



Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular



Mariana Alves Passos

Efeitos da ingestão de uma dieta rica em sacarose sobre o estresse oxidativo e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado de camundongos SWISS

Monografia de Graduação

Ouro Preto, 2024

Mariana Alves Passos

Efeitos da ingestão da dieta rica em sacarose sobre o estresse oxidativo e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado de camundongo SWISS

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – Departamento de Ciências Biológicas – da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ouro Preto

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P289e Passos, Mariana Alves.

Efeitos da ingestão de uma dieta rica em sacarose sobre o estresse oxidativo e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado de camundongos SWISS. [manuscrito] / Mariana Alves Passos. et al. - 2024. 38 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Gomes.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Fígado. 2. Dieta rica em sacarose. 3. Metaloproteinases 2 e 9. 4. Estresse oxidativo. 5. AKT. 6. Sinalização da insulina. I. Ceron, Carla. II. De Deus, Isabela. III. Gomes, Sílvia. IV. Gomes, Sílvia. V. Universidade Federal de Ouro Preto. VI. Título.

CDU 577.1

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Alves Passos

Efeitos da ingestão de uma dieta rica em sacarose sobre o estresse oxidativo e a atividade das metaloproteínas 2 e 9 no fígado de camundongos Swiss

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel

Aprovada em 10 de outubro de 2024

Membros da banca

Drª Sílvia de Paula Gomes - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Drª Carla Speroni Ceron - Universidade Federal de Ouro Preto
Ms. Isabela Jesus de Deus - Universidade Federal de Ouro Preto

Sílvia de Paula Gomes, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 20/02/2025



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia de Paula Gomes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/02/2025, às 19:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0862880** e o código CRC **516C406D**.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Flávio e Janaína, que foram fonte de amor e sabedoria, e sempre estiveram ao meu lado, principalmente me apoiando em todos os altos e baixos. Sem eles, nada disso seria possível. Ao meu irmão, Guilherme, que trouxe alegria e luz às nossas vidas, obrigada pela paciência comigo ao longo desses anos. Agradeço ao Wellington por todo o apoio e suporte longe de casa, por estar comigo nos momentos bons ou ruins e por tantas lindas memórias criadas durante esses anos. A vida sem vocês não seria a mesma. Agradeço à minha avó, Ivete (*in memoriam*), que foi meu maior exemplo na educação, minha carreira acadêmica foi e será em homenagem a ela: “Te amo, sinto muito e sou grata.”

Agradeço ao meu lar Mistura Perfeita por todos os momentos de alívio em meio a todo o caos nesses anos de graduação. Vocês são minha estrela da sorte. Às minhas colegas de curso: Gi, Sofi, Lud, e à minha dupla dinâmica, Laura, deixo minha gratidão. Vocês deixaram a universidade mais leve, estarei sempre vibrando por suas conquistas.

Agradeço à minha orientadora, Sílvia, por todo o ensinamento e paciência durante esses anos de LBBM, esse aprendizado foi um privilégio. Agradeço aos colaboradores do projeto, em especial: Prof^a Carla Speroni, Prof^o Wanderson Geraldo Lima, Prof^a Karina Barbosa de Queiroz, Miliane Martins e Isabela Jesus de Deus. Esse trabalho não seria possível sem o apoio de vocês.

Por fim, agradeço à UFOP pelo ensino público de qualidade e à FAPEMIG (APQ 02029-21) pelo auxílio financeiro e apoio oferecido ao projeto. Ao Centro de Ciências Animal - CCA (FINEP e FAPEMIG - APQ 02511-22) pelo fornecimento dos animais e apoio técnico sempre que solicitado.

Resumo

O aumento da ingestão de dietas ricas em açúcar tem sido associado com o desenvolvimento de diferentes patologias, tais como a obesidade, a diabetes e as alterações cardiovasculares e hepáticas. Estudos recentes têm demonstrado que o alto consumo de dieta rica em sacarose aumenta consideravelmente o estresse oxidativo em diferentes tecidos. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da ingestão dessa dieta na atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão de uma dieta rica em sacarose na atividade das metaloproteinases (MMP) 2 e 9 e estresse oxidativo no fígado. Para isso, camundongos SWISS foram alimentados com uma dieta rica em sacarose por 4 semanas. Os resultados obtidos mostraram claramente que a dieta promoveu a instalação do estresse oxidativo, uma vez que foi observado em 4 semanas, uma redução na atividade da catalase (CAT) (30,5%) e na concentração da glutatona reduzida (GSH) (65%), resultando em aumento da concentração das proteínas carboniladas (PCO) (65%) e das substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (116%). Além disso, a dieta promoveu um aumento de 38% na atividade da MMP 9 no fígado. Adicionalmente, foi observada uma redução de 71,5% na fosforilação da proteína quinase B (AKT) em seu resíduo serina 473, indicando que a dieta foi capaz de acarretar prejuízos na via de sinalização da insulina. Portanto, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a ingestão de uma dieta rica em sacarose promoveu a instalação de um quadro de estresse oxidativo e perda da sinalização da insulina no fígado, o que resultou na ativação da MMP 9.

Palavras-chaves: fígado, dieta rica em sacarose, metaloproteinases 2 e 9, estresse oxidativo, sinalização da insulina, AKT.

Abstract

The increased intake of diets rich in sugar has been associated with the development of different pathologies, such as obesity, diabetes and cardiovascular and hepatic alterations. Recent studies have shown that high consumption of a diet rich in sucrose considerably increases oxidative stress in different tissues. However, little is known about the effect of eating this diet on the activity of metalloproteinases 2 and 9 in the liver. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of eating a diet rich in sucrose on the activity of metalloproteinases (MMP) 2 and 9 and oxidative stress in the liver. To this end, SWISS mice were fed a high sucrose diet for 4 weeks. The results obtained clearly showed that the diet promoted the onset of oxidative stress, since a reduction in catalase (CAT) activity (30.5%) and in the concentration of reduced glutathione (GSH) (65%) was observed over 4 weeks, resulting in an increase in the concentration of carbonylated proteins (PCO) (65%) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (116%). In addition, the diet promoted a 38% increase in MMP 9 activity in the liver. In addition, a 71.5% reduction was observed in the phosphorylation of protein kinase B (AKT) at its serine 473, This indicates that the diet was capable of damaging the insulin signaling pathway. Therefore, the data obtained in this study suggest that eating a diet rich in sucrose led to oxidative stress and loss of insulin signaling in the liver, which resulted in the activation of MMP 9.

Keywords: liver, high sucrose diet, metalloproteinases 2 and 9, oxidative stress, insulin signaling, AKT.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Fluxograma: Distribuição dos animais nos dois grupos experimentais	17
Figura 2 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre o ganho de massa corporal e ingestão alimentar /24h após 4 semanas	24
Figura 3 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os massas dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal após 4 semanas	25
Figura 4 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os massas do fígado, coração e rim após 4 semanas	26
Figura 5 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os parâmetros glicometabólicos após 4 semanas.....	27
Figura 6 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a defesa antioxidante no fígado após 4 semanas.....	28
Figura 7 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os biomarcadores de estresse oxidativo no fígado após 4 semanas.....	29
Figura 8 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado após 4 semanas	30
Figura 9 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a fosforilação da AKT em resíduo de serina 473 no fígado após 4 semanas	31
Figura 10 – Fluxograma resumo.....	31

Lista de abreviaturas e siglas

AKT	Proteína quinase B (<i>Protein Kinase B</i>)
CCA	Centro de Ciência Animal
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
ENUT	Escola de nutrição
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GSH	Glutathione reduzida
kDa	Kilodaltons
MMP	Metaloproteinases de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)
PCO	Proteína carbonilada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase (Phosphoinositide 3-kinase)
RI	Resistência à insulina
Ser473	Serina 473
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)

Thr308	Treonina 308
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase (<i>Tissue Inhibitor of Metallopro-</i> <i>teinases</i>)
UA	Unidades arbitrárias
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO GERAL	16
2.1	Objetivos Específicos	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	Quantificação da massa corporal e ingestão alimentar	19
3.2	Coleta de sangue, tecidos e tibia	19
3.3	Dosagens bioquímicas	19
3.3.1	Glicemia	19
3.3.2	Colesterol Total	19
3.3.3	Triglicerídeos	20
3.4	Determinação de Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico(TBARS).....	20
3.5	Determinação de Proteínas Carbonizadas (PCO).....	20
3.6	Atividade da Enzima Catalase(CAT).....	21
3.7	Atividade da Enzima Superóxido Dismutase(SOD)	21
3.8	Atividade da Glutathione Reduzida (GSH).....	21
3.9	Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 através da técnica de zimografia.....	22
3.10	Análise de conteúdo proteico de proteína quinase B (AKT) em resíduos de serina 473 via <i>Western blot</i>	22
3.11	Análise Estatística	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Massa corporal e ingestão alimentar	24
4.2	Massas dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal	25
4.3	Massas do coração, fígado e rim.....	25
4.4	Parâmetros glicometabólicos: glicemia, triglicérides e colesterol total.....	26
4.5	Defesa antioxidante: superóxido dismutase, catalase e glutathione reduzida	27
4.5.1	Biomarcadores de estresse oxidativo: proteínas carboniladas (PCO) e substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	28
4.6	Atividade das metaloproteinases 2 e 9.....	29
4.7	Determinação da fosforilação da AKT em resíduo de serina e aAKT total	30
5	CONCLUSÃO	32

Referências	33
--------------------------	-----------

1 Introdução

Os carboidratos são macronutrientes encontrados em uma diversidade de alimentos na dieta e são responsáveis por fornecer energia para manter a homeostase do organismo (WITEK; WYDRA; FILIP, 2022). Os carboidratos simples são compostos pelos monossacarídeos e/ou dissacarídeos (uma ou duas moléculas de açúcar, respectivamente) (CLEMETE-SUÁRES et al., 2022). Eles estão presentes na dieta, como por exemplo, no açúcar, arroz, massas e frutas. A dieta rica em Sacarose é composta em partes pela sacarose que é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de frutose e é conhecido como o açúcar de mesa (ENG; ESTALL, 2021).

Os carboidratos são moléculas envolvidas em diferentes vias metabólicas, incluindo a formação de adenosinatrifosfato (ATP), a principal moeda de pagamento de todas as reações do organismo, na sinalização celular, na síntese do glicogênio e na síntese de ácidos graxos (CHANDEL, 2021). Portanto, alterar demasiadamente a ingestão de carboidratos pode acarretar alterações metabólicas nestes processos e, por consequência, promover o surgimento de algumas patologias tais como distúrbios metabólicos, cardiovasculares, hepáticos e até nervosos (WITEK; WYDRA; FILIP, 2022).

Após a ingestão, os carboidratos podem ser utilizados em diferentes vias metabólicas, uma delas é a oxidação na via glicolítica (glicólise), onde um dos produtos finais é o piruvato, que posteriormente é convertido em acetil-CoA. Em seguida, o acetil-CoA entra no ciclo de krebs, resultando posteriormente na síntese de ATP (BERG; BARCHUK; MIKSZTOWICZ, 2019). Entretanto, com os altos níveis de açúcar advindas da dieta, grande parte do excesso de acetil-CoA gerado é encaminhado para a síntese de ácidos graxos (lipogênese) principalmente no fígado e tecidos adiposos, e em seguida são armazenados em forma de triglicerídeos nos tecidos adiposos (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2017).

A ingestão excessiva de sacarose pode promover a alteração da expressão de diferentes genes que estão diretamente relacionados com o controle da homeostase celular e assim acarretar na desordem de diferentes processos metabólicos tais como: diminuição da glicólise (BAIGES-GAYA et al., 2020), da fosforilação oxidativa no fígado

(MALIK et al., 2019), aumento da lipogênese (BAIGES-GAYA et al., 2020); (MALIK et al., 2019), (ACOSTA-COTA et al., 2019), esteatose e inflamação hepática, fibrose (ACOSTA-COTA et al., 2019);(SIMÕES et al., 2020), resistência à insulina (RI) (LIU et al., 2018);(ROSINGER et al. 2017) e outros. Particularmente no fígado, o consumo excessivo de sacarose está diretamente ligado ao desenvolvimento de esteatose, fibrose hepática e outras alterações da homeostase hepática (SOFTIC et al., 2017).

O fígado é o órgão responsável por coordenar o metabolismo, promovendo a integração metabólica entre os tecidos e garantindo a homeostase do organismo (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Ele está envolvido na manutenção da homeostase lipídica, regulação do volume sanguíneo e principalmente no metabolismo de carboidratos (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). A manutenção da glicemia é uma das principais funções exercidas pelo fígado, visto que no estado alimentado ele distribui a glicose para todos tecidos e durante o jejum produz ou libera glicose pela gliconeogênese e quebra o glicogênio, respectivamente (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

O fígado é considerado o principal mediador da ação da insulina no organismo, atuando sobre a homeostase lipídica e da glicose. A homeostase está relacionada à via de fosfoinositídeo-3-fosfato quinase (PI3K)/Akt, que é a via clássica de sinalização da insulina (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). Durante a ativação da insulina na via PI3K ela estimula a fosforilação da proteína AKT em treonina 308 (Thr308) e serina 473 (Ser 473) e assim promove a ativação de diferentes vias metabólicas como a glicogênese, lipogênese e a glicólise. Quando ocorre uma desregulação dos níveis de fosforilação da AKT em serina como analisados no presente trabalho, ocorre um prejuízo na sinalização da insulina causando a resistência à insulina(RI) no fígado, impedindo a regulação da homeostase glicídica, resultando em hiperglicemia (SANTOLERI; TITCHENELL, 2019).

Nesse contexto, após o aumento da concentração de glicose, advindas de uma dieta rica em sacarose o corpo consegue converter esse excesso em ácidos graxos através da lipogênese e armazenar no tecido adiposo na forma de triglicerídeos (FERNÁNDEZ- SÁNCHEZ et al., 2011). Quando o pâncreas precisa liberar mais insulina para controlar a hiperglicemia é caracterizado como RI (PETERSEN et al., 2002). No fígado, órgão que recebe três vezes mais insulina do que outros tecidos, ela

tem a função de ativar a síntese de glicogênio, lipídios e proteínas, regulando processos como a lipogênese (CHERRINGTON; EDGERTON; SINDELAR, 1998) (FERMENTOS; BIRNBAUM, 2011). Ao desencadear RI, esses processos são afetados alterando a homeostase hepática.

No fígado, o excesso de ingestão de dieta rica em sacarose promove um quadro de estresse oxidativo caracterizado, pelo menos em parte, pelo o aumento exacerbado da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais promovem danos em diversas biomoléculas e, conseqüentemente, perda da funcionalidade. O estresse oxidativo é estabelecido a partir de um desequilíbrio entre as atividades oxidantes e antioxidantes do organismo ou pelo acúmulo das ERO e nitrogênio (ERN) (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). Durante a formação de ROS, as células geram moléculas com elétrons desemparelhados em sua camada de valência que formam os radicais livres que reagem com diferentes biomoléculas, sendo que os mais reativos são os radicais hidroxilas e o peroxinitrito a base de nitrogênio (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012).

As ERO são muito importantes no organismo e estão envolvidas em diferentes processos, tais como sinalização celular, defesa imunológica e regulação do metabolismo (JAKUBCZYK et al., 2020), (PENG, 2020), (SACHDEV et al., 2021). Além disso, elas desempenham um papel fundamental na regulação das funções mitocondriais, sendo as mitocôndrias uma das principais produtoras dessas espécies nas células (HERNANSANZ- AUGUSTÍN; EN-RÍQUEZ, 2021). A modulação adequada da produção de ERO é essencial para manter o equilíbrio redox intracelular, influenciando processos cruciais como apoptose e proliferação celular. No entanto, a superprodução de ERO por mitocôndrias disfuncionais pode resultar em problemas significativos, incluindo envelhecimento precoce e o desenvolvimento de doenças hepáticas, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (AKHIGBE; AJAYI, 2021) (MAILLOUX, 2015).

As principais fontes de produção de ERO são a cadeia respiratória mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e pelo sistema imunológico para controle de infecções (SIES; JONES, 2020). Já a defesa antioxidante do organismo é composta por componentes enzimáticos (como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) como também pelos não enzimáticos (betacaroteno, vitaminas C e E) (BARBOSA et al., 2010), além disso, a defesa antioxidante pode ocorrer através da glutathione reduzida,

um peptídeo capaz de doar elétrons para neutralização de elétrons livres. A diminuição da defesa redox torna as células susceptíveis as ERO. Como consequência, pode afetar a função e estrutura de várias moléculas, a exemplo da síntese de ATP. Entretanto, essas alterações podem ser reversíveis ou não (CICHOZ- LACH; MICHALAK, 2014).

Apesar dos efeitos deletérios acarretados pelo excesso de produção de ERO, elas também são necessárias na transdução de sinais e defesa do organismo, bem como na estimulação da expressão gênica. (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). Porém, o desequilíbrio redox leva a instalação de um quadro de estresse oxidativo que está interligado com o surgimento de várias patologias, dentre elas as hepáticas (APOSTOLOVA; BLAS- GARCIA; ESPLUGUES, 2011).

A desregulação das MMPs pode implicar em diversas complicações patológicas, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, inflamação crônica e complicações hepáticas (CABRAL- PACHECO et al., 2020). No fígado, tem sido observado que essas enzimas são ativadas após o desequilíbrio metabólico causado pelo aumento da ingestão de carboidratos ou de lipídeos (BERG et al., 2019), que promove um remodelamento da matriz extracelular. Com a presença de lesões no fígado a expressão das MMPs aumentam para controlar funções e quebra da matriz extracelular.

As MMP's são uma grande família de enzimas com 28 tipos, capazes de remodelar a matriz extracelular, alguns tipos são ativadas através de estresse oxidativo ou por inflamação (JAOUDE; KOH, 2016), (KANDASAMY et al., 2010). Elas desempenham um papel crucial em processos fisiológicos, incluindo embriogênese, angiogênese e cicatrização de feridas, sendo secretadas por diversas células, como endoteliais, osteoblastos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (MACCOLL; KHALIL, 2015). A classificação das MMPs abrange diferentes grupos, as principais são as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10) e matrilisinas (MMP-7 e 26) (ALMEIDA et al, 2022). As MMPs compartilham uma estrutura semelhante entre suas isoformas, elas possuem um sítio catalítico, contendo um íon zinco para a atividade enzimática. Além disso, cada MMP possui um pró-peptídeo, conectado ao sítio catalítico por uma ligação de ponte de dissulfeto. As gelatinases apesar da estrutura semelhante em comparação com as outras isoformas, possuem domínios adicionais, como o de fibronectina tipo II e o de hemopexina, sendo

essenciais na ligação com a gelatina (LARONHA; CALDEIRA, 2020), (DAS; AMIN; JHA, 2021).

As MMPs são reguladas endogenamente pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs), os quais atuam como os principais inibidores da atividade das MMPs, mantendo assim o equilíbrio na degradação e remodelação da matriz extracelular (QUINTERO- FABIÁN et al., 2019). Existem quatro tipos de TIMPs, conhecidos como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Cada um desses TIMPs apresenta afinidades distintas por diferentes tipos de MMPs, refletindo sua capacidade de regular especificamente a atividade dessas enzimas proteolíticas (CABRAL-PACHECO et al., 2020). Entretanto, também podem ser reguladas pela α_2 -Macroglobulina que é encontrada de maneira abundante nos fluídos corporais e atuam de maneira a inativar as MMP's. (Grinnell et al., 1998)

As isoformas 2 e 9 são gelatinases responsáveis pela degradação do colágeno e gelatina (LARONHA; CALDEIRA, 2020). A MMP-2 é um gelatinase de 72 kDa e está presente em praticamente todas as células. Ela é secretada como um zimogênio inativo conhecido como pró-MMP-2 e é ativada pela clivagem proteolítica do seu domínio propeptídeo principalmente pela MMP 14 e também de forma não proteolítica, devido ao estresse oxidativo, no qual o peróxido nítrico (ONOO-) ativa diretamente a MMP - 2 por meio da reação com o grupo cisteína pró-peptídeo, causando sua S-glutatiolação (VIAPPIANI et al., 2009). Já a MMP -9 é uma gelatinase de 92 kDa, responsável pela degradação de colágeno tipo I, III, IV e V; elastina; proteoglicanos e gelatina (BERGERS et al., 2000), (MATRISIAN, 1992). Ela é sintetizada e secretada como uma pró-enzima inativa e é ativada pela clivagem no resíduo de glutamato na posição 59, gerando um intermediário, que posteriormente é clivado no resíduo de arginina na posição 106. Seus principais ativadores podem ser outras MMPs como MMP-2, MMP - 3, MMP-13, MMP-17, MMP-26, enzimas proteolíticas, citocinas pró-inflamatórias e outros fatores externos, como interleucinas e fatores de crescimento, também podem estimular a produção e ativação da MMP-9 (Li et al, 2020; Mondal et al, 2020) e é inibida principalmente pela TIMP-1 (RODERFELD et al., 2007).

Com a presença de lesões no fígado a expressão das metaloproteinases (MMPs) aumentam para controlar funções e quebra da matriz extracelular. É descrito na literatura que as metaloproteinases estão diretamente relacionadas a vários estágios de patologias hepáticas, como lesões, inflamação e fibrose (BONNANS; CHOU; WERB,

2014), (TENÓRIO et al., 2012), (O’SULLIVAN; GILMER; MEDINA, 2015). A MMP 2 é expressa em várias células hepáticas, principalmente em células estreladas hepáticas e células de Kupffer, que são estudados em casos de fibrose hepática (TAKAHARA et al., 1997). Já a MMP 9, alguns estudos citam-a como marcador prognóstico de câncer de fígado, além disso, a atividade foi exacerbada em momentos de insuficiência hepática aguda e fulminante (FONSECA et al., 2017). Portanto, considerando que há poucos relatos na literatura sobre a importância das MMP’s 2 e 9 em fígado e que alguns trabalhos ressaltam a importância desse processo em diferentes situações patológicas, como por exemplo, na doença hepática gordurosa, tornou-se interessante investigar a atividade das MMPs 2 e 9 em fígado de camundongos SWISS. Nossa hipótese é que o consumo excessivo de açúcar pode promover um estresse oxidativo e um quadro de RI, culminando na ativação das MMPs 2 e 9. Para isto utilizamos o modelo experimental *in vivo* de ingestão de dieta rica em sacarose por 4 semanas

2 Objetivo Geral

Investigar *in vivo* os efeitos da ingestão da dieta rica em sacarose sobre o estresse oxidativo, atividade das metaloproteinases 2 e 9 e alterações na via clássica da insulina (AKT) no fígado de camundongos SWISS.

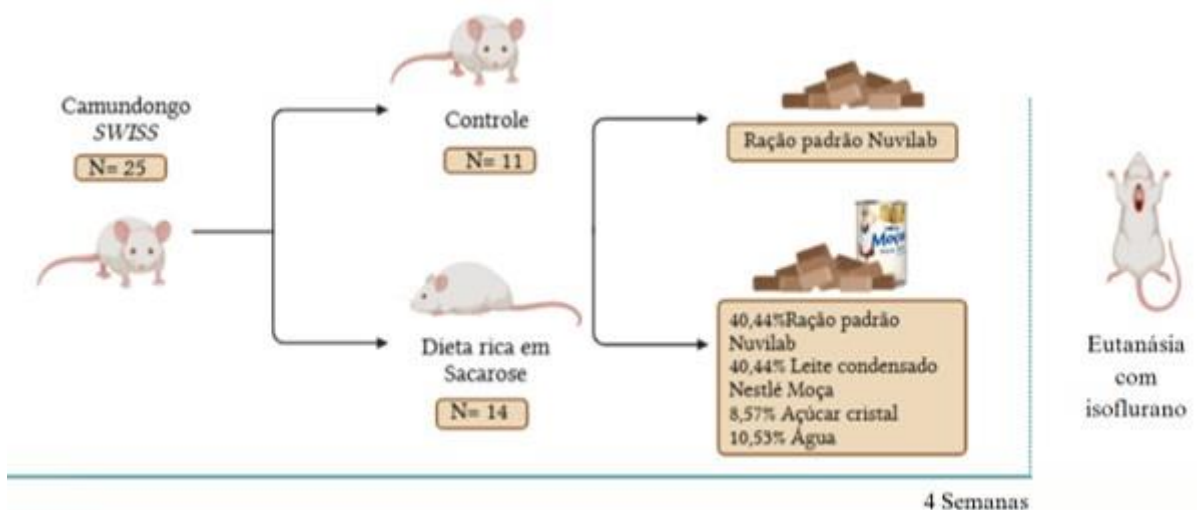
2.1 Objetivos Específicos

1. Determinar os parâmetros murinométricos (massa corporal, consumo alimentar, massa do fígado, coração, rim, adiposo retroperitoneal e epididimal);
2. Analisar os parâmetros bioquímicos (glicemia, colesterol total e triacilglicerol);
3. Avaliar a atividade antioxidante através das enzimas antioxidante superóxido dismutase, catalase e glutathione reduzida e os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo: proteínas carboniladas e as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
4. Analisar a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado;
5. Verificar a fosforilação da proteína quinase B (AKT) em resíduos de serina 473 no fígado.

3 Metodologia

Foram utilizados 25 camundongos SWISS (~20g) fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA – UFOP), sob protocolo CEUA: 7422050723. Os animais receberam uma dieta balanceada Nuvilab® CR1 - Nuvital (Nuvital-CR, Colombo, Brasil) para roedores e água *ad libitum* por 2 dias para ambientação. Após o período de ambientação, os animais foram separados em 2 grupos experimentais: Controle (dieta controle padrão NUVLAB CR1 - Nuvital) e Dieta rica em sacarose 30% (40,44% de ração comercial Nuvilab®, 40,44% de leite condensado Nestlé Moça, 8,57% de açúcar cristal e 10,53% de água (Oliveira *et al.*, 2020); (De Queiroz *et al.*, 2012), durante o protocolo experimental os animais receberam as respectivas dietas, água *ad libitum* em ambiente ciclos claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada 25°C. Os efeitos da dieta rica em sacarose foram avaliados durante 4 semanas. A massa corporal e o consumo alimentar foram mensurados uma vez por dia neste período.

Figura 1 – Fluxograma: Distribuição dos animais nos dois grupos experimentais



Distribuição dos animais nos dois grupos experimentais. Controle: animais controle que receberam dieta padrão NUVILAB, Dieta: animais que receberam a dieta rica em sacarose por 4 semanas.

Fonte: autoria própria.

As concentrações de proteínas no sobrenadante do homogêneo de fígado foram determinadas de acordo com Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.1 Quantificação da massa corporal e ingestão alimentar

Durante as 4 semanas, os animais e a ração comercial da marca Nuvilab® (Nuvital-CR, Colombo, Brasil) dos animais controle e a dieta rica em sacarose foram pesados diariamente com auxílio de uma balança digital (SF-400). Para a determinação da ingestão alimentar de 24 horas, foram fornecidos 300g de ração ou dieta e o consumo alimentar foi avaliado após a diferença entre os pesos da ração fornecida e a sobra.

3.2 Coleta de sangue, tecidos e tibia

Após anestesia com o anestésico inalatório isoflurano (3%) (Isofone, São Paulo, Br) por aproximadamente 1 minuto, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado rapidamente em microtubo de 1,5mL após a retirada do coração. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, 4°C, por 15 minutos em centrífuga da marca Eppendorf modelo 5810R. O sobrenadante foi coletado e aliquotado em eppendorfs para realização das dosagens bioquímicas.

O coração, o fígado e os rins foram removidos, pesados e congelados em nitrogênio para posteriores análises. Os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal foram pesados e descartados em seguida. A normalização da massa dos órgãos foi realizada após a divisão pelo comprimento da tibia do animal.

3.3 Dosagens bioquímicas

3.3.1 Glicemia

A concentração sérica de glicose foi mensurada pelo método colorimétrico (absorbância entre 490 – 550 nm). Utilizando o kit Glicose Monoreagente Bioclin – Quibasa K082, (BIOCLIN, Belo horizonte, Brasil), seguindo as recomendações da fabricante e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek®) do Laboratório Bionut da Escola de Nutrição (ENUT – UFOP). O cálculo utilizado para a determinação da glicemia foi a divisão da absorbância da amostra pela absorbância do padrão x 100 e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.3.2 Colesterol Total

A concentração sérica de colesterol total foi mensurada pelo método colorimétrico (absorbância entre 490 - 540nm). Utilizando o kit Colesterol Monoreagente Bioclin K083 (BIOCLIN, Belo horizonte, Brasil), seguindo as recomendações da fabricante e o espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek®). O cálculo utilizado foi a divisão da absorbância da amostra pela absorbância do padrão x 200 e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.3.3 Triglicerídeos

A concentração sérica dos triglicerídeos foi mensurada pelo método colorimétrico (absorbância entre 490 - 540nm). Utilizando o kit Colesterol Monoreagente Bioclin K117 (BIOCLIN, Belo horizonte, Brasil), seguindo as recomendações da fabricante e o espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek®) do Laboratório Bionut da Escola de Nutrição (ENUT – UFOP). O cálculo utilizado foi a divisão da absorbância da amostra pela absorbância do padrão x 100 e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.4 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1,0mL de tampão Tris 1M (pH 7,4) com a utilização do politron (IKA T10 basic S032, Baden-Württemberg, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados em microtubos de 1,5 mL. A reação para mensurar a atividade da enzima superóxido dismutase foi preparada em microplaca de acrílico contendo os homogenatos, tampão fosfato 50mM (pH7,0), brometo de 3-[4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e pirogallol. Após 5 minutos de incubação em estufa (FANEM, São Paulo, Brasil). a 37°C foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek®) do Laboratório Bionut da Escola de Nutrição (ENUT – UFOP) no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados são expressos em unidades de SOD por mg de proteína total (MARKLUND *et al.*, 1974).

3.5 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1,0mL de tampão Tris 1M (pH 7,4) com a utilização do politron (IKA T10 basic S032, Baden-Württemberg, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados em microtubos de 1,5 mL. A atividade da catalase no fígado foi determinada pelo método descrito por Beers e Sizer (1951), via monitoramento do desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 230 nm. Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína total.

3.6 Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH)

As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1,0mL de tampão Tris 1M (pH 7,4) com a utilização do politron (IKA T10 basic S032, Baden-Württemberg, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados em microtubos de 1,5 mL. Foram utilizados 100 µL do homogenato e adicionados a 100 µL de ácido tricloroacético (TCA, 12,5%), permanecendo no gelo por 30 minutos e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A montagem da placa foi realizada pela adição de 80 µL da amostra, 220 µL de Tris HCl. A cada poço foi incorporado 5 µL de Ácido 5,5-ditiobis -2-nitrobenzóico (DTNB), reagente que quando em contato com o grupo SH – tiol dos grupos sulfidrílicos, produz coloração amarela, lida espectrofotometricamente a 415 nm. Os valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g tecido (JONES, 2016).

3.7 Determinação de Proteínas Carboniladas (PCO)

A concentração de proteínas carboniladas do fígado foi determinada pelo método descrito por Levine *et al.*, (1994). Os grupos carbonilas foram detectados pela produção de 2,4 – dinitrofenilhidrazona (370 nm) após a adição de 2,4 – dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão KPE (Fosfato de potássio dibásico e fosfato dipotássio) com a utilização do politron (IKA T10 basic S032, Baden-Württemberg, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises. A concentração de PCO na amostra foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) e os valores foram expressos em µmol de PCO por mg

de proteína total.

3.8 Determinação de Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados no fígado por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com kokohn e Liversedge (1944). As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 mL de cloreto de potássio 1,15% com a utilização do politron (IKA T10 basic S032, Baden-Württemberg, Alemanha) . Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises foram previamente desproteinizados de acordo com o método proposto por Pilz, Meineke e Gleiter (2000). O TBA reage principalmente com os dienos, incluindo o malondialdeído, gerando produtos cujos níveis são determinados fluorimetricamente no comprimento de onda de 535 nm. Um curva analítica com o 1,1' 3,3'- tetrametoxipropano foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.9 Atividade das Metaloproteinases 2 e 9 através da técnica de zimografia

Os fígados foram coletados e homogeneizados em tampão Tris- CaCl_2 (Tampão Tris (50 mM - pH 7,4) - CaCl_2 (10 mM) [Fenantrolina (0,2 M); Fluoreto de sódio (0,5M) e Ortovanadato de sódio (0,5 M) e PMSF 0,2M]. O homogenato foi centrifugado a 4.000 rpm, 15 minutos e 4 °C. 15 l de sobrenadante e volume igual de tampão da amostra denão redutor serão misturados, aquecidos por 15 minutos a 37°C e submetidos a corrida eletroforéticas em gel de SDS-PAGE por 2 horas em geladeira. Após a corrida, o gel foi incubado em solução renaturante de Triton X-100 (10%) por 1 hora e em seguida incubado em tampão Tris- CaCl_2 por 24 horas em estufa (FANEM, São Paulo, Brasil) a 37° C. No dia seguinte, o gel foi corado em solução de *Coomasie blue* por 1 hora e descorado para visualização das bandas pela lavagem na solução descorante. A análise das bandas (densitometria) foi realizado no programa ImageJ versão 1.46m. As concentrações de proteínas no sobrenadante do homogêneo de fígado serão determinadas de acordo com Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.10 Análise de conteúdo proteico de proteína quinase B (AKT) em resíduos de serina 473 via *Western blot*

Os fígados foram coletados e homogeneizados em tampão Tris-HCl (50mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS e inibidores de proteases e de fosfatases. O homogenato foi centrifugado a 13.000 RPM e 4°C, 50-100 µl de sobrenadante e volume igual de tampão da amostra de Laemmli foram misturados, fervidos e submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE. A eletrotransferência das proteínas do gel para membrana será realizada a 400 mA em sistema de transferência tanque por 2h. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos (AKT fosforilada em resíduo de serina 473 e beta-actina) primários específicos e posteriormente com anticorpo secundário (anti coelho e camundongo) conjugado com horseradish peroxidase (HRP). A revelação foi feita após incubação das membranas com reagente amplificador de quimioluminescência e expostas ao filme fotográfico na câmara escura. A análise das bandas (densitometria) foi realizada no programa ImageJ versão 1.46m.

3.11 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa *GraphPad Prism* em sua versão 10.4.0. Entre os grupos controle e experimental foi utilizado para dados paramétricos o teste “t” de *Student* não pareado e para dados não paramétricos o teste *mann-whitney*. Foi utilizado para a comparação entre as médias e o nível de significância utilizado de 5%.

4 Resultados e Discussão

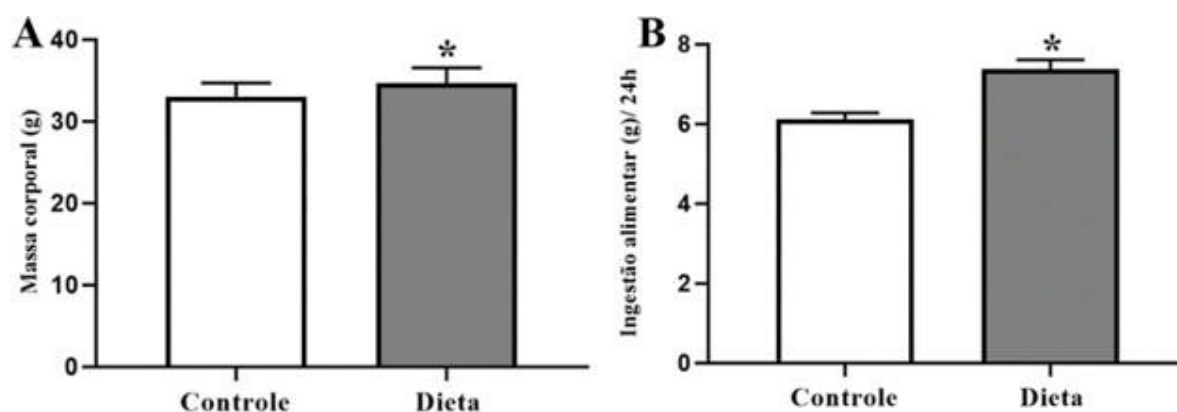
Os carboidratos desempenham um papel crucial no organismo, fornecendo a energia necessária para a manutenção da homeostase celular. Eles são importantes componentes tanto na dieta humana como na dos roedores (WITEK; WIDRA; FILIP, 2022). Entretanto, é reconhecido que o consumo excessivo de dietas ricas em sacarose pode ter efeitos prejudiciais à homeostase celular, contribuindo com o desenvolvimento de desequilíbrios metabólicos (STANHOPE *et al.*, 2013). O presente estudo investigou o impacto da ingestão de uma dieta rica em sacarose sobre os parâmetros metabólicos, biomarcadores do estresse oxidativo, na atividade das metaloproteinases 2 e 9 e na

fosforilação da proteína AKT no seu resíduo de serina 473.

4.1 Massa corporal e ingestão alimentar

A ingestão da dieta por 4 semanas foi capaz de aumentar a massa corporal (2,5%) e a ingestão alimentar (45,7%). César *et al.* (2022) também observaram um aumento de massa corporal na prole de ratas wistar alimentadas com dieta rica em carboidratos e gordura durante a gestação. Żebrowska *et al.* (2020) entretanto, não observaram o aumento da ingestão alimentar em ratos wistar alimentados com a dieta rica em açúcar por 8 semanas.

Figura 2 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre o ganho de massa corporal e ingestão alimentar /24h após 4 semanas.

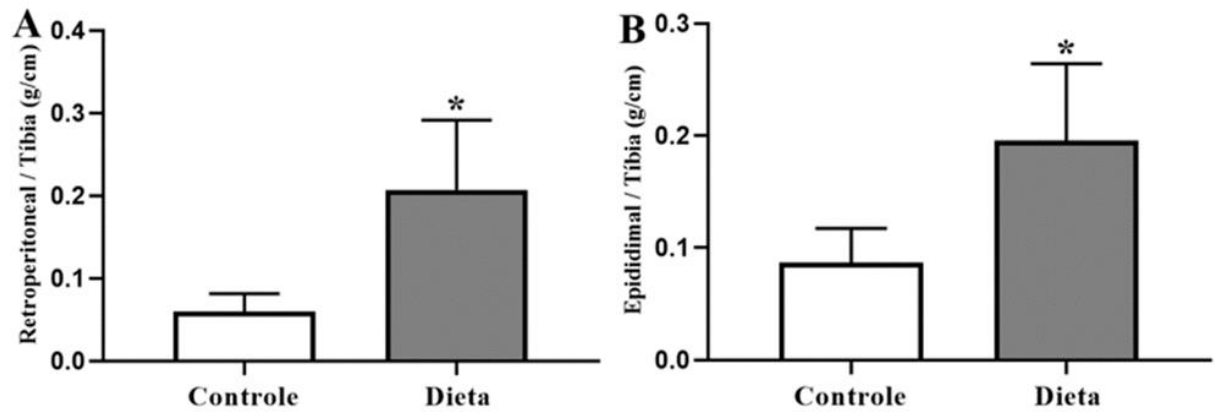


A. Massa corporal (g). B. Ingestão alimentar/24h (g). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e *teste t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com *p 0,05 vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.2 Massas dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal

Foi observado um aumento nas massas dos tecidos adiposos retroperitoneal (2,5 vezes) e epididimal (144%) quando comparados ao grupo controle (FIG 3A e 3B). Esses achados demonstram que a ingestão da dieta promoveu um maior depósito de lipídios, refletindo em aumento da massa corporal do animal (FIG 2A). De Queiroz *et al.*, (2014) também observaram esse efeito da ingestão da dieta no aumento dos depósitos de tecidos adiposos. César *et al.*, (2022), observaram um aumento da adiposidade visceral em ratos wistar alimentados com uma dieta rica em gordura e açúcar.

Figura 3 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal após 4 semanas.

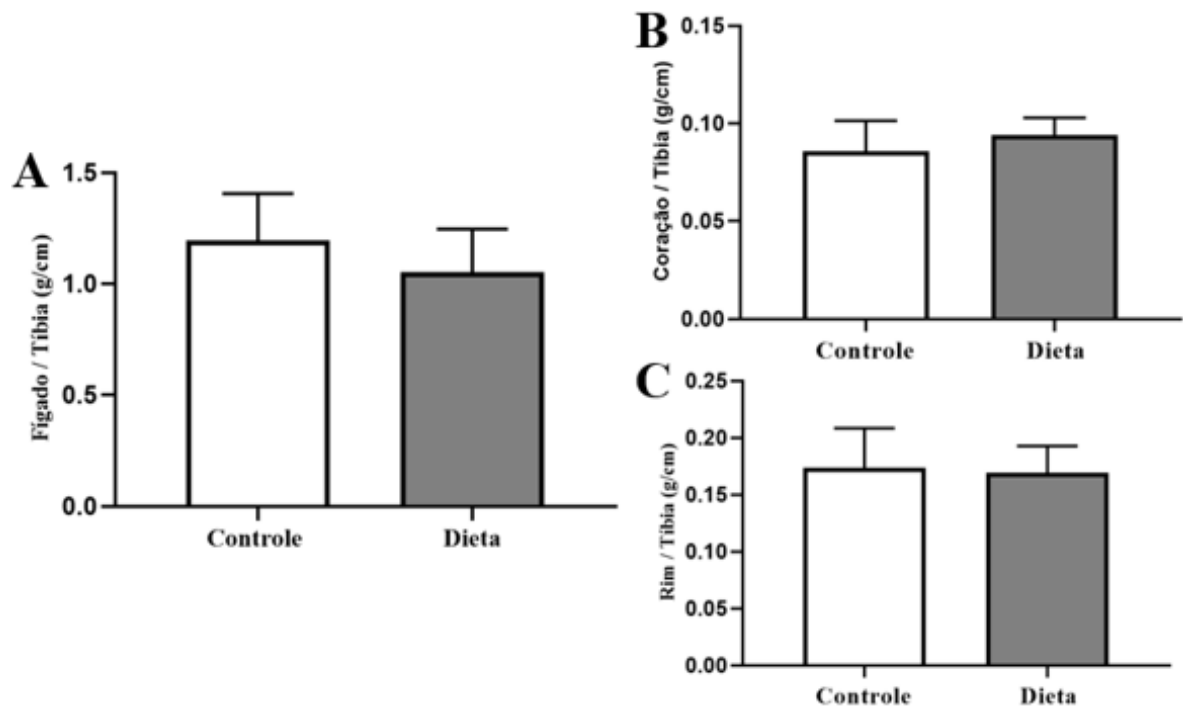


A. Retroperitoneal (g). B. Epididimal (g). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e *teste t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com *p 0,05 vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.3 Massas do coração, fígado e rim

A ingestão da dieta por 4 semanas não foi capaz de alterar as massas do coração, fígado e rim (FIG 4A, 4B e 4C). Zhang *et al.*, (2021), entretanto, encontraram um aumento da massa do fígado em ratos wistar alimentados com uma dieta rica em gordura e açúcar.

Figura 4 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os massas do fígado, coração e rim após 4 semanas.



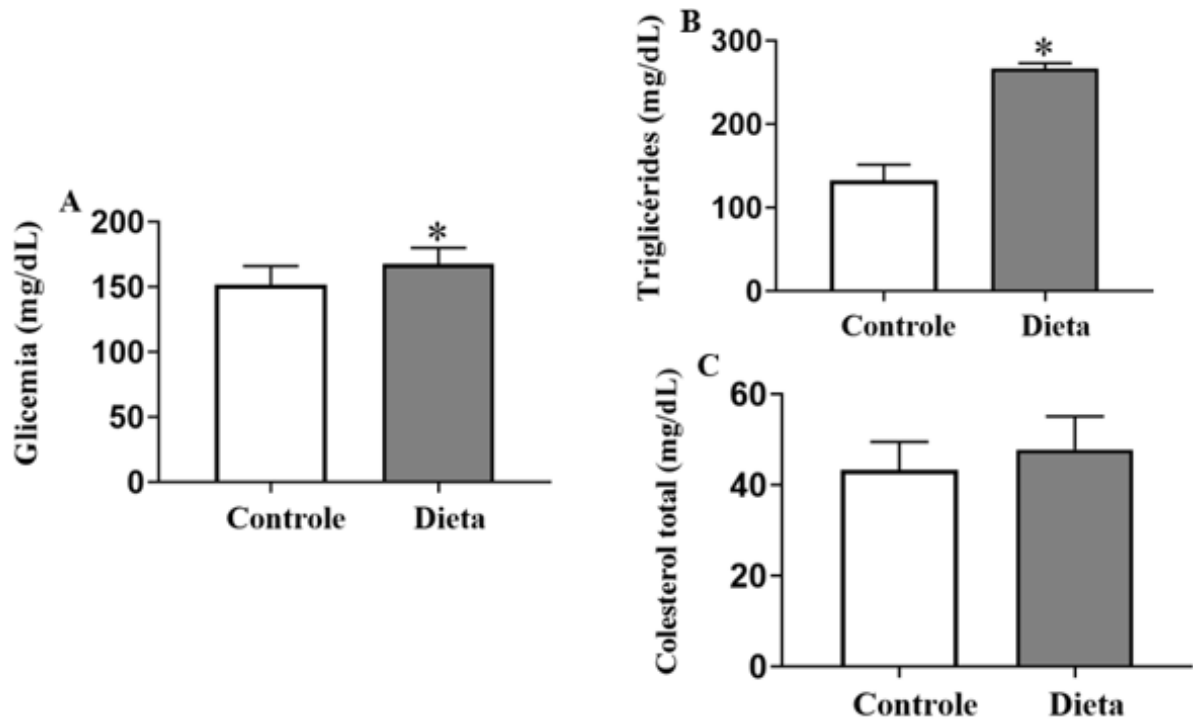
A. Fígado (g) B. Coração (g) C. Rim (g). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $*p < 0,05$ vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.4 Parâmetros glicometabólicos: glicemia, triglicérides e colesterol total

A ingestão da dieta foi capaz de aumentar a concentração sérica de glicose em 10% em relação ao grupo controle (FIG 5A). Żebrowska *et al.*, (2020) também observaram um aumento da glicemia de ratos wistar alimentados com uma dieta rica em açúcar por 8 semanas. Não foi observada nenhuma alteração na concentração de colesterol total nos animais alimentados com a dieta em comparação ao grupo controle (FIG 5C). Entretanto, a dieta foi capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de triacilglicerol em 100% em relação ao grupo controle após 4 semanas (FIG 5B). Esse aumento da concentração de triacilglicerol corrobora o aumento observado nas massas dos tecidos adiposos (retroperitoneal e epididimal - FIG 3), visto que grande parte do triacilglicerol produzido é estocado no tecido adiposo para que possa ser utilizado posteriormente em um momento de necessidade energética. Entretanto, Kayode, Afolabi e Ajayi (2023) observaram um aumento nos níveis de

colesterol total e diminuição dos níveis de triglicerídeos em *Drosophila melanogaster* alimentadas com uma dieta rica em gordura e açúcar.

Figura 5 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os parâmetros glicometabólicos após 4 semanas.



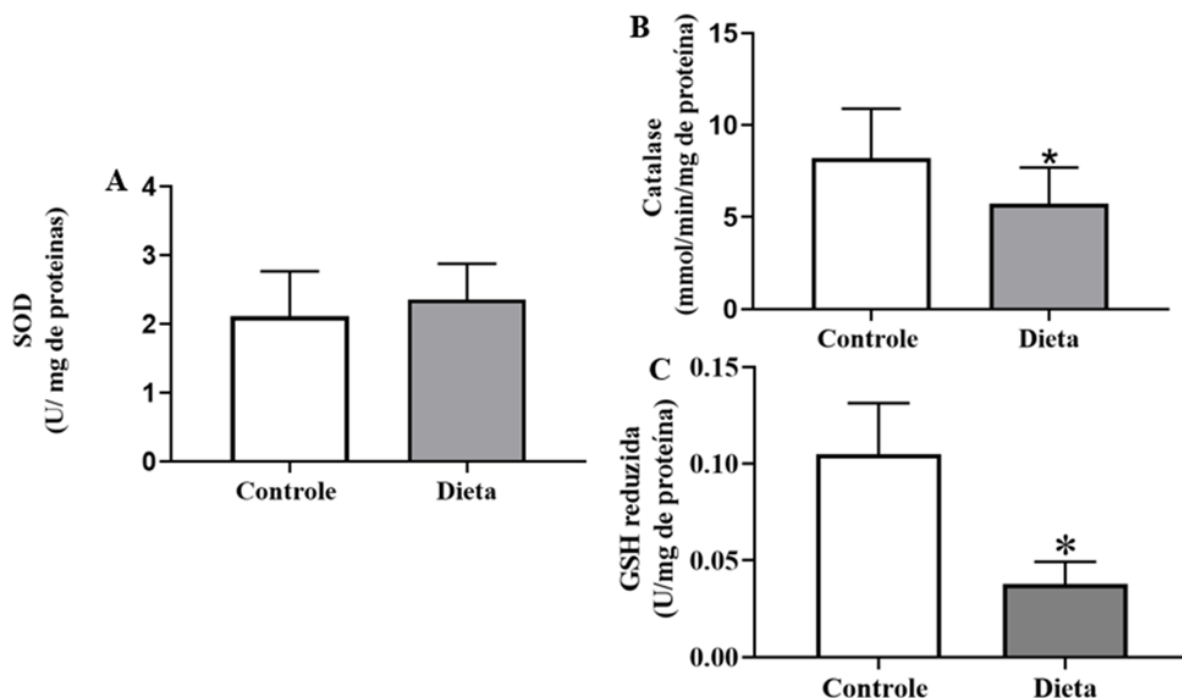
A. Glicemia (mg/dl) B. Triglicérides (mg/dl) C. Colesterol total (mg/dl). Oefeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com * $p < 0,05$ vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.5 Defesa antioxidante: superóxido dismutase, catalase e glutathione reduzida

Foi observada uma redução na atividade da enzima antioxidante catalase e na concentração da glutathione reduzida após a ingestão da dieta em relação ao grupo controle (FIG 6C), indicando uma perda da defesa antioxidante no fígado. Nenhuma alteração foi observada na atividade da superóxido dismutase em relação ao grupo controle. Zhang *et al.* (2021) observaram uma diminuição das enzimas SOD e CAT em ratos wistar alimentados com uma dieta rica em gordura e açúcar por 11 semanas. Entretanto, Lahouel (2024) não encontraram alterações na glutathione reduzida em camundongos alimentados com bebida açucarada e dieta enriquecida com sacarose durante 7 dias . Esses achados corroboram a hipótese de que a ingestão de uma dieta

rica em sacarose pode promover aumento do estresse oxidativo no fígado.

Figura 6 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a defesa antioxidante no fígado após 4 semanas.

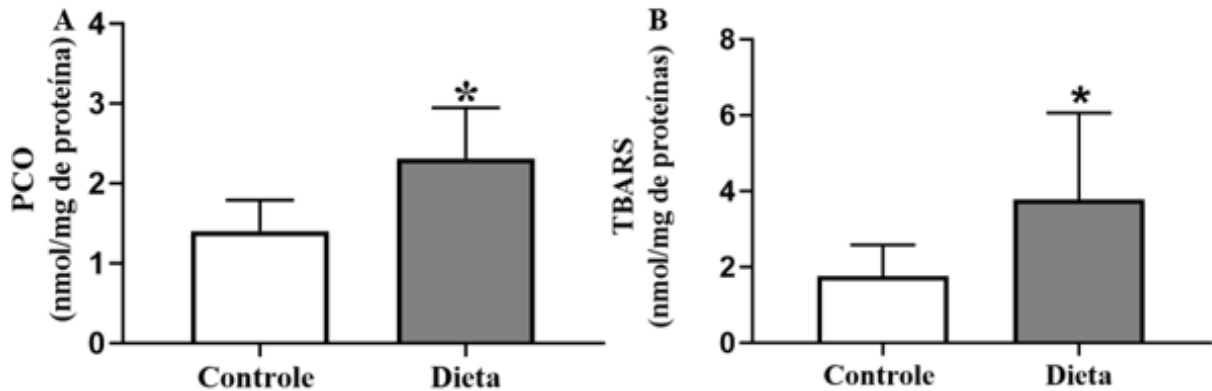


A. SOD (U/mg de proteínas) B. Catalase (mmol/min/mg de proteína) C. GSH reduzida (U/mg de proteína). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com *p 0,05 vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.5.1 Biomarcadores de estresse oxidativo: proteínas carboniladas (PCO) e substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Após 4 semanas a dieta rica em sacarose foi capaz de promover um aumento tanto na concentração de proteínas carboniladas (65%) como de TBARS (116%) em relação ao grupo controle (FIG 7A e 7B) demonstrando que ocorreu um dano oxidativo, fato este corroborado pela diminuição da atividade da catalase e concentração da glutathiona reduzida (Figura 6B e 6C). Iftikhar *et al.*, (2022) também observaram aumento de TBARS em fígado de ratos alimentados com dieta rica em carboidratos e em gordura por 28 dias. Żebrowska *et al.*, (2020) observaram um aumento de 414% em proteínas carboniladas no plasma de ratos wistar alimentados por 8 semanas com uma dieta rica em açúcar.

Figura 7 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre os biomarcadores de estresse oxidativo no fígado após 4 semanas.

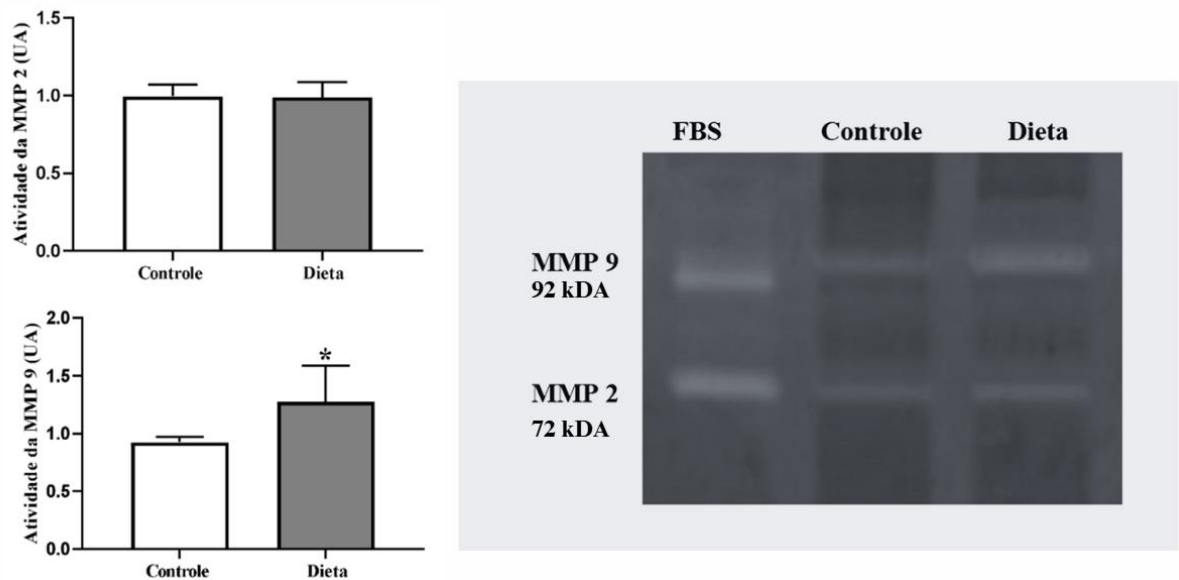


A. PCO (nmol/mg de proteínas) B. TBARS (nmol/mg de proteínas). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com * $p < 0,05$ vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.6 Atividade das metaloproteinases 2 e 9

A ingestão da dieta rica em sacarose promoveu um aumento na atividade da MMP 9 (38%) em comparação ao grupo controle. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração da atividade da MMP 2. O aumento na atividade da MMP 9 pode ser associado ao aumento do estresse oxidativo observado no fígado dos animais alimentados com dieta rica em sacarose. Tsai *et al.*, (2013) também observaram um aumento da atividade da MMP 9 em cultura de células do tendão de aquiles de ratos Sprague-Dawley que foram tratados em meio com altas concentrações de glicose. Chi *et al.*, (2014) relataram aumento na atividade da MMP 2 em cultura de células de fibroblastos incubadas em meio rico em glicose.

Figura 8 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a atividade das metaloproteinases 2 e 9 no fígado após 4 semanas.

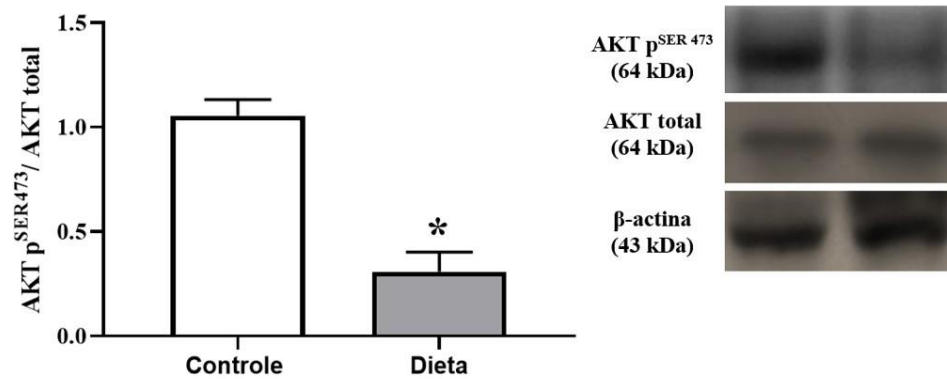


A. MMP 9 (UA) B. MMP 2 (UA). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com * $p < 0,05$ vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

4.7 Determinação da fosforilação da AKT em resíduo de serina e a AKT total

Foi observada uma redução de 71,5% na fosforilação de AKT em serina 473 após 4 semanas de ingestão da dieta rica em sacarose em relação ao grupo controle. A redução da fosforilação da AKT demonstra que a dieta foi capaz de promover prejuízos na sinalização da insulina no fígado e por conseguinte este hormônio perdeu sua capacidade de ação e regulação do metabolismo hepático. *Żebrowska et al.*, (2020) observaram que a alteração da concentração de insulina induz à resistência em ratos wistar alimentados com dietarica em açúcar por 8 semanas. *Softic et al.*, (2017) observaram que camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta rica em gordura por 10 semanas, foram capazes de diminuir em 50% a fosforilação da AKT.

Figura 9 – Efeito da dieta rica em sacarose sobre a fosforilação da AKT em resíduo de serina 473 no fígado após 4 semanas.



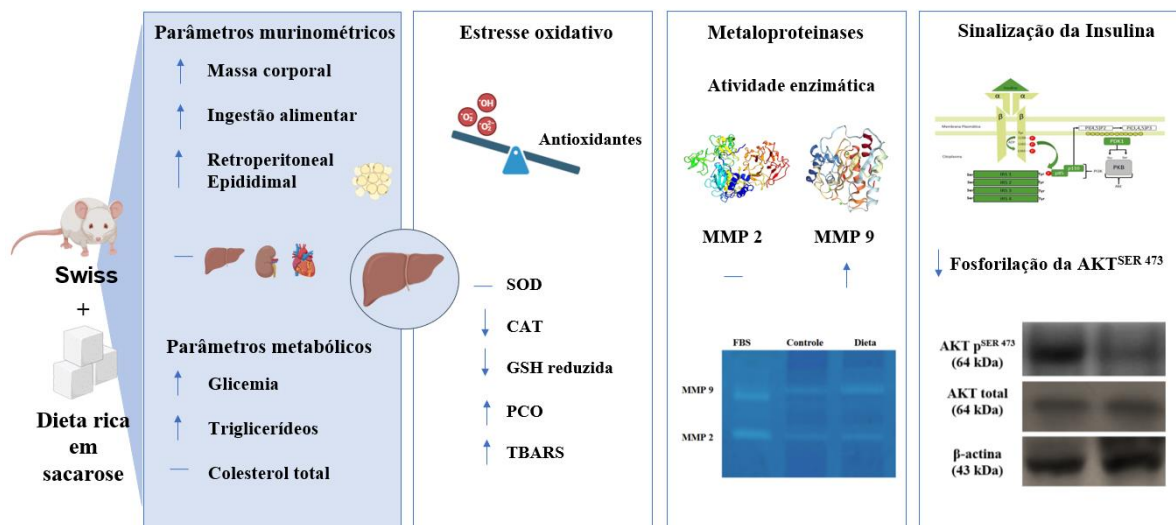
A. AKTpser473/AKT total (UA). O efeito da dieta rica em sacarose por 4 semanas foram analisados pelo teste de normalidade de *Shapiro Wilk* e teste *t Student* não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas com *p 0,05 vs controle. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão. Foram utilizados 11 animais para o grupo experimental controle e 14 para o grupo dieta.

5 Conclusão

Com os resultados obtidos pode-se concluir que a ingestão da dieta rica em sacarose por 4 semanas foi capaz de induzir a prejuízos na via de sinalização da insulina por reduzir a fosforilação da proteína AKT em serina 473 e assim, alterar a glicemia, metabolismo lipídico, e induzir o estresse oxidativo em fígado de camundongos SWISS. Esses achados sustentam, pelo menos em parte, nossa hipótese de que o aumento do consumo de carboidratos acarretaria em aumento do estresse oxidativo e consequentemente em aumento da atividade das metaloproteinases 2 e 9.

A figura a seguir resume os achados do trabalho que corroboram com a hipótese do presente trabalho.

Figura 10 – Fluxograma resumo



Fluxograma resumo: SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; GSH: Glutathiona reduzida; PCO: Proteínas carboniladas; TBARS: Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico; MMP: Metaloproteinases; AKT: Proteína quinase B.

Fonte: Autoria própria. Imagem da sinalização da insulina: adaptado de CARVALHEIRA *et al.*, (2002).

Referências

- ACOSTA-COTA, s. j. et al. Histopathological and biochemical changes in the development of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-sucrose diet at different times. **Can. J. Fisiol. Farmacol.**, v. 97, p. 23–36, 2019. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0353.
- AKHIGBE, R.; AJAYI, A. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. **Lipídios Saúde Dis.**, v. 20, p. 23, 2021. DOI:10.1590/S0103-84782010005000037.
- ALMEMIDA, Luiz G.N. de et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews, American Society for Pharmacology e Experimental Therapeutics**, v. 74, n. 3, p. 714–770, 2022. DOI:10.1124/pharmrev.121.000349.
- ALVES-BEZERRA, Michele; COHEN, David E. Triglyceride Metabolism in the Liver. **Compr Physiol**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1002/cphy.c170012.
- APOSTOLOVA, Nadezda; BLAS-GARCIA, Ana; ESPLUGUES, Juan V. Mitochondria Sentencing About Cellular Life and Death: A Matter of Oxidative Stress. **Current Pharmaceutical Design, Bentham Science Publishers**, v. 17, n. 36, p. 4047–4060, 2011. DOI: 10.2174/138161211798764924.
- BAIGES-GAYA, G. et al. Hepatic metabolic adaptation and adipose tissue expansion are altered in mice with steatohepatitis induced by high-fat high sucrose diet. **J. Nutr. Bioquímica**, v. 89, p. 108559, 2020. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108559.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Universidade Federal de Viçosa, v. 23, n. 2, p. 227–236, 2010. DOI: 10.1590/S1415-52732010000400013
- BEERS, Roland F.; SIZER, Irwin W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry e Molecular Biology**, v. 195, n. 1, p. 133–140, 1951.
- BERG, G.; BARCHUK, M.; MIKSZTOWICZ, V. Behavior of metalloproteinases in adipose tissue, liver and arterial wall: An update of extracellular matrix remodeling. **Cells**, MDPI, 2019. DOI: 10.3390/cells8020158
- BERGERS, Gabriele et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 10, p. 737–744, 2000. DOI: 10.1038/35036374
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, p. 786–801, 2014. DOI: 10.1038/nrm3904.

CABRAL-PACHECO, Griselda A. et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9739, 2020. DOI: 10.3390/ijms21249739.

CÉSAR, Helena et al. Parental high-fat high-sugar diet programming and hypothalamus adipose tissue axis in male Wistar rats. **European Journal of Nutrition**, Springer, v. 61, n. 1, p. 523–537, 2022. DOI: 10.1007/s00394-021-02690-1.

CHANDEL, Navdeep S. Carbohydrate Metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 13, n. 1, a040568, 2021. DOI: 10.1101/cshperspect.a040568.

CHERRINGTON, A. D.; EDGERTON, D. ; SINDELAR, D. K. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. **Diabetologia**, v. 41, p. 987–996, 1998. DOI: 10.1007/s001250051021.

CHI, JF et al. Effects of eplerenone on the activation of matrix metalloproteinase-2 stimulated by high glucose and interleukin-1 in human cardiac fibroblasts. **Genet Mol Res**, Fundacao de Pesquisas Cientificas de Ribeirao Preto, v. 13, n. 3, p. 4845–4855, 2014. DOI:10.4238/2014.January.24.4

CICHOZ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, Baishideng Publishing Group Co., 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i25.8082

CLEMENTE-SUÁREZ, Vicente Javier et al. The Burden of Carbohydrates in Health and Disease. **Nutrients**, MDPI, v. 14, n. 18, p. 3809, 2022. DOI: 10.3390/nu14183809.

DAS, Sanjib; AMIN, Sk Abdul; JHA, Tarun. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Elsevier, v. 223, p. 113623, 2021. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113623

ENG, James M.; ESTALL, Jennifer L. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. **Cells**, MDPI, v. 10, n. 7, p. 1805, 2021. DOI: 10.3390/cells10071805.

FERMENTOS, K. F.; BIRNBAUM, M. J. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 46, p. 200–215, 2011. DOI: 10.3109/10409238.2011.562481.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI, v. 12, n. 5, p. 3117–3132, 2011. DOI: 10.3390/ijms12053117.

FONSECA, Fernando Luiz Affonso et al. Matrix Metalloproteases as Biomarkers of Disease. **Methods in Molecular Biology**, Springer, v. 1579, p. 299–311, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6863-3_17.

GRINELL, F., Zhu, M., Parks, W.C., 1998. Collagenase-1 complexes with alpha2-macroglobulin in the acute and chronic wound environments. **J. Invest. Dermatol.** 110, 771–776. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00192.x

HERNANANES-AUGUSTÍN, Pablo; ENRÍQUEZ, José Antonio. Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. **Antioxidantes**, v. 10, n. 3, p. 415, 2021. DOI: 10.3390/antiox10030415.

IFTIKHAR, Neelam et al. Effects of polyphenol-rich traditional herbal teas on obesity and oxidative stress in rats fed a high-fat-sugar diet. **Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 698–711, 2022. DOI: 10.1002/fsn3.2695.

JAKUBCZYK, K. et al. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **PolskiMerkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 48, n. 284, p. 124–127, 2020.

JAOUDE, J.; KOH, Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. **Vascular Health and Risk Management**, Dove Medical Press Ltd., 2016.

JONES, John G. Hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, Springer, v. 59, p. 1098–1103, 2016. DOI: 10.1007/s00125-016-3940-5.

KANDASAMY, Arulmozhi D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 3, p. 413–423, 2010. DOI: 10.1093/cvr/cvp268.

KAYODE, Omowumi T.; AFOLABI, Olatayo A.; AJAYI, Gabriel O. Antioxidant and antilipidemic action of ketogenic diet and tomato powder mix in high sugar and fat fed Harwich fruit flies. **Heliyon**, Elsevier, v. 9, n. 10, e20411, 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e20411.

LAHOUEL, Asma. High sugar consumption for seven days in adult mice increased blood glucose variability, induced an anxiolytic effect and triggered oxidative stress in cerebral cortex. **Metab Cérebro Dis**, Springer, v. 39, n. 5, p. 731–739, 2024. DOI: 10.1007/s11011-024-01352-5.

LARONHA, Helena; CALDEIRA, Jorge. Structure and function of human matrix metalloproteinases. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1076, 2020. DOI: 10.3390/cells9051076

LEE, Jisun; GIORDANO, Samantha; ZHANG, Jianhua. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **Biochemical Journal**, Portland Press Limited, v. 441, Pt 2, p. 523–540, 2012. DOI: 10.1042/BJ20111451.

LEVINE, R.L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, Academic Press, v. 233, p. 346–357, 1994. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9

LIMA, D.C. de et al. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. **Metabolic Brain Disease**, Springer, v. 23, n. 4, p. 361–373, 2008. DOI: 10.1007/s11011-008-9101-x

LIU, X. J. et al. Characterization of a murine nonalcoholic steatohepatitis model induced by high fat high calorie diet plus fructose and glucose in drinking water. **Laboratory**, v. 98, p. 1184–1199, 2018. DOI: 10.1038/S41374-018-0074-Z.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACCOLL, Elisabeth; KHALIL, Raouf A. Matrix metalloproteinases as regulators of vein structure and function: implications in chronic venous disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 410–428, 2015. DOI: 10.1124/jpet.115.227330

MAILLOUX, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **Biol Redox**,

v. 4,p. 381–398, 2015. DOI: 10.1016/j.redox.2015.02.001

MALIK, A. N. et al. A Diet Induced Maladaptive Increase in Hepatic Mitochondrial DNA Precedes OXPHOS Defects and May Contribute to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Cells**, v. 8, p. 1222, 2019. DOI: 10.3390/cells8101222.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.

MATRISIAN, Lynn M. The matrix-degrading metalloproteinases. **Bioessays**, Wiley OnlineLibrary, v. 14, n. 7, p. 455–463, 1992 DOI: 10.1002/bies.950140705[

OLIVEIRA, D. T. de; FERNANDES, I. da C.; SOUSA, G. G. de; SANTOS, T. A. P. dos; PAIVA, N. C. N. de; CARNEIRO, C. M.; EVANGELISTA, E. A.; BARBOZA, N. R.; GUERRA-SÁ, R. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in *ad libitum*-fed rats irrespective of caloric intake. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 71-81, 2020. DOI: 10.20945/2359-3997000000199.

O’SULLIVAN, S.; GILMER, J. F.; MEDINA, C. Matrix Metalloproteinases in Inflammatory Bowel Disease: An Update. **Mediadores Inflamm.**, 2015. DOI: 10.1155/2015/964131.

PARK, so young; GAUTIER, Jean-François; CHON, Suk. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. **Diabetes Metab J**, PMC, v. 45, n. 5, p. 641–654, 2021. DOI: 10.4093/dmj.2021.0220.

PENG, Silvia. Mitochondrial ROS driven by NOX4 upregulation promotes hepatocellular carcinoma cell survival after incomplete radiofrequency ablation by inducing of mitophagy via Nrf2/PINK1. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nature Publishing Group, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

PETERSEN, K. f. et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. **J. Clin. Invest.**, v. 109, p. 1345–1350, 2002. DOI: 10.1172/JCI0215001.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications**, Elsevier, v. 742, n. 2, p. 315–325, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00174-2

QUEIROZ, K.B. de et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. **Nutrition Research**, Elsevier, v. 32, n. 9, p. 709–717, 2012. DOI: 10.1016/j.nutres.2012.06.020

QUEIROZ, Karina Barbosa de et al. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, v. 58, n. 12, p. 2331–2341, 2014. DOI: 10.1002/mnfr.201400241.

QUINTERO-FABIÁN, Saray et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1370, 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.01370

RODERFELD, Martin et al. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion, 2007.

- ROSINGER, A. et al. Sugar-sweetened Beverage Consumption Among U.S. Youth, 2011-2014. **Resumo de dados do NCHS**, v. 270, p. 1–8, 2017. PMID: 28135184
- SACHDEV, s. et al. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 277, 2021. DOI: 10.3390/antiox10020277
- SANTOLERI, Domingos; TITCHENELL, Paul M. Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Elsevier, v. 7, n. 2, p. 447–456, 2019. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.016.
- SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nature Publishing Group, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- SIMÕES, I. C. m. et al. Western Diet Causes Obesity-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development by Differentially Compromising the Autophagic Response. **Antioxidants**, v. 9, p. 995, 2020. DOI: 10.3390/antiox9100995.
- SOFTIC, S. et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. **J. Clin. Investig.**, v. 127, p. 4059–4074, 2017. DOI: 10.1172/JCI94585.
- STANHOPE, Kimber L.; SCHWARZ, Jean-Marc; HAVEL, Peter J. Adverse metabolic effects of dietary fructose: results from the recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 3, p. 198-206, 2013. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3283613bca. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3283613bca.
- TAKAHARA, T. et al. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. **Hepatology**, Wiley, v. 26, p. 1521–1599, 1997. DOI: 10.1002/hep.510260620.
- TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 85–96, 2006. DOI: 10.1038/nrm1837.
- TENÓRIO, P. P. et al. The role of matrix metalloproteinases in the development of aortic aneurysm. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2012/v26n4/a3488.pdf>.
- TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen; WASSERMAN, David H. The liver. **Current Biology**, Elsevier, v. 27, n. 21, r1147–r1151, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- TSAI, Wen-Chung et al. High glucose concentration up-regulates the expression of matrix metalloproteinase-9 and -13 in tendon cells. **BMC Musculoskeletal Disorders**, BioMed Central, v. 14, n. 1, p. 255, 2013. DOI: 10.1186/1471-2474-14-255.
- VIAPPIANI, Serena et al. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. **Farmacologia Bioquímica**, Elsevier, v. 77, n. 5, p. 826–834, 2009. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.11.004.
- WITEK, Kacper; WYDRA, Karolina; FILIP, Małgorzata. A high-sugar diet consumption, metabolism, and health impacts with a focus on the development of substance use disorder: a narrative review. **Nutrients**, MDPI, v. 14, n. 14, p. 2940, 2022. DOI: 10.3390/nu14142940.
- ZEBROWSKA, Ewa et al. High-Sugar Diet Disrupts Hypothalamic but Not Cerebral Cortex Redox Homeostasis. **Nutrients**, MDPI, v. 12, n. 10, p. 3181, 2020. DOI: 10.3390/nu12103181.

ZHANG, Xiao et al. Alleviation of Liver Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation Underlines the Protective Effects of Polysaccharides from *Cordyceps cicadae* on High Sugar/High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Chemistry & Biodiversity**, John Wiley & Sons, Inc, v. 18, n. 5, e2100065, 2021. DOI: 10.1002/cbdv.202100065



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da dieta rica em carboidratos simples sobre o estresse glico-oxidativo e homeostase mitocondrial em coração de camundongo Swiss", protocolada sob o CEUA nº 7422050723 (ID 000925), sob a responsabilidade de **Sílvia de Paula Gomes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 04/09/2023.

We certify that the proposal "High sugar diet effect on glyco-oxidative stress and mitochondrial homeostasis in Swiss mouse heart", utilizing 124 Heterogenics mice (124 males), protocol number CEUA 7422050723 (ID 000925), under the responsibility of **Sílvia de Paula Gomes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 09/04/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2023** a **09/2026** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 5 semanas**

Quantidade: **124**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **15 a 20 g**

Ouro Preto, 04 de setembro de 2023

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

