,60125	0,653707	
Day	DT1 5LO-/-					Média	DP	EPM	DP	EPM
0	18,7	21,3	22,8	21	17,5	18,3	18	19,65714	2,022257	0,764341
15	16,9	17,1	14,9	16,4	16,1	17,9	16,9	16,6	0,939858	0,355233
45	14,4	21,2	16,6	14,3	15,8	16,9	17,6	16,68571	2,344091	0,885983
Day	DT1 5LO-/-+Cap					Média	DP	EPM	DP	EPM
0	20,9	22,8	20,8	21,8	21,8	20	19,4	21,07143	1,161485	0,439
15	18,2	18,7	17,9	16,4	18,2	17	19,3	17,95714	0,984644	0,372161
45	16,6	19,2	16,3	17,3	15,3	18,2	15,1	16,85714	1,493159	0,564361

Glicemia (mg/dL)										
------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Day	Wt					Média	DP	EPM		
15	153	145	125	139	122	136,8	13,16055	5,885576		
45	144	129	122	135	111	128,2	12,55787	5,616048		
Day	Captopril					Média	DP	EPM		
15	165	170	156	180	166	167,4	8,70632	3,893584		
45	119	116	134	120	127	123,2	7,259477	3,246537		
Day	DT1					Média	DP	EPM		
15	380	423	354	399	365	384,2	27,49	12,2939		
45	474	477	334	467	423	435	60,52685	27,06843		
Day	DT1+Captopril						Média	DP	EPM	
15	391	348	324	350	430	393	454	384,2857	46,89959	17,72638
45	363	436	408	384	385	346	446	395,4286	36,73262	13,88363

Glicemia (mg/dL)										
Day	5LO-/-					Média	DP	EPM		
15	146	146	132	138	107	105	129	18,59032	7,589467	
45	164	128	147	132	137	123	138,5	14,94992	6,103278	
Day	5LO-/- +Cap					Média	DP	EPM		
15	125	128	146	178	109	106	132	26,76565	10,92703	
45	113	124	144	150	120	129	130	14,29685	5,836666	
Day	DT1 5LO-/-					Média	DP	EPM		
15	408	352	361	334	284	307	285	333	45,0037	17,0098
45	519	357	362	482	347	365	321	393,2857	75,42925	28,50958
Day	DT1 5LO-/-+Cap					Média	DP	EPM		
15	483	480	364	477	375	270	277	389,4286	93,43957	35,31684
45	589	334	525	332	308	294	316	385,4286	119,4402	45,14414

Tabelas 8. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 11, quanto ao teste de ITT e dosagem de insulina no plasma de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

ITT (%)				
Tempo (min)	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
0	100	100	100	100
30	75	62	88	85
60	61	57	70	76
90	57	56	62	74
120	66	65	56	73

ITT (%)				
Tempo (min)	5LO- /-	5LO-/- +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO-/- +Cap
0	100	100	100	100
30	75	76	85	71
60	69	73	58	36
90	72	87	52	25
120	74	88	48	19

Insulina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1267	2066	35	197
2	1834	1655	186	32
3	2616	4259	186	32,5
4	162	338	63	132
5	592	489	51,5	43
6			32	41
7			153	
Média	1294	1761	100,9	79,58
DP	976,5	1580	70,91	69,05
EPM	436,7	706,7	26,8	28,19

Insulina (pg/mL)

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1653	1187	130	72
2	1045	406	93,5	54
3	2833	549	248	29
4	552	372	47	33,5
5	1954	902	43	58
6			47	63
7			40	29
8			38	35
9			46	
Média	1607	683,2	81,39	46,69
DP	873,9	351,2	69,78	17,01
EPM	390,8	157,1	23,26	6,013

Tabelas 9. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 12, quanto à dosagem de IL-6, leptina, resistina, triglicerídeos, adiponectina e NEFA no plasma de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

IL-6 (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	28	23	35	28
2	26	23	23	40
3	28	22	22	18
4	31	28	23	18
5		19	34	30
6			21	
7			18	
Média	28,25	23	25,14	26,8
DP	2,062	3,24	6,619	9,23
EPM	1,031	1,449	2,502	4,128

Leptina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	2142	6290,5	113	274
2	404	2746	388	120
3	2536	2719	271,5	103
4	226	524,5	463	309,5
5	1314,5	156	180	326
6			226	271
7			805,5	
Média	1325	2487	349,6	233,9
DP	1023	2443	233,9	97,25
EPM	457,7	1093	88,41	39,7

Resistina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	2243,5	3085	180,5	3045
2	3939	5897	2153	813
3	3129	2345	1637	945
4	7434	2166	2077	578
5	2457	1139,5	360	1015
6			1699,5	1393
7			2242	
Média	3841	2927	1478	1298
DP	2115	1800	856,9	896,6
EPM	945,9	804,9	323,9	366

Triglicerideos (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	69,785	58,09	64,62	90,179
2	53,34	54,379	40,1	168,578
3	45,028	73,882	85,964	66,134
4	56,368	57,199	67,678	73,11
5	59,693	79,789	72,873	79,908
6			51,232	82,817
7			103,953	
Média	56,84	64,67	69,49	93,45
DP	9,051	11,38	21,19	37,71
EPM	4,048	5,091	8,01	15,4

Adiponectina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	18,7838	18,8558	14,39125	13,4629
2	15,70795	25,4774	24,2994	9,7587
3	17,1244	16,45605	14,6384	9,30935
4	20,31525	13,55675	16,316	14,7985
5	19,3612	12,6608	12,54585	12,8912
6				18,76785
Média	18,26	17,4	16,44	13,16
DP	1,838	5,135	4,593	3,484
EPM	0,822	2,297	2,054	1,422

NEFA (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	164,873	400,575	495,084	366,752
2	213,8	277,658	325,471	263,374
3	214,638	232,508	234,502	266,775
4	420,244	284,403		
5	328,477	195,304		
Média	268,4	278,1	351,7	299
DP	104	77,42	132,3	58,73
EPM	46,51	34,62	76,36	33,91

IL-6 (pg/mL)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	29	24	32	24
2	27	44	29	39
3	30	27	27,5	25
4	31	25	29	21
5	32	25	27	22
6			34	25
7			27	23
8			17	31
9			36	
Média	29,8	29	28,72	26,25
DP	1,924	8,456	5,438	5,97
EPM	0,8602	3,782	1,813	2,111

Leptina (pg/mL)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1013,5	1303,5	154	573
2	1447	829	99	61
3	697	5155	200	36
4	593,5	1909,5	108	38
5	3538	2268,5	68	182
6			120	67
7			56	123
8			42,5	44
9			85	
Média	1458	2293	103,6	140,5
DP	1209	1693	49,69	181,9
EPM	540,9	757	16,56	64,3

Resistina (pg/mL)				
-------------------	--	--	--	--

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	6870,5	3904	4534	2907
2	5384,5	7577	1753	3684,5
3	4435	5162	5332	711
4	4423,5	6025,5	884	167,5
5	6665,5	5800	661	3295,5
6			1968	2747
7			1138	1446,5
8			121	935
9			2662	
Média	5556	5694	2117	1987
DP	1176	1337	1775	1329
EPM	525,7	598,1	591,8	469,7

Triglicerídeos (pg/mL)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	53,34	32,531	63,255	69,667
2	50,015	24,664	132,243	61,474
3	60,88	50,045	54,943	82,966
4	60,583	56,605	104,013	110,454
5	45,83	35,647	58,832	83,559
6			60,969	85,014
7			79,849	90,06
8			121,26	78,216
9			44,345	
Média	54,13	39,9	79,97	82,68
DP	6,589	13,1	31,62	14,5
EPM	2,947	5,859	10,54	5,125

Adiponectina (pg/mL)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	20,32745	20,88575	15,05075	12,07695
2	21,29535	31,8661	18,73585	20,02315
3	16,30825	23,03025	10,87675	10,84425
4	22,7383	19,64315	16,0831	10,0613
5	19,494	21,6737	18,648	16,46385
6				15,762
Média	20,03	23,42	15,88	14,21
DP	2,406	4,879	3,224	3,857
EPM	1,076	2,182	1,442	1,574

NEFA (pg/mL)				
--------------	--	--	--	--

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	228,356	193,257	286,865	183,797
2	181,075	116,88	398,254	191,909
3	250,932	302,557	332,689	177,615
4	134,593	255,66	441,303	
Média	198,7	217,1	364,8	184,4
DP	51,73	80,42	68,5	7,169
EPM	25,87	40,21	34,25	4,139

Tabelas 10. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 13, quanto à expressão gênica de *Agt* e *At1* no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Agt Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,823	0,575	2,183
2	0,985	1,236	1,524	2,2
3	0,7	0,729	2,258	2,13
4	1,089	1,78	1,5	1,646
5	0,696		0,186	1,517
6			0,47	
Média	0,894	1,142	1,086	1,935
DP	0,1833	0,479	0,7984	0,3271
EPM	0,08197	0,2395	0,326	0,1463

At1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,494	0,584	1,948
2	0,67	0,747	0,981	1,979
3	0,521	0,453	1,542	2,093
4	0,839	1,392	1,161	1,793
5	0,516		0,101	1,5
6			0,29	
Média	0,7092	0,7715	0,7765	1,863
DP	0,2096	0,4336	0,5488	0,2293
EPM	0,09373	0,2168	0,224	0,1025

Agt Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,372	0,656	1,535
2	0,934	0,91	0,688	1,04
3	0,798	1,325	0,686	1,936
4	1,32	0,976	1,101	1,26
5	1,582		1,086	1,37
6				1,103
7				1,146
Média	1,127	1,146	0,8434	1,341
DP	0,3185	0,2364	0,2287	0,3121
EPM	0,1425	0,1182	0,1023	0,118

At1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,734	0,368	1,43

2	0,724	0,887	0,482	1,117
3	0,605	1,057	0,565	1,786
4	0,98	1,684	0,552	1,745
5		1,23	0,757	1,699
Média	0,8273	1,318	0,5448	1,555
DP	0,1943	0,377	0,142	0,2818
EPM	0,09714	0,1686	0,06352	0,126

Tabelas 11. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 14, quanto à expressão gênica de *Agt* e *At1* no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Agt Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,619	2,202	1,553
2	0,964	1,087	1,043	1,903
3	0,585	1,114	2,058	2,01
4	1,229	1,083	1,643	1,476
5	0,624	0,688	1,757	2,124
Média	0,8804	0,9182	1,741	1,813
DP	0,2719	0,2432	0,45	0,285
EPM	0,1216	0,1087	0,2013	0,1274

At1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,553	1,132	1,269
2	0,932	0,949	0,998	1,27
3	0,643	0,618	1,31	1,375
4	1,295	1,084	1,16	0,937
5	0,692	0,643	1,105	1,149
Média	0,9124	0,7694	1,141	1,2
DP	0,2625	0,2329	0,1126	0,1674
EPM	0,1174	0,1042	0,05037	0,07485

Agt Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,765	2,628	2,006
2	1,787	2,66	1,603	2,437
3	1,442	2,44	2,41	0,962
4	1,424	1,341	1,288	2,049
5	1,149	1,508	1,621	3,082
6			0,855	0,741
7			0,988	1,069
8			0,612	
Média	1,36	1,943	1,501	1,764
DP	0,303	0,5797	0,7209	0,8663
EPM	0,1355	0,2593	0,2549	0,3274

At1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,71	1,638	1,748
2	1,646	1,301	1,224	2,181
3	1,328	1,866	2,593	1,183
4	1,411	1,219	0,957	1,527
5	0,988	1,914	1,187	2,579
Média	1,275	1,602	1,52	1,844
DP	0,2815	0,3225	0,6482	0,5478
EPM	0,1259	0,1442	0,2899	0,245

Tabelas 12. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 15, quanto à expressão gênica de *Insr*, *irs1*, *ampk* e *glut4* no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Insr Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,874	0,664	1,819
2	0,942	1,066	1,523	1,375
3	0,905	0,913	1,488	2,677
4	1,028	1,353	1,124	1,779
5	0,631		0,473	1,458
Média	0,9012	1,052	1,054	1,822
DP	0,1585	0,2174	0,4751	0,516
EPM	0,0709	0,1087	0,2125	0,2308

Irs1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,96	0,124	2,484
2	0,903	0,918	1,605	2,697
3	0,996	0,737	1,492	1,384
4	1,397		1,38	1,401
5	0,745		0,114	
6			0,29	
Média	1,008	0,8717	0,8342	1,992
DP	0,2407	0,1185	0,7272	0,6971
EPM	0,1076	0,06842	0,2969	0,3486

Ampk Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,813	0,121	0,76
2	0,588	0,8	0,776	0,619
3	0,546	0,797	0,709	0,987
4	0,692	0,662	0,811	0,653
5	0,641	0,876	0,166	0,726
Média	0,6934	0,7896	0,5166	0,749
DP	0,18	0,07819	0,3429	0,1444
EPM	0,08049	0,03497	0,1534	0,06458

Glut4 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,001	0,123	0,913
2	0,783	1,036	1,188	0,596
3	0,863	0,878	0,866	0,741
4	0,932	1,011	0,922	1,138
5	0,734	1,586		0,838
Média	0,8624	1,102	0,7748	0,8452
DP	0,1079	0,2772	0,4566	0,2021
EPM	0,04825	0,1239	0,2283	0,09037

Insr Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,307	0,381	1,819
2	0,86	1,407	0,297	1,018
3	0,752	1,293	0,578	1,528
4	1,362	1,363	0,979	1,808
5			1,415	2,064
6				1,345
7				0,962
Média	0,9935	1,343	0,73	1,506
DP	0,2658	0,05257	0,4647	0,4205
EPM	0,1329	0,02629	0,2078	0,1589

Irs1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,079	0,527	2,478
2	1,087	3,493	0,424	3,288
3	1,456	1,518	0,899	2,569
4	2,949	3,635	1,238	2,658
5	2,636	1,49	1,38	1,727
6			0,941	
7			1,285	
8			1,999	
Média	1,826	2,243	1,087	2,544
DP	0,9059	1,219	0,5056	0,5566
EPM	0,4051	0,5453	0,1788	0,2489

Ampk Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,006	0,322	1,878
2	0,908	1,379	0,14	2,494
3	0,926	1,525	0,514	2,259
4	1,935	1,505	0,636	1,857
5	2,019		0,9	2,1
Média	1,358	1,486	0,9338	2,118
DP	0,5348	0,4488	1,096	0,2527
EPM	0,1691	0,1496	0,3466	0,0799

Glut4 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,008	0,266	0,929
2	0,786	1,075	0,232	0,898
3	0,644	1,109	0,445	0,881
4	1,313	0,972	0,184	1,087
5	1,509		0,227	0,938
6			0,24	
Média	1,05	1,041	0,2657	0,9466
DP	0,3595	0,06226	0,09178	0,08179
EPM	0,1608	0,03113	0,03747	0,03658

Tabelas 13. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 16, quanto à expressão protéica de pAKT e pAMPK em músculos de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

pAKT/tAKT Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,9	0,4	0	0,2
2	0,3	0,4	1,2	0,3
3	0,1	0,3	0,2	0,2
4	1,5	0,9	0,3	0,3
Média	0,7	0,5	0,425	0,25
DP	0,6325	0,2708	0,5315	0,05774
EPM	0,3162	0,1354	0,2658	0,02887

pAMPK/AMPK Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,079734	0,1865116	0,222152	0,4435484
2	0,154018	0,2368984	0,097222	0,3237113
3	0,190411	0,1449704	0,201655	0,119335
4	0,354875	0,1623932	0,028538	0,15875
5	0,125521	0,1322115		
Média	0,1809	0,1726	0,1374	0,2613
DP	0,1053	0,04131	0,09088	0,1503
EPM	0,04711	0,01848	0,04544	0,07516

pAKT/tAKT Músculo				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,3	0,2	0,1	0,1
2	0,8	0,9	0,5	0,5
3	0,2	0,5	0,1	0,1
4	0,4	0,2	0,2	0,2
Média	0,425	0,45	0,225	0,225
DP	0,263	0,3317	0,1893	0,1893
EPM	0,1315	0,1658	0,09465	0,09465

pAMPK/AMPK Músculo				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,089041	0,1250836	0,088889	0,2519573
2	0,176735	0,2975758	0,489831	0,1223176
3	0,3625	0,1067416	0,194521	0,1874419
4	0,208657	0,1854701	0,139645	0,07504273
5	0,164706	0,0714286	0,139014	0,0513245
Média	0,2003	0,1573	0,2104	0,1376
DP	0,1007	0,08865	0,1606	0,08239
EPM	0,04504	0,03965	0,07183	0,03685

Tabelas 14. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 17, quanto à expressão gênica de *Insr*, *irs1* e *ampk* no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Insr Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,781	0,967	0,956
2	1,199	1,272	1,16	1,115
3	0,886	0,92	1,323	1,242
4	1,209	0,984	1,016	0,796
5	0,623	0,659	1,074	1,217
6			0,045	0,216
7			0,092	
Média	0,9834	0,9232	0,811	0,9237
DP	0,2434	0,2321	0,5201	0,3853
EPM	0,1089	0,1038	0,1966	0,1573

Irs1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,683	0,431	1,065
2	0,825	0,628	0,958	0,976
3	0,748	0,546	0,792	
4	1,44	0,817	0,974	0,617
5	0,684	0,671	0,084	0,97
6			0,098	0,198
Média	0,9394	0,669	0,5562	0,7652
DP	0,3038	0,09863	0,4099	0,3605
EPM	0,1359	0,04411	0,1674	0,1612

Ampk Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,09	0,75	0,826
2	0,818	1,004	0,916	0,825
3	0,87	0,959	1,076	0,878
4	0,921	1,375	0,929	0,933
5	0,664	0,763	0,978	0,951
6			0,05	0,131
7			0,056	
Média	0,8546	1,038	0,6793	0,7573
DP	0,126	0,2232	0,4387	0,3113
EPM	0,05633	0,09982	0,1658	0,1271

Insr Fígado (expressão gênica)				
--------------------------------	--	--	--	--

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,664	0,861	1,244
2	1,722	1,401	0,532	1,927
3	1,331	0,732	0,651	0,866
4	1,019	1,053	0,247	1,542
5	0,554		0,309	1,757
6			0,157	
Média	1,125	1,213	0,4595	1,467
DP	0,4335	0,4065	0,2692	0,422
EPM	0,1939	0,2032	0,1099	0,1887

Irs1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	0,585	0,753	1,813
2	1,324	1,049	0,388	1,393
3	1,073	1,013	0,397	1,081
4	1,45	0,506	0,249	0,979
5	0,63	0,873	0,228	1,488
6			0,158	
Média	1,095	0,8052	0,3622	1,351
DP	0,3179	0,2476	0,2131	0,3336
EPM	0,1422	0,1107	0,08701	0,1492

Ampk Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,256	0,484	1,317
2	1,135	0,846	0,211	1,223
3	1,275	1,298	0,279	0,765
4	0,415	0,346	0,077	0,558
5	0,274	0,417	0,104	1,031
6			0,062	
Média	0,8198	0,8326	0,2028	0,9788
DP	0,4474	0,4488	0,1615	0,316
EPM	0,2001	0,2007	0,06592	0,1413

Tabelas 15. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 18, quanto à expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

pAKT/tAKT Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0	0	0	0
2	0,5	0,4	0,6	0,4
3	0,2	0,4	0,3	0,2
4	0,2	0,2	0,4	0,4
5	0,8	0,4	0,9	0,5
Média	0,34	0,28	0,44	0,3
DP	0,313	0,1789	0,3362	0,2
EPM	0,14	0,08	0,1503	0,08944

pAMPK/AMPK Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	5,719947	12,67206	16,78959	11,47826
2	1,879032	1,295238	4,824562	2,762864
3	1,900452	5,276243	3,430657	4,68144
4	6,006849	3,714286	4,57931	3,261111
5	11,70984	7,6	6,586345	8,684211
Média	5,443	6,112	7,242	6,174
DP	4,029	4,327	5,455	3,768
EPM	1,802	1,935	2,44	1,685

pAKT/tAKT Fígado				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0	0	0	0
2	0,5	0,3	0,5	0,3
3	0,3	0,4	0,5	0,2
4	0,3	0,3	0,6	0,4
5	0,8	0,6	0,7	0,9
Média	0,38	0,32	0,46	0,36
DP	0,295	0,2168	0,2702	0,3362
EPM	0,1319	0,09695	0,1208	0,1503

pAMPK/AMPK Fígado				
-------------------	--	--	--	--

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,721519	1,108108	1,253012	1,42029
2	6,8	6	6,3	4,5
3	2,9	3,1	2	2,5
4	4,4	5,5	10,3	6,7
Média	4,143	4,065	4,514	3,762
DP	2,421	1,986	3,77	2,016
EPM	1,083	0,8883	1,686	0,9016

Tabelas 16. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 19, quanto à expressão gênica de *beclin1*, *atg5*, *atg7*, *atg12*, *atg14* e *lc3* no músculo de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Beclin1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,988	0,461	3,332
2	0,877	1,055	2,441	1,932
3	0,671	0,893	2,433	2,465
4	1,011	2,152	2,832	2,774
5	0,715			2,837
Média	0,8548	1,272	2,042	2,668
DP	0,1576	0,5904	1,07	0,5157
EPM	0,07046	0,2952	0,5351	0,2306

Atg5 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,832	0,41	3,312
2	1,158	1,064	2,626	2,886
3	0,722	0,851	2,694	2,918
4	1,308	2,681	2,452	2,375
5	0,684			
Média	0,9744	1,357	2,046	2,873
DP	0,271	0,8889	1,095	0,3842
EPM	0,1212	0,4445	0,5475	0,1921

Atg7 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,027	1,042	2,867
2	1,046	1,252	2,025	1,807
3	1,277	0,985	2,574	2,458
4	1,144	1,767	2,044	3,451
5	0,762			2,286
Média	1,046	1,258	1,921	2,574
DP	0,1909	0,3592	0,639	0,6204
EPM	0,08536	0,1796	0,3195	0,2775

Atg12 Músculo (expressão gênica)				
----------------------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,106	0,263	3,249
2	1,217	1,313	2,463	1,692
3	0,873	0,995	2,687	2,22
4	1,339	2,497	2,238	2,703
5	0,697		0,138	2,069
6			0,518	
Média	1,025	1,478	1,385	2,387
DP	0,2583	0,6922	1,196	0,6031
EPM	0,1155	0,3461	0,4882	0,2697

Atg14 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,98	0,987	4,961
2	0,893	1,314	3,967	3,22
3	0,719	0,947	4,493	5,049
4	1,022	2,996	4,051	5,124
5	0,704			5,253
Média	0,8676	1,559	3,375	4,721
DP	0,1507	0,9721	1,608	0,8461
EPM	0,0674	0,486	0,8042	0,3784

Lc3 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,776	1,171	4,451
2	0,661	0,967	3,179	3,245
3	0,605	0,848	3,681	3,909
4	0,906	2,924	3,697	4,357
5	0,692			4,023
Média	0,7728	1,379	2,932	3,997
DP	0,1707	1,033	1,198	0,4769
EPM	0,07634	0,5166	0,5992	0,2133

Beclin1 Músculo (expressão gênica)				
------------------------------------	--	--	--	--

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,495	0,34	1,685
2	0,861	1,311	0,288	1,885
3	0,782	1,625	0,626	2,885
4	1,716	2,466	2,647	1,802
5	2,167	1,53	2,942	2,048
Média	1,305	1,685	1,369	2,061
DP	0,6074	0,451	1,312	0,4792
EPM	0,2716	0,2017	0,5868	0,2143

Atg5 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,701	0,283	1,681
2	0,698	1,281	0,279	1,651
3	0,619	1,636	0,675	
4	1,699	1,966	2,927	1,746
5			2,883	1,621
Média	1,004	1,646	1,409	1,675
DP	0,4916	0,2821	1,375	0,05344
EPM	0,2458	0,1411	0,6148	0,02672

Atg7 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,804	0,308	0,91
2	0,752	1,215	0,326	0,911
3	0,513	1,212	0,616	1,48
4	1,29	1,413	1,928	1,062
5		2,049	1,86	1,083
Média	0,8888	1,539	1,008	1,089
DP	0,3333	0,3735	0,8187	0,2331
EPM	0,1667	0,167	0,3661	0,1043

Atg12 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap

1	1	1,608	0,314	1,567
2	0,803	1,006	0,415	1,846
3	0,738	1,517	0,596	3,417
4	1,597	2,132	0,928	1,726
5			1,177	2,192
6			1,251	1,097
7				1,384
Média	1,035	1,566	0,7802	1,89
DP	0,3912	0,4612	0,3964	0,7573
EPM	0,1956	0,2306	0,1618	0,2862

Atg14 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,93	0,495	2,009
2	0,976	1,559	0,493	1,821
3	0,718	1,983	1,013	2,617
4	1,615	2,334	4,669	2,388
5	2,109	1,557	4,418	
Média	1,284	1,873	2,218	2,209
DP	0,567	0,3265	2,136	0,3601
EPM	0,2536	0,146	0,9551	0,1801

Lc3 Músculo (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	1,415	0,405	1,401
2	1,076	1,833	0,351	1,295
3	0,73	1,089	0,752	2,149
4	1,928	1,974		1,401
5	1,857	1,668		1,463
Média	1,318	1,596	0,5027	1,542
DP	0,5404	0,3514	0,2176	0,3448
EPM	0,2417	0,1572	0,1256	0,1542

Tabelas 17. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 20, quanto à expressão protéica de pmTOR e LC3 em músculos de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

pmTOR/mTOR Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,445238	0,2527607	0,203462	0,3678261
2	1,318777	1,082902	1,263158	1,284238
3	0,317434	0,3230579	0,418033	0,3678899
4	0,782946	0,6734104	0,786585	0,9777778
5	0,184956	0,2399554	0,211268	0,2095344
Média	0,6099	0,5144	0,5765	0,6415
DP	0,4543	0,3636	0,4509	0,4644
EPM	0,2032	0,1626	0,2017	0,2077

LC3/TBP Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,245442	0,269168	1,064677	0,4424
2	0,637224	0,5943878	0,720222	1,027907
3	0,197137	0,2936858	0,23152	0,2883939
4	0,453913	0,795122	1,384906	1,299771
5	0,042395	0,0414676	0,052194	0,060799
Média	0,3152	0,3988	0,6907	0,6239
DP	0,2325	0,2962	0,557	0,5202
EPM	0,104	0,1325	0,2491	0,2327

pmTOR/mTOR Músculo				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,365325	0,282906	0,240061	0,2866667
2	1,450237	1,589655	1,547101	1,466843
3	0,335329	0,269103	0,344538	0,378628
4	1,102975	0,9905363	1,00692	1,015748
5	0,256915	0,2563636	0,284286	0,2668919
Média	0,7022	0,6777	0,6846	0,683
DP	0,54	0,5979	0,5747	0,5357
EPM	0,2415	0,2674	0,257	0,2396

LC3/TBP Músculo

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,41252	0,384	0,613309	0,1573248
2	1,08718	1,934169	0,683623	1,209023
3	0,258416	0,2662602	0,630901	0,3232462
4	0,481113	0,4930939	0,494506	1,017143
5	0,023587	0,0572755	0,060769	0,05433912
Média	0,4526	0,627	0,4966	0,5522
DP	0,3959	0,7484	0,2533	0,5253
EPM	0,177	0,3347	0,1133	0,2349

Tabelas 18. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 21, quanto à expressão gênica de *beclin1*, *atg5*, *atg7*, *atg12*, *atg14* e *lc3* no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

Beclin1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,68	0,77	1,377
2	1,024	1,115	0,703	1,347
3	0,482	1,418	1,393	1,937
4	1,196	1,515	0,973	1,043
5	0,465	0,703	1,318	1,666
Média	0,8334	1,086	1,031	1,474
DP	0,3372	0,3894	0,3132	0,34
EPM	0,1508	0,1742	0,1401	0,1521

Atg5 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,348	0,888	1,232
2	0,815	0,758	0,529	1,152
3	0,229	0,869	1,41	1,541
4	1,161	1,253	0,948	0,828
5	0,37	0,473	1,645	1,616
Média	0,715	0,7402	1,084	1,274
DP	0,4017	0,3553	0,4433	0,3177
EPM	0,1796	0,1589	0,1982	0,1421

Atg7 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,628	0,748	1,131
2	0,973	1,039	0,738	1,169
3	0,405	1,133	1,568	1,187
4	1,127	1,088	1,024	1,194
5	0,488	0,709	1,453	1,511
Média	0,7986	0,9194	1,106	1,238
DP	0,328	0,2332	0,3886	0,1543
EPM	0,1467	0,1043	0,1738	0,06902

Atg12 Fígado (expressão gênica)				
---------------------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,57	1,384	1,652
2	0,992	1,101	0,713	2,273
3	0,357	1,252	1,673	2,632
4	1,224	1,355	1,026	1,28
5	0,429	0,663	1,608	2,319
Média	0,8004	0,9882	1,281	2,031
DP	0,3842	0,3527	0,4058	0,5501
EPM	0,1718	0,1577	0,1815	0,246

Atg14 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,475	1,706	2,842
2	1,492	1,963	0,799	2,592
3	0,342	1,996	1,551	4,354
4	0,906	1,157	1,123	1,58
5	0,332	0,446	1,994	3
Média	0,8144	1,207	1,435	2,874
DP	0,4893	0,7602	0,4747	0,9951
EPM	0,2188	0,34	0,2123	0,445

Lc3 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,059	1,133	0,981
2	1,096	0,977	0,887	1,343
3	0,637	1,845	1,073	1,68
4	1,212	1,41	1,153	0,883
5	0,717	0,949	1,112	1,384
Média	0,9324	1,248	1,072	1,254
DP	0,2466	0,3812	0,1074	0,3234
EPM	0,1103	0,1705	0,04801	0,1446

Beclin1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	2,655	1,969	2,112
2	1,887	2,23	1,157	2,641
3	0,943	2,967	2,048	1,112
4	0,786	1,017	0,598	1,869
5		1,062	0,926	3,227
Média	1,154	1,986	1,34	2,192
DP	0,497	0,9031	0,6427	0,7984
EPM	0,2485	0,4039	0,2874	0,3571

Atg5 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	3,267	2,345	2,835
2	2,611	2,748	0,955	3,559
3	1,973	3,316	2,269	2,019
4	1,054	1,003	0,482	3,623
5	0,765	1,37	0,923	
Média	1,481	2,341	1,395	3,009
DP	0,7819	1,085	0,8539	0,7505
EPM	0,3497	0,4851	0,3819	0,3753

Atg7 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	2,854	1,623	1,655
2	2,199	1,735	1,025	2,922
3	2,345	3,27	1,99	2,266
4	1,319	1,197	0,972	2,924
5	0,885	1,486	1,26	
Média	1,55	2,108	1,374	2,442
DP	0,6803	0,9031	0,4295	0,6091
EPM	0,3042	0,4039	0,1921	0,3046

Atg12 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	1	3,083	2,62	4,083
2	2,551	3,118	1,635	4,424
3	2,049	3,317	2,71	2,991
4	1,221	1,404	0,944	5,238
5	1,019	1,763	1,168	
Média	1,568	2,537	1,815	4,184
DP	0,6968	0,8841	0,8153	0,9313
EPM	0,3116	0,3954	0,3646	0,4657

Atg14 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap

1	1	1,968	1,771	2,635
2	1,745	3,26	1,123	4,313
3	1,838	3,405	0,591	3,084
4	0,705	1,169	1,018	
5	1,033	1,354		
Média	1,264	2,231	1,126	3,344
DP	0,4991	1,049	0,4878	0,8687
EPM	0,2232	0,4692	0,2439	0,5015

Lc3 Fígado (expressão gênica)				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/+} Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/+} +Cap
1	1	1,804	1,717	1,686
2	1,553	1,639	1,119	1,4
3	1,466	1,974	1,572	1,177
4	0,989	0,769	0,619	1,406
5	0,644	1,038	0,848	2,389
Média	1,13	1,445	1,175	1,612
DP	0,3758	0,517	0,4665	0,4706
EPM	0,168	0,2312	0,2086	0,2105

Tabelas 19. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 22, quanto à expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos Wt e 5LO^{-/-} da seção resultados parte II.

pmTOR/mTOR Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,883991	0,9184549	0,843931	0,9463244
2	0,363793	0,3468468	0,363545	0,3716143
3	1,489511	1,441718	1,605096	1,45045
4	0,245098	0,2348337	0,281553	0,2552693
5	2,819048	2,758621	2,615385	2,449541
Média	1,16	1,14	1,142	1,095
DP	1,05	1,026	0,9773	0,8961
EPM	0,4695	0,4587	0,4371	0,4007

LC3/TBP Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,135473	0,1906977	0,194813	0,07751196
2	0,162963	0,156	0,064591	0,1577778
3	0,056786	0,0482072	0,035103	0,05702128
4	0,023002	0,034087	0,323024	0,03151928
5	0,214925	0,1991215		0,3026585
Média	0,1186	0,1256	0,1544	0,1253
DP	0,07825	0,07895	0,1321	0,1098
EPM	0,03499	0,03531	0,06606	0,04912

pmTOR/mTOR Fígado				
Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,964103	1,017591	1,095238	0,8919289
2	0,417752	0,6559379	0,481553	0,4086093
3	1,576271	1,552632	1,476415	1,465625
4	0,29899	0,2958258	0,306889	0,2749004
5	2,660152	2,68	2,90625	2,622739
Média	1,183	1,24	1,253	1,133
DP	0,9685	0,9292	1,037	0,9551
EPM	0,4331	0,4155	0,4636	0,4272

LC3/TBP Fígado

Animal	5LO ^{-/-}	5LO ^{-/-} +Cap	DT1 5LO ^{-/-}	DT1 5LO ^{-/-} +Cap
1	0,066713	0,0814485	0,088889	0,06465296
2	0,167217	0,2307692	0,127676	0,04679145
3	0,043548	0,056579	0,029058	0,03081081
4	0,076489	0,0600559	0,084236	0,05953307
5	0,412281	0,3342246	0,160334	0,1851852
Média	0,1532	0,1526	0,09804	0,07739
DP	0,1522	0,1244	0,04948	0,06166
EPM	0,06808	0,05565	0,02213	0,02757

Tabelas 20. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 23, na caracterização do modelo de DT1 de acordo com a glicemia e peso da seção resultados parte III.

Peso (g)																
Day	Wt							Média	DP	EPM						
0	33,2	31,8	30,9	30	31,1	30	29,8	30,97143	1,220266	0,461217						
15	33	31,9	31	30,4	31,5	30,4	30,2	31,2	1,011599	0,382349						
45	32,6	34,1	31,3	31,2	31,6	30,2	30,6	31,65714	1,318909	0,498501						
Day	Captopril							Média	DP	EPM						
0	31,3	30,4	30	30,8	28,8	29,9	30,1	30,18571	0,78619	0,297152						
15	30,8	30,2	30,4	30,1	29,8	30,6	30,8	30,38571	0,37607	0,142141						
45	31	30	31,1	30,9	29,6	29,6	31,1	30,47143	0,706433	0,267007						
Day	DT1											Média	DP	EPM		
0	28,8	28,6	28,2	28,4	31,8	29,2	29,8	28,6	28	28,8	28,1	28,9	28	28,86154	1,020244	0,282965
15	23,4	22,7	24	23,6	26,2	23,6	22,8	22,5	22,1	23,5	23,6	23,3	22,6	23,37692	1,013372	0,281059
45	27,8	27,2	22,7	26,9	29,8	28,5	27	20,7	22,4	22,2	20,1	21,2	20,8	24,40769	3,481968	0,965724
Day	DT1+Captopril											Média	DP	EPM		
0	30	28,4	28,4	28,2	27,9	27,8	28,1	28,4	28,7	28,4	27,4	28	28,30833	0,635979	0,183591	
15	25,8	24,2	22,9	23,7	23,6	22,5	24,3	25,7	22,7	24,3	23,2	22,7	23,8	1,111919	0,320983	
45	25,6	22,6	23,6	24,4	23,5	20,9	16,1	26,8	22,2	24,2	21,7	21,2	22,73333	2,732076	0,788683	

Glicemia (mg/dL)																
Day	Wt							Média	DP	EPM						
15	130	129	132	126	128	131	134	130	2,645751	1						
45	132	134	130	134	136	133	130	132,7143	2,21467	0,837067						
Day	Captopril							Média	DP	EPM						
15	148	143	156	152	146	140	135	145,7143	7,134757	2,696685						
45	143	140	152	148	138	149	137	143,8571	5,871643	2,219272						
Day	DT1											Média	DP	EPM		
15	511	525	518	503	507	490	489	409	592	492	544	504	457	503,1538	42,65139	11,82937
45	531	521	600	553	600	438	580	600	600	600	461	477	429	537,6923	66,50612	18,44548
Day	DT1+Captopril											Média	DP	EPM		
15	600	587	500	567	538	541	543	533	549	549	420	553	540	45,65881	13,18056	
45	600	535	555	600	600	430	572	553	534	457	528	510	539,5	54,19577	15,64497	

Tabelas 21. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 24, quanto à dosagem de IL-6, leptina, resistina, triglicerídeos, adiponectina e NEFA no plasma de camundongos DT1 da seção resultados parte III.

IL-6 (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	66	88	34	26
2	81	25	50,5	25
3	31	25	26	34
4	33	25	38,5	29
5	28	25	86	31
6		67	58	96
Média	47,8	42,5	48,83	40,17
DP	24,12	27,91	21,52	27,55
EPM	10,79	11,4	8,787	11,25

Leptina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	3096,5	703	337	155
2	800	587	159	177
3	1301,5	841	177	124
4	1754,5	622	169	131
5	1298	429	186,5	128
6			198	123
Média	1650	636,4	204,4	139,7
DP	876,2	151,6	66,35	21,74
EPM	391,9	67,81	27,09	8,876

Resistina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	3644	6326	2836	2103,5
2	5185	4595	2410,5	2167
3	6512	3151	1726	2728
4	6406	3377	2300	1298
5	7025,5	3385	5718,5	2457
6	4959	7004,5	1707	1285
7			3529	2410
Média	5622	4640	2890	2064
DP	1259	1663	1399	565,8
EPM	513,8	678,8	528,8	213,9

Insulina (pg/mL)				
------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1059,5	1918	165	40
2	1447	721,5	24	38
3	282	971	83	46,5
4	994	889	29	38
5	2389	724	63	29
6	338	570,5	246	26
7			144	32
Média	1085	965,7	107,7	35,64
DP	780,2	487,2	81,17	7,052
EPM	318,5	198,9	30,68	2,665

Triglicerideos (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	53,666	77,89	115,53	167,301
2	42,505	48,086	151,212	176,326
3	54,319	62,572	72,16	209,844
4	51,232	44,791	49,51	128,473
5	68,984	41,347	58,594	102,795
6	47,937	41,169	64,086	65,392
7	51,024	47,551	68,895	50,757
8			206,337	145,067
Média	52,81	51,92	98,29	130,7
DP	8,167	13,54	55,35	55,2
EPM	3,087	5,117	19,57	19,52

Adiponectina (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	9,394	13,8955	9,4576	13,29805
2	10,33675	12,9247	11,549	15,4729
3	12,0475	12,3572	11,4031	15,735
4	16,2888	11,2866	11,7099	12,70535
5	19,06405	10,0756		13,6883
Média	13,43	12,11	11,04	14,18
DP	4,114	1,477	0,9146	1,349
EPM	1,84	0,6607	0,409	0,6035

NEFA (pg/mL)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap

1	178,474	276,761	257,348	292,388
2	134,18	258,873	429,078	325,962
3	209,814	178,237	310,968	268,432
4	187,272	244,745	235,064	331,506
5		198,221		
Média	177,4	231,4	308,1	304,6
DP	31,71	41,59	86,71	29,65
EPM	15,86	18,6	43,35	14,83

Tabelas 22. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 25, quanto à expressão gênica de *Agt* e *At1* no músculo de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Agt Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,198	1,358	1,874
2	1,161	1,409	1,387	1,352
3	0,879	1,079	1,733	1,711
4	0,859	1,424	1,768	1,8
5	0,93	1,209	0,949	1,086
Média	0,9658	1,264	1,439	1,565
DP	0,122	0,1485	0,3332	0,3342
EPM	0,05454	0,06642	0,149	0,1495

At1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,127	0,632	1,54
2	1,049	0,572	0,737	0,932
3	0,717	0,608	0,486	1,959
4	0,601	0,414	0,652	0,885
5	0,768		0,451	1,919
6	0,473			
Média	0,768	0,6803	0,5916	1,447
DP	0,2237	0,3095	0,1197	0,5183
EPM	0,09134	0,1548	0,05354	0,2318

Agt Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,639	0,75	2,148
2	1,279	1,094	1,1	1,477
3	1,472	1,338	1,802	1,225
4	1,762	1,67	1,012	1,726
5	1,485	1,639	0,758	1,675
6	1,943	1,188		2,485
Média	1,49	1,428	1,084	1,789
DP	0,3359	0,2549	0,4298	0,4573
EPM	0,1371	0,1041	0,1922	0,1867

At1 Músculo (expressão gênica)				
--------------------------------	--	--	--	--

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,244	0,954	1,311
2	1,474	1,036	1,069	1,518
3	0,81	1,416	1,658	1,346
4	1,268	1,275	1,627	1,324
5	1,795	1,171	1,134	1,535
6		1,194	0,749	
Média	1,269	1,223	1,199	1,407
DP	0,3879	0,1256	0,3681	0,1101
EPM	0,1735	0,05129	0,1503	0,04926

Tabelas 23. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 26, quanto à expressão gênica de *Agt* e *At1* no fígado de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Agt Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,106	1,044	1,496
2	1,033	1,053	1,969	1,947
3	1,149	1,543	1,426	2,126
4	1,633	1,381	2,011	2,027
5	1,15	1,447	1,16	2,183
Média	1,193	1,306	1,522	1,956
DP	0,2551	0,2155	0,4494	0,2726
EPM	0,1141	0,09635	0,201	0,1219

At1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,654	1,073	4,114
2	0,934	0,959	2,051	3,608
3	0,825	1,346	1,614	2,907
4	1,638	2,752	2,775	3,104
5	1,213	1,469	1,524	4,139
Média	1,122	1,636	1,807	3,574
DP	0,3213	0,6738	0,6428	0,5652
EPM	0,1437	0,3013	0,2875	0,2528

Agt Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,712	0,662	0,764
2	1,074	0,505	0,864	0,483
3	1,554	0,83	0,685	1,051
4	0,973	0,553	0,534	0,569
5	0,906	0,986	0,483	0,991
6	0,918	0,722	0,577	0,515
Média	1,071	0,718	0,6342	0,7288
DP	0,2444	0,1772	0,1359	0,2472
EPM	0,09976	0,07235	0,05548	0,1009

At1 Fígado (expressão gênica)				
-------------------------------	--	--	--	--

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,512	0,81	0,804
2	1,08	0,651	1,138	0,631
3	1,53	0,915	0,66	0,837
4	1,093	0,796	0,577	0,819
5	1,049	0,941	0,737	0,986
6	0,946	0,684	0,549	0,62
Média	1,116	0,7498	0,7452	0,7828
DP	0,2098	0,1653	0,2157	0,1382
EPM	0,08565	0,06748	0,08805	0,05643

Tabelas 24. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 27, quanto à expressão gênica de *Insr*, *irs1*, *ampk* e *glut4* no músculo de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Insr Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,014	0,835	1,121
2	0,838	0,584	0,993	1,698
3	0,893	0,777	0,75	0,978
4	0,69	0,641	0,964	1,589
5			0,582	
Média	0,8553	0,754	0,8248	1,347
DP	0,1291	0,1913	0,1676	0,3507
EPM	0,06454	0,09565	0,07494	0,1754

Irs1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,142	0,81	1,513
2	0,995	1,762	0,676	1,409
3	0,977	0,704	0,517	1,702
4	1,452	1,029	0,595	1,026
5	0,783	0,889	0,42	
Média	1,041	1,105	0,6036	1,413
DP	0,2467	0,4019	0,1493	0,2848
EPM	0,1103	0,1798	0,06676	0,1424

Ampk Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,199	1,484	1,907
2	1,052	1,186	1,187	1,428
3	0,928	1,136	1,141	1,492
4	1,12	1,098	1,624	1,697
5	0,984	1,136	1,077	1,414
Média	1,017	1,151	1,303	1,588
DP	0,07269	0,04119	0,238	0,2114
EPM	0,03251	0,01842	0,1064	0,09453

Glut4 Músculo (expressão gênica)				
----------------------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,964	0,502	0,492
2	1,249	0,987	0,559	0,263
3	0,757	0,641	0,431	0,555
4	0,782	0,504	0,347	0,355
5			0,281	
Média	0,947	0,774	0,424	0,4163
DP	0,229	0,2395	0,1126	0,1319
EPM	0,1145	0,1197	0,05037	0,06597

Insr Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,667	1,466	1,956
2	1,319	1,165	1,624	1,679
3	1,541	1,572	2,486	1,219
4	2,212	1,375	1,704	1,805
5	1,834	1,381	1,006	1,582
6	2,024	1,486		2,224
Média	1,655	1,441	1,657	1,744
DP	0,4546	0,1757	0,5364	0,3421
EPM	0,1856	0,07174	0,2399	0,1397

Irs1Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,895	2,659	3,507
2	1,56	1,272	2,029	2,089
3	1,619	1,502	2,459	1,961
4	1,318	1,993	3,119	2,085
5	1,766	1,648	1,863	2,089
6				2,019
Média	1,453	1,462	2,426	2,292
DP	0,3002	0,411	0,5025	0,5976
EPM	0,1342	0,1838	0,2247	0,244

Ampk Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap

1	1	2,996	1,906	2,125
2	2,434	2,022	1,801	2,588
3	1,83	2,637	1,319	1,948
4	3,21	1,566	3,076	2,083
5	1,881	2,271	2,154	1,89
6	3,628	2,409	1,803	2,174
Média	2,331	2,317	2,01	2,135
DP	0,9686	0,495	0,5885	0,2468
EPM	0,3954	0,2021	0,2403	0,1008

Tabelas 25. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 28, quanto à expressão protéica de pAKT e pAMPK em músculos de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

pAKT/tAKT Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,4	0,5	0,2	0,2
2	0,3	0,3	0,5	0,5
3	0,2	0,3	0,1	0,1
4	0,2	0,4	0,3	0,3
Média	0,275	0,375	0,275	0,275
DP	0,09574	0,09574	0,1708	0,1708
EPM	0,04787	0,04787	0,08539	0,08539

pAMPK/AMPK Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,209489	0,2295359	0,187063	0,237156
2	0,212044	0,4227488	0,262633	0,4609666
3	0,187234	0,07567567	0,121552	0,3910828
4	0,14	0,06666667	0,106306	0,2034446
5				0,2449275
Média	0,1872	0,1987	0,1694	0,3075
DP	0,03338	0,167	0,07136	0,1121
EPM	0,01669	0,08352	0,03568	0,05011

pAKT/tAKT Músculo				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0	0,1	0,1	0,1
2	0,6	0,6	1,1	0,9
3	0,3	0,7	0,5	0,8
4	0,1	0,1	0,1	0
5	0,1	0,1	0,1	0,1
Média	0,22	0,32	0,38	0,38
DP	0,2387	0,3033	0,4382	0,4324
EPM	0,1068	0,1356	0,196	0,1934

pAMPK/AMPK Músculo				
--------------------	--	--	--	--

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0,039706	0,01036745	0,242953	0,1502415
2	1,612121	1,371287	1,018957	0,341853
3	1,208333	1,216981	0,41958	0,8600823
4	0,207345	0,1666667	0,309598	0,1297727
5	0,175708	0,3268608		0,2336066
Média	0,6486	0,6184	0,4978	0,3431
DP	0,7125	0,6293	0,355	0,3008
EPM	0,3187	0,2814	0,1775	0,1345

Tabelas 26. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 29, quanto à expressão gênica de *Insr*, *irs1* e *ampk* no fígado de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Insr Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,314	1,339	2,042
2	1,145	1,175	1,899	2,143
3	1,239	1,612	1,628	1,934
4	2,228	2,167	1,949	2,002
5	1,356	1,611	1,981	2,549
Média	1,394	1,576	1,759	2,134
DP	0,4843	0,3812	0,2732	0,244
EPM	0,2166	0,1705	0,1222	0,1091

Irs1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	3,086	2,277	3,644
2	0,97	1,98	2,387	3,338
3	0,889	3,078	2,97	4,497
4	2,145	3,479	2,428	4,656
5	1,816	2,163		4,965
Média	1,364	2,757	2,516	4,22
DP	0,5761	0,6498	0,3096	0,6949
EPM	0,2576	0,2906	0,1548	0,3108

Ampk Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,797	1,755	1,845
2	1,262	2,012	2,644	2,086
3	1,736	2,616	1,984	1,779
4	1,931	2,765	1,881	2,146
5		2,424	2,166	2,443
Média	1,482	2,323	2,086	2,06
DP	0,4269	0,4077	0,3463	0,2646
EPM	0,2135	0,1823	0,1549	0,1183

Insr Fígado (expressão gênica)				
--------------------------------	--	--	--	--

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,537	0,658	0,672
2	1,179	0,63	0,715	0,416
3	1,73	1,072	0,508	0,678
4	1,082	0,684	0,545	0,616
5	0,993	1,026	0,612	0,787
6	1,021	0,723	0,522	0,472
Média	1,168	0,7787	0,5933	0,6068
DP	0,2842	0,219	0,08251	0,1389
EPM	0,116	0,0894	0,03368	0,0567

Irs1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,946	0,911	1,35
2	1,421	1,399	1,036	0,52
3	2,509	1,293	0,742	1,279
4	2,332	1,19	0,558	0,799
5	1,191	1,094	0,807	1,524
6	1,478	1,011	0,797	0,551
Média	1,655	1,156	0,8085	1,004
DP	0,6194	0,172	0,161	0,4353
EPM	0,2529	0,07022	0,06572	0,1777

Ampk Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,093	0,361	0,642
2	1,313	0,829	0,461	0,269
3	2,534	1,227	0,634	0,751
4	1,352	0,585	0,287	0,465
5	1,199	1,246	0,415	0,649
6	2,9	1,737	0,519	0,373
Média	1,716	1,12	0,4462	0,5248
DP	0,7932	0,3949	0,122	0,1857
EPM	0,3238	0,1612	0,04979	0,0758

Tabelas 27. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 30, quanto à expressão protéica de pAKT e pAMPK no fígado de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

pAKT/tAKT Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0	0	0,1	0,1
2	0,5	0,5	0,6	0,4
3	0,3	0,4	0,8	0,3
4	0,2	0,4	0,3	0,3
5				0,8
Média	0,25	0,325	0,45	0,38
DP	0,2082	0,2217	0,3109	0,2588
EPM	0,1041	0,1109	0,1555	0,1158

pAMPK/AMPK Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	6,615776	5,252388	7,672514	6,483871
2	0,97769	1,824561	1,035503	0,6648352
3	2,7393	6,107784	6,024518	3,715596
4	0,758865	2,361842	1,333333	0,6693227
5	14,5	10,40816	5,701357	8,78125
Média	5,118	5,191	4,353	4,063
DP	5,746	3,442	2,99	3,581
EPM	2,57	1,539	1,337	1,602

pAKT/tAKT Fígado				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0,1	0,2	0,2	0,1
2	0,6	1,6	1,7	1,3
3	0,1	0,2	0,1	0,1
4	0,3	0,3	0,2	0,2
Média	0,275	0,575	0,55	0,425
DP	0,2363	0,685	0,7681	0,5852
EPM	0,1181	0,3425	0,3841	0,2926

pAMPK/AMPK Fígado				
-------------------	--	--	--	--

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	2,193182	2,262195	2,005848	1,949367
2	3,778751	2,806818	3,299712	1,200837
3	0,419149	0,4617414	0,265038	0,163752
4	0,423913	0,5703971	0,345378	0,5631263
Média	1,704	1,525	1,479	0,9693
DP	1,616	1,187	1,455	0,7806
EPM	0,8079	0,5936	0,7275	0,3903

Tabelas 28. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 31, quanto à expressão gênica de *beclin1*, *atg5*, *atg7*, *atg12*, *atg14* e *lc3* no músculo de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Beclin1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,147	0,998	1,376
2	0,956	0,604	0,922	1,46
3	0,989	0,824	0,987	1,222
4	0,72	0,725	0,679	1,392
5	0,652			
6	0,702			
Média	0,8365	0,825	0,8965	1,363
DP	0,1612	0,2328	0,1488	0,1005
EPM	0,06582	0,1164	0,07441	0,05025

Atg5 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,277	0,69	1,19
2	1,149	1,078	0,571	1,231
3	0,967	0,535	0,589	0,888
4	0,828	0,632	0,466	0,993
5	0,587	0,557		
Média	0,9062	0,8158	0,579	1,076
DP	0,2118	0,3395	0,09175	0,1625
EPM	0,09472	0,1518	0,04587	0,08127

Atg7 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,089	1,272	1,277
2	0,953	1,256	1,053	0,914
3	1,032	1,051	1,126	1
4	0,918	1,125	1,281	1,36
5	1,227		0,976	1,018
Média	1,026	1,13	1,142	1,114
DP	0,1205	0,08911	0,1341	0,1932
EPM	0,0539	0,04456	0,05998	0,0864

Atg12 Músculo (expressão gênica)				
----------------------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,114	0,71	1,014
2	1,073	0,926	0,773	0,976
3	0,839	0,577	0,603	0,799
4	0,846	0,735	0,548	0,944
5	0,561	0,632	0,459	
6	0,502			
7	0,484			
Média	0,7579	0,7968	0,6186	0,9333
DP	0,242	0,2217	0,1254	0,09396
EPM	0,09148	0,09915	0,05608	0,04698

Atg14 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,374	1,43	1,755
2	0,921	1,001	1,02	1,209
3	0,835	0,949	0,535	1,499
4	1,048	0,823	1,797	1,944
5	0,914	1,206	1,144	1,592
6	0,854			
7	0,846			
Média	0,9169	1,071	1,185	1,6
DP	0,08145	0,2187	0,4706	0,2764
EPM	0,03079	0,09781	0,2105	0,1236

Lc3 Músculo (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,165	0,66	1,444
2	1,231	1,032	1,076	
3	0,887	0,577	0,755	1,746
4	0,57	0,837	1,068	1,194
5	0,456	0,705	0,478	1,437
6	0,494			
Média	0,773	0,8632	0,8074	1,455
DP	0,3143	0,2383	0,2613	0,226
EPM	0,1283	0,1066	0,1168	0,113

Beclin1 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap

1	1	1,854	1,548	1,931
2	1,402	1,244	1,646	1,637
3	1,414	1,701	2,559	1,501
4	2,285	1,461	2,534	1,906
5	1,718	1,54	1,872	1,55
6	2,062	1,465	1,21	2,784
Média	1,647	1,544	1,895	1,885
DP	0,4727	0,2116	0,548	0,4758
EPM	0,193	0,08639	0,2237	0,1942

Atg5 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	2,046	1,595	1,893
2	1,417	1,225	1,67	1,87
3	1,565	1,709	2,733	1,522
4	2,355	1,523	2,616	2,442
5	1,889	1,65	2,054	1,629
6	2,193	1,448	1,301	2,483
Média	1,737	1,6	1,995	1,973
DP	0,5076	0,2768	0,5798	0,4047
EPM	0,2072	0,113	0,2367	0,1652

Atg7 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,527	1,265	1,54
2	0,965	1,108	1,221	1,28
3	1,376	1,395	1,158	1,119
4	1,989	1,225	1,873	1,556
5	1,473	1,324	1,469	1,508
6	1,926	1,288	0,974	1,454
Média	1,455	1,311	1,327	1,41
DP	0,4383	0,1435	0,3119	0,174
EPM	0,1789	0,0586	0,1273	0,07102

Atg12 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	2,086	1,537	1,76

2	1,478	1,227	1,574	1,863
3	1,412	1,917	2,283	1,689
4	2,426	1,486	2,328	2,464
5	1,737	1,763	1,881	1,575
6	2,127	1,541	1,414	2,72
Média	1,697	1,67	1,836	2,012
DP	0,5163	0,3129	0,395	0,4662
EPM	0,2108	0,1277	0,1612	0,1903

Atg14 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,958	1,648	1,964
2	1,278	1,319	1,666	1,959
3	1,638	2,01	2,375	1,361
4	2,388	1,28	2,445	2,325
5	1,872	1,284	2,104	1,893
6	2,367	1,695	1,219	3,208
Média	1,757	1,591	1,91	2,118
DP	0,5657	0,3424	0,4787	0,617
EPM	0,231	0,1398	0,1954	0,2519

Lc3 Músculo (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	1,807	1,523	2,074
2	1,383	1,321	1,608	1,645
3	1,684	1,582	2,464	1,427
4	2,43	1,548	2,464	2,107
5	1,937	1,719	1,812	1,875
6	2,104	1,555	1,105	2,461
Média	1,756	1,589	1,829	1,932
DP	0,5146	0,1668	0,5428	0,3664
EPM	0,2101	0,0681	0,2216	0,1496

Tabelas 29. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 32, quanto à expressão protéica de pmTOR e LC3 em músculos de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

pmTOR/mTOR Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,5	0,4654378	0,360318	0,3839416
2	1,17033	1,426667	1,113074	1,328502
3	0,441177	0,4464912	0,35302	0,4097331
4	0,891429	0,8848921	0,8	1,09322
5	0,253707	0,2755102	0,276106	0,2291372
Média	0,6513	0,6998	0,5805	0,6889
DP	0,3715	0,4641	0,3622	0,4886
EPM	0,1662	0,2076	0,162	0,2185

LC3/TBP Músculo				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,289831	0,2238095	0,392211	0,3731138
2	0,805654	0,4465786	1,052308	0,856492
3	0,247261	0,2819957	0,252492	0,3529412
4	0,804878	0,5916399	0,733766	0,7758621
5	0,01065	0,03655914	0,027896	0,03391877
Média	0,4317	0,3161	0,4917	0,4785
DP	0,3573	0,2126	0,4047	0,3376
EPM	0,1598	0,09507	0,181	0,151

pmTOR/mTOR Músculo				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0,112736	0,1295858	0,107552	0,1048638
2	0,27533	0,2955752	0,237363	0,4291339
3	0,27673	0,4351852	0,344086	0,226738
4	0,213793	0,1810491	0,156118	0,2831461
5	0,246907	0,2370744	0,325088	0,3369963
Média	0,2251	0,2557	0,234	0,2762
DP	0,06786	0,1179	0,1031	0,1214
EPM	0,03035	0,05274	0,04609	0,05428

LC3/TBP Músculo

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0,035535	0,06724565	0,047628	0,06086331
2	0,055916	0,03167939	0,043069	0,03900293
3	0,038614	0,04410058	0,04	0,07379679
4	0,053636	0,0789916	0,062782	0,1085575
5	0,070297	0,09909502	0,093511	0,1553977
Média	0,0508	0,06422	0,0574	0,08752
DP	0,01411	0,02696	0,022	0,04556
EPM	0,006308	0,01206	0,00984	0,02037

Tabelas 30. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 33, quanto à expressão gênica de *beclin1*, *atg5*, *atg7*, *atg12*, *atg14* e *lc3* no fígado de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

Beclin1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,373	1,546	1,919
2	1,274	1,323	1,78	1,845
3	1,179	1,829	1,787	1,86
4	1,57	1,739	2,061	1,956
5				2,363
Média	1,256	1,566	1,794	1,989
DP	0,2383	0,2552	0,2106	0,214
EPM	0,1192	0,1276	0,1053	0,09572

Atg5 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,657	2,002	2,999
2	1,199	1,44	2,905	3,035
3	1,371	1,836	2,384	3,269
4	2,618	3,454	2,722	2,982
5	1,835	2,095	2,217	3,645
Média	1,605	2,096	2,446	3,186
DP	0,6451	0,7961	0,3675	0,2815
EPM	0,2885	0,356	0,1644	0,1259

Atg7 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,266	1,72	2,188
2	1,073	1,19	2,191	2,717
3	1,177	1,571	2,15	2,37
4	1,747	1,511	1,996	2,228
5	1,347	1,716	1,684	2,102
Média	1,269	1,451	1,948	2,321
DP	0,2974	0,2183	0,2366	0,2416
EPM	0,133	0,09761	0,1058	0,1081

Atg12 Fígado (expressão gênica)				
---------------------------------	--	--	--	--

Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,792	2,014	2,845
2	1,422	1,596	3,371	2,864
3	1,298	2,13	2,357	3,325
4	2,44	2,793	2,95	3,37
5	1,711	2,195	2,43	4,024
Média	1,574	2,101	2,624	3,286
DP	0,5471	0,458	0,5351	0,4811
EPM	0,2447	0,2048	0,2393	0,2151

Atg14 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	0,927	1,236	1,576
2	1,083	0,869	2,381	1,625
3	1,37	1,078	1,389	1,594
4	1,795	2,199	2,171	1,389
5	1,008	1,511	1,678	2,562
Média	1,251	1,317	1,771	1,749
DP	0,3393	0,5535	0,4932	0,4637
EPM	0,1517	0,2475	0,2206	0,2074

Lc3 Fígado (expressão gênica)				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,529	1,086	1,793
2	1,117	1,033	1,67	1,673
3	0,932	1,356	1,069	1,196
4	2,023	2,258	1,102	1,429
5	1,527	1,378	1,594	2,198
Média	1,32	1,511	1,304	1,658
DP	0,4559	0,4551	0,3007	0,3795
EPM	0,2039	0,2035	0,1345	0,1697

Beclin1 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap

1	1	0,921	0,663	0,704
2	1,225	0,889	0,821	0,343
3	1,602	1,041	0,706	0,903
4	1,405	0,923	0,468	0,539
5	0,985	1,115	0,547	0,773
6	1,273	0,841	0,571	0,588
Média	1,248	0,955	0,6293	0,6417
DP	0,2374	0,1025	0,1265	0,196
EPM	0,09692	0,04184	0,05163	0,08001

Atg5 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,655	0,494	0,394
2	1,019	0,758	0,58	0,248
3	1,632	0,963	0,598	0,628
4	1,126	0,7	0,371	0,399
5	0,79	0,775	0,405	0,615
6	1,356	0,651	0,432	0,354
Média	1,154	0,7503	0,48	0,4397
DP	0,2982	0,1161	0,09373	0,151
EPM	0,1217	0,04739	0,03827	0,06165

Atg7 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,734	0,571	0,571
2	1,439	0,791	0,911	0,39
3	1,997	0,95	0,696	0,793
4	0,99	0,71	0,393	0,584
5	0,995	0,979	0,569	0,998
6	1,12	0,615	0,706	0,525
Média	1,257	0,7965	0,641	0,6435
DP	0,4014	0,1423	0,1742	0,2169
EPM	0,1639	0,05809	0,07112	0,08853

Atg12 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,74	0,599	0,53

2	1,416	0,838	0,709	0,296
3	1,698	0,972	0,842	0,813
4	0,985	0,708	0,396	0,571
5	1,21	0,888	0,43	0,768
6	1,13	0,734	0,537	0,494
Média	1,24	0,8133	0,5855	0,5787
DP	0,2744	0,104	0,1695	0,1899
EPM	0,112	0,04248	0,0692	0,07751

Atg14 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,767	0,858	0,979
2	1,172	0,624	0,863	0,616
3	1,34	1,06	0,948	0,996
4	0,935	0,874	0,655	0,791
5	1,027	1,367	0,715	0,956
6	1,195	0,96	0,725	0,718
Média	1,112	0,942	0,794	0,8427
DP	0,1507	0,2574	0,1122	0,1578
EPM	0,06153	0,1051	0,04579	0,06443

Lc3 Fígado (expressão gênica)				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1	0,563	0,6	0,52
2	0,879	0,635	0,691	0,305
3	1,675	0,762	0,449	0,917
4	1,029	0,743	0,347	0,49
5	0,8	0,951	0,501	0,669
6	0,855	0,599	0,411	0,399
Média	1,04	0,7088	0,4998	0,55
DP	0,3233	0,1424	0,1268	0,2173
EPM	0,132	0,05814	0,05177	0,08873

Tabelas 31. Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) referentes à figura 34, quanto à expressão protéica de pmTOR e LC3 no fígado de camundongos DT1 e obesos da seção resultados parte III.

pmTOR/mTOR Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	1	1,07772	1,006098	0,9123197
2	0,354067	0,3117932	0,337456	0,3427283
3	1,701913	1,899225	1,609195	1,490515
4	0,25916	0,2970297	0,263415	0,2572707
5	2,512563	2,976	3,127109	3,105263
Média	1,166	1,312	1,269	1,222
DP	0,9499	1,14	1,174	1,164
EPM	0,4248	0,5099	0,5252	0,5205

LC3/TBP Fígado				
Animal	Wt	Cap	DT1	DT1+Cap
1	0,142163	0,1377609	0,060345	0,07275098
2	0,3565	0,159306	0,072319	0,0457346
3	0,062791	0,05127273	0,016306	0,01498747
4	0,046951	0,03809524	0,026872	0,02981482
5	0,482258	0,3337037	0,205792	0,09382716
Média	0,2181	0,144	0,07633	0,05142
DP	0,1924	0,1184	0,07596	0,03194
EPM	0,08606	0,05295	0,03397	0,01428

pmTOR/mTOR Fígado				
Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	1,264957	1,262136	1,540984	1,409938
2	0,958824	0,9054326	0,995496	0,873057
3	1,130435	1,255663	1,145161	0,9683544
4	0,860294	0,8272251	0,929825	0,9846939
Média	1,054	1,063	1,153	1,059
DP	0,1797	0,2289	0,274	0,2391
EPM	0,08987	0,1145	0,137	0,1195

LC3/TBP Fígado

Animal	HFD	Agt-Tg HFD	HFD+Cap	Agt-Tg HFD+Cap
1	0,003242	0,0031626	0,002547	0,004127273
2	0,02546	0,01932886	0,019188	0,0201227
3	0,017306	0,00630081	0,007172	0,02285156
4	0,013212	0,00760369	0,009744	0,01028571
5	0,007818	0,00907515	0,007606	0,005308108
Média	0,01341	0,009094	0,009251	0,01254
DP	0,008589	0,006123	0,006143	0,008544
EPM	0,003841	0,002738	0,002747	0,003821