



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/013/2015 sobre "Ativação do PPAR beta/delta pela telmisartana: modulação do eixo adipoinsular e enteroinsular na lipotoxicidade" sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 24/02/2015. Este certificado expira em 24/02/2019.

Rio de Janeiro, 24 de Fevereiro de 2015.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

(Enviar duas vias para a CEUA-UERJ)

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO

PROTOCOLO Nº

RECEBIDO EM: ____ / ____ / ____

ATENÇÃO: antes de preencher o formulário, leia o manual localizado no final do mesmo. Caso as informações solicitadas não sejam **INTEGRALMENTE** apresentadas conforme indicado no manual, o formulário será devolvido para correção e uma nova análise terá que aguardar a próxima reunião mensal da CEUA-UERJ. No site do CEUA-UERJ pode ser obtido um formulário com exemplos de como os diferentes campos podem ser preenchidos.

Observação 1: o formulário deverá ser preenchido integralmente com o uso de um computador. A assinatura deve ser original. É vedado o uso de assinatura eletrônica (digitalizada).

Observação 2: somente docentes, professores visitantes, pós-doutorandos e técnicos de nível superior com doutorado da UERJ poderão constar como pesquisador responsável neste formulário.

FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

1. FINALIDADE

Pesquisa ☒

Ensino ☐

Treinamento ☐

Início: / /

Término: / /

2. TÍTULO DO PROJETO

Ativação do PPAR beta/delta pela telmisartana: modulação do eixo adipoinssular e enteroinsular na lipotoxicidade.

Área do conhecimento:

Lista das áreas do conhecimento disponível em: <http://www.capes.gov.br/avaliacao/tabela-de-areas-de-conhecimento>

3. PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome completo	Vanessa de Souza Mello
Instituição	UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Unidade	INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES
Departamento	DEPARTAMENTO DE ANATOMIA
Laboratório	LABORATÓRIO DE MORFOMETRIA, METABOLISMO E DOENÇA CARDIOVASCULAR
Telefone	(21) 2868-8316
E-mail	v.souzamello@gmail.com

Vínculo com a instituição:

Docente permanente ☒
Pós-doutor ☐

Professor Visitante ☐
Técnico de nível superior ☐

Experiência prévia e/ou treinamento:

Não ☐

Sim ☒

Tipo
Quanto tempo

4. COLABORADORES

Nome completo	Francielle Graus Frazão Nunes
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Nível acadêmico	Doutorando
Experiência / treinamento	4 anos. 2 anos de iniciação científica e 2 anos como mestranda, com a supervisão da orientadora.
Telefone	(21) 98088-8642
E-mail	grauss.f@hotmail.com

Nome completo	Sandra Barbosa Silva
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Nível acadêmico	Pós doutorado
Experiência / treinamento	9 anos. 1 ano de iniciação científica, 2 anos de mestrado, 4 anos de doutorado e 2 ano no pós doutorado (em andamento).
Telefone	(21) 998682466
E-mail	sandrabarbosasilva@gmail.com

Nome completo	
Instituição	
Nível acadêmico	
Experiência / treinamento	
Telefone	
E-mail	

Nome completo	
Instituição	
Nível acadêmico	
Experiência / treinamento	
Telefone	
E-mail	

Nome completo	
Instituição	
Nível acadêmico	
Experiência / treinamento	
Telefone	
E-mail	

Nome completo	
Instituição	
Nível acadêmico	
Experiência / treinamento	
Telefone	
E-mail	

Utilize as tabelas acima para o preenchimento dos colaboradores. Copie, cole abaixo e preencha quantas forem necessárias, até que todos os colaboradores sejam contemplados.

5. RESUMO DO PROJETO

A ativação dos receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs) tem sido amplamente sugerida para o controle da obesidade e suas comorbidades. Apesar de todos os efeitos benéficos do agonista PPAR-beta/delta sobre o pâncreas, essas substâncias ainda não são utilizadas na clínica por possuírem efeitos carcinogênicos. A telmisartana (droga anti-hipertensiva) é descrita como inibidor do receptor AT1 da angiotensina e agonista parcial PPAR- γ , o que levou a investigação de suas propriedades pleiotrópicas. Atualmente é utilizada na clínica com produção de efeitos metabólicos relevantes, com efeitos sobre a resistência à insulina e obesidade. No pâncreas, a telmisartana reduz a esteatose e melhora a ultraestrutura da ilhota, contudo os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados.

Para isso, será utilizado camundongos da linhagem C57BL/ machos aos 3 meses de idade, que serão separados aleatoriamente em dois grupos: grupo dieta *high fat* (HF, 49% lipídios) e grupo dieta padrão (SC, 10% de lipídios) e serão alimentados ao longo de 10 semanas. Posteriormente esses animais serão redivididos para ser iniciado o tratamento que terá duração de 5 semanas, perfazendo 6 grupos no total: HF, HF- Tel, HF-Tel/ Pair-feeding, SC, SC-Tel e SC-Tel/ Pair-feeding. A massa corporal será aferida semanalmente, a ingestão alimentar diariamente, o teste de tolerância oral a glicose será realizado uma semana antes da eutanásia, após a eutanásia o pâncreas e o tecido adiposo branco serão cuidadosamente retirados, processados e armazenados para as técnicas de rotina do laboratório, que são elas, microscopia de luz e confocal, PCR em tempo real e western blot.

6. OBJETIVOS (na íntegra)

Avaliar parâmetros morfológicos-quantitativos do pâncreas e tecido adiposo branco (TAB) (in vivo); Expressão do PPAR beta/delta no pâncreas e sua interação com o eixo enteroinsular (SREBP-1c e GLP-1R) e influência sobre o mecanismo anti-apoptóticos (Bcl-2 e caspase 3) in vivo e in vitro, cascata de sinalização da insulina no pâncreas e a expressão do PPAR beta/delta no TAB e sua influencia sobre a produção das adipocinas (in vivo).

7. JUSTIFICATIVA

Apesar de todos os efeitos morfofuncionais benéficos do agonista PPAR beta/delta sobre o pâncreas, essas substâncias ainda não são utilizadas na clinica por possuírem efeitos carcinogênicos. A telmisartana (drogas anti-hipertensiva) é descrita como inibidor do receptor AT1 da angiotensina e agonista parcial PPAR-gama, o que levou a investigação de suas propriedades pleiotrópicas. Atualmente é utilizada na clínica com produção de efeitos metabólicos relevantes e evidências experimentais mais recentes têm sugerido a droga como agonista PPAR-alfa no fígado, promovendo redução da esteatose hepática e agonista PPAR beta/delta no tecido adiposo branco e no músculo, com efeitos sobre a resistência a insulina e obesidade. No pâncreas, a telmisartana reduz esteatose e melhora a ultraestrutura da ilhota, contudo os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados. Uma possível interação da ativação do PPAR beta/delta pela telmisartana com a indução do GLP-1 e melhora da sensibilidade à insulina é promissora, uma vez que um único medicamento poderia ser utilizado para tratar dois componentes da síndrome metabólica.

8. RELEVÂNCIA

O presente estudo apresentara a telmisartana como uma alternativa viável à ativação segura do PPAR beta/delta no pâncreas para o tratamento da obesidade e comorbidades, a qual tem potencial na medicina translacional a fim de ser utilizada na prática clínica.

9. MODELO ANIMAL

Espécie (nome vulgar, se existir): Camundongos da linhagem C57BL/6
 Justificar a escolha da espécie: Mimetiza o quadro de Síndrome Metabólica de humanos

9.1. PROCEDÊNCIA

Biotério ☒ Fazenda ☐

Outra procedência ☐ Qual?

É animal silvestre? Número de protocolo SISBIO:

É animal geneticamente modificado? Número de protocolo CTNBio:

9.2. TIPO E CARACTERÍSTICA

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Anfíbio						
Ave						
Bovino						
Bubalino						
Cão						
Camundongo heterogênico	C57BL/6	3 meses	20 gramas	100	0	100
Camundongo isogênico						
Camundongo <i>Knockout</i>						
Camundongo transgênico						
Caprino						
Chinchila						
Cobaia						
Coelhos						
Equídeo						
Espécie silvestre brasileira						
Espécie silvestre não-brasileira						
Gato						
Gerbil						
Hamster						
Ovino						
Peixe						
Primata não-humano						
Rato heterogênico						
Rato isogênico						
Rato <i>Knockout</i>						
Rato transgênico						
Réptil						
Suíno						
Outra						
				TOTAL:		100

Justificar o tamanho da amostra:

É o número mínimo para formar os grupos de estudo e obter resultados estatisticamente comprovatórios.

9.3. MÉTODOS DE CAPTURA (somente em caso de uso de animais silvestres)

Não se aplica.

9.4. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO / DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Divididos em dois experimentos:

- 1) In vivo: 6 grupos experimentais alimentados com dieta controle (SC) e hiperlipídica (HF) baseada na AIN93-M. Os grupos SC (n=50) e HF (n=50) receberão a dieta ao longo de 10 semanas. Após esse período, os grupos serão subdivididos em SC (n=16), SC-Medicamento (n=17), SC Pair-Feeding (n=17); HF (n=16), HF-Medicamento (n=17) e HF Pair-Feeding (n=17). O medicamento será incorporada a dieta na dose de 5mg/kg massa.

In vitro: 4 grupos: Telmisartana, GW0742(agonista PPAR beta/delta), GSK3787 (antagonista PPAR beta/delta) e Telmisartana + GSK3787.

9.5. GRAU DE INVASIVIDADE: (1, 2, 3 ou 4 – ver final do formulário para definição)

Os materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos? Quais? Se já aprovado pela CEUA, mencionar o número do protocolo.

GI: Os materiais não serão utilizados em outros projetos.

9.6. CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Alimentação, fonte de água, lotação (número de animais/área), exaustão do ar. Comentar obrigatoriamente sobre estes itens e as demais condições que forem particulares à espécie.

Os animais serão mantidos em ambiente apropriado com temperatura controlada (21 ± 2 C), e umidade ($60 \pm 10\%$), submetidos a ciclo de 12h claro-escuro.

Local onde será mantido o animal:

Biotério ☒ Fazenda ☐

Outro local ☐ Qual?

Ambiente de alojamento:

Gaiola ☒ Jaula ☐ Baia ☐

Outro ☐ Qual?

Número de animais por gaiola/galpão

Tipo de cama (maravalha, estrado ou outro):

10. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO PROJETO

10.1. ESTRESSE/DOR INTENCIONAL NOS ANIMAIS

Não ☐ Sim ☒ Curto ☒ Longo ☐ Estresse ☒ Dor ☐ Restrição líquida ou alimentar ☐

Outros ☐

Em caso de resposta sim, justifique os itens aplicáveis:

Gavagem orogástrica de glicose no procedimento do Teste Oral de Tolerância a Glicose.

10.2. USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS

Não ☒ Sim ☐

Em caso de não uso, justifique:

Câmara de CO₂

No campo “fármaco”, no presente item e nos próximos, deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

Como será avaliado o nível de anestesia?

Pressão arterial	<input type="checkbox"/>	Reflexo corneano	<input type="checkbox"/>
Frequência respiratória	<input type="checkbox"/>	Reflexo flexor	<input type="checkbox"/>
Frequência cardíaca	<input type="checkbox"/>	Reflexo da cauda	<input type="checkbox"/>
EEG	<input type="checkbox"/>	Outros	<input type="checkbox"/>

Em caso de outros, especifique:

10.3. USO DE RELAXANTE MUSCULAR

Não ☒ Sim ☐

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

10.4. USO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS

Não ☒ Sim ☐

Em caso de não uso, justifique:

Os procedimentos utilizados não produzem dor que justifique o uso de analgésicos.

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

10.5. IMOBILIZAÇÃO DO ANIMAL

Não ☐ Sim ☒

Em caso de sim, indique o tipo e o tempo de imobilização:

Na gavagem orogástrica de glicose, região cervical apenas para permitir o procedimento, por um curto período de tempo.

10.6. CONDIÇÕES ALIMENTARES E DE HIDRATAÇÃO

Jejum:

Não ☒
Sim ☐

Duração

Restrição líquida:

Não ☒
Sim ☐

Duração

10.7. CIRURGIA

Não ☒
Sim ☐

Única ☐
Múltiplas ☐

No mesmo ato cirúrgico ☐
Em diferentes atos cirúrgicos ☐

Qual(is)?

A manipulação cirúrgica resultará em sobrevida?

Não ☐ Sim ☐

Onde será realizada a cirurgia?

Centro cirúrgico ☐ Laboratório ☐ Biotério ☐ Outro

10.8. PÓS-OPERATÓRIO

10.8.1. OBSERVAÇÃO DA RECUPERAÇÃO

Não ☐
Sim ☐ Duração

10.8.2. USO DE ANALGESIA

Não ☐ Sim ☐

Em caso de não uso no pós-operatório, justifique:

Fármaco
Dose (UI ou mg/kg)
Via de administração
Frequência
Duração

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

10.8.3. OUTROS CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Não ☐ Sim ☐

Em caso de sim, indique-os:

--

10.9. EXPOSIÇÃO / INOCULAÇÃO / ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIA (INCLUÍDO TÓXICAS E RADIOATIVAS)

Não ☐ Sim ☒

Substância	Telmisartana
Dose (UI ou mg/kg)	5mg/kg massa
Via de administração	Incorporada a dieta
Frequência	Consumo diário durante o período de tratamento
Duração	5 semanas

Substância	Glicose
Dose (UI ou mg/kg)	1mg/kg massa
Via de administração	Orogástrica
Frequência	1 vez
Duração	Gavagem (15 segundos)

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de uma substância. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todas as substâncias sejam contempladas.

11. EXTRAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Não ☐ Sim ☒

Material biológico	Pâncreas
Quantidade	100
Frequência	1 vez
Método de coleta	Dissecção e Isolamento de ilhota.

Material biológico	Tecido adiposo Branco
Quantidade	100
Frequência	1 vez
Método de coleta	Dissecção do tecido adiposo branco.

Utilize esta tabela para o preenchimento de um material biológico. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os materiais sejam contemplados.

12. FINALIZAÇÃO

12.1. MÉTODO DE INDUÇÃO DE MORTE

Descrição	Câmara de CO ₂
Substância, dose, via	O camundongo permanecerá em câmara fechada, exposto ao CO ₂ , via respiratória, no qual, a câmara com um fluxo de 100% de CO ₂ na ordem de 20% do volume da câmara por minuto e manter o fluxo por pelo menos 1 minuto após a ausência de movimentos respiratórios (apneia).

Caso método restrito, justifique:

12.2. DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO

Descarte biológico especializado em sacos plásticos brancos identificados com o símbolo de infectante.

12.3. FORMA DE DESCARTE DA CARCAÇA

Recolhimento e incineração por empresa especializada contratada pelo HUPE/UERJ para tal fim.

13. RESUMO DO PROCEDIMENTO

(relatar todos os procedimentos com os animais)

METODOLOGIA

Experimento 1:

Animais e Protocolo Experimental

Camundongos machos da linhagem C57BL/6J serão mantidos em caixa e ambiente apropriados. Os animais terão livre acesso à ração e água potável e serão avaliados diariamente quanto às condições de saúde. A partir de 12 semanas de idade, os animais serão alimentados com dieta padrão para camundongos (10% lipídios, 14% proteínas, 76% hidratos de carbono – 3,8 kcal/g) ou dieta *high fat* (49% lipídios) baseadas na AIN-93-M, ambas produzidas pela PragSoluções (Jaú, SP, Brasil, www.pragsolucoes.com.br). O esquema dietético se dará durante dez semanas, quando os animais serão redivididos aleatoriamente, iniciando-se o tratamento, com um total de seis grupos:

- a) **SC** (*standard chow* - dieta controle ao longo de todo o experimento), n=16.
- b) **SC-Tel** (*standard chow* + *Telmisartana* – dieta controle + tratamento com telmisartana por 5 semanas), n=17.
- c) **SC - Tel/ Pair - feeding** (*standard chow* - dieta padrão na quantidade consumida pelo grupo SC-Tel), n=17.
- d) **HF** (*high fat* – dieta com 49% de lipídios ao longo de todo o experimento), n=16
- e) **HF - Tel** (*high fat* + *Telmisartana* – dieta com 49% de lipídios + tratamento com telmisartana por 5 semanas), n=17.
- f) **HF - Tel/ Pair - feeding** (*high fat* – dieta com 49% de lipídios na quantidade consumida pelo grupo HF-Tel), n=17.

A Telmisartana (Sigma Aldrich) será incorporada a dieta, na dose de 5mg/kg massa. A massa corporal (MC) e a pressão arterial sistólica – PAS (pletismografia da artéria da cauda – Pletismógrafo, Panlab, Espanha) serão aferidas semanalmente e o controle de ingestão alimentar será realizado diariamente.

Análise metabólica

Ao final do experimento serão realizados o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) para a avaliação da tolerância à glicose. Em ambos os testes a glicemia será mensurada com glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

Eutanásia

Os animais serão submetidos ao jejum de 6 horas. No momento da eutanásia os animais serão colocados numa câmara de CO₂. O tórax será aberto, expondo o coração, e a amostra de sangue será obtida rapidamente por punção cardíaca (átrio direito) e destinada para posteriores dosagens bioquímicas (TG, colesterol total e multiplex). O TAB (retroperitoneal, epididimal, inguinal) e o

pâncreas serão dissecados e pesados e em seguida fixados em formalina de Millonig; processado para microscopia de luz e eletrônica de transmissão, além de congelado (-80°C) para *Western blot* e RT-PCR. Para as duas últimas técnicas, as ilhotas pancreáticas serão isoladas pelo método de digestão por colagenase [21].

Análise bioquímica

Após a coleta de sangue, o plasma será separado por centrifugação (120g por 15 min) e estocado em -80°C até a realização das análises. Para dosagem de colesterol total e triglicérides será utilizado Analisador Semi-Automático de Bioquímica (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). As concentrações plasmáticas de insulina, leptina, adiponectina, IL-6, TNF- α e GLP-1 serão mensuradas por ELISA com a utilização de Kits específicos para camundongos (Millipore, Missouri, USA).

Quantificação do pâncreas e tecido adiposo

Após a dissecação e pesagem do pâncreas e depósitos de gordura, estes ficarão em formalina por 48 horas e, posteriormente serão processados e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Os blocos serão seccionados seriados com 5 μ m de espessura e as lâminas serão coradas com hematoxilina e eosina. As análises serão realizadas a partir da aquisição de imagens digitais (TIFF format, 36-bit color, 1280 – 1024 pixels, LC Evolution camera, Olympus BX51 microscope) e com auxílio do software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Será estimada a área seccional média dos adipócitos e das ilhotas pancreáticas de forma aleatória, com um mínimo de 250 adipócito e 125 ilhotas por grupo. A densidade de volume (Vv) das ilhotas e de gordura pancreática serão estimadas pelo método de contagem de pontos. O Vv das ilhotas multiplicado pela massa do pâncreas informará a massa da ilhota [22].

Após a imunomarcção, será avaliada a imunodensidade para glucagon e insulina, a qual refletirá o percentual de ilhota ocupado por células alfa e beta-pancreáticas, ou seja, o Vv de células alfa e beta, respectivamente. Essas análises serão feitas por meio de segmentação de imagens com auxílio do software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A partir desse resultado, a massa de célula alfa será obtida pela multiplicação da massa da ilhota pelo Vv de célula alfa e a massa de célula beta pela multiplicação da massa da ilhota pelo Vv de célula beta [20, 23].

Imunofluorescência

Será utilizado o mesmo tecido pancreático preparado para microscopia de luz. A recuperação antigênica será feita com tampão citrato (pH 6.0, 60°C) e o bloqueio com cloreto de amônio e glicina 2%. Incubação ocorrerá simultaneamente com anti-glucagon e anti-insulina, overnight a 4°C. Posteriormente, as amostras serão incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa 488 e 546. As lâminas serão montadas com DAPI (marcação nuclear) e SlowFade, e as imagens capturadas por microscópio confocal (Zeiss - LSM 510). A técnica de imunofluorescência indireta será utilizada para dupla marcação com insulina e glucagon, com objetivo de analisar a distribuição das células alfa e beta nas ilhotas pancreáticas.

Western Blot

Ilhotas pancreáticas isoladas e tecido adiposo armazenados (-80°C) serão direcionados para extração das proteínas, com tampão de lise (1 mL tampão/100 μ g tecido), para posterior quantificação da concentração protéica (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). As amostras serão aplicadas no gel de poliacrilamida e separadas de acordo com seu peso molecular por eletroforese. Dar-se-á a transferência do gel para a membrana por eletrotransferência semi-dry. A membrana será incubada com anticorpo primário overnight 4°C anti-proteína de interesse. No dia seguinte, a membrana será incubada com anticorpo secundário acoplado à biotina, e posteriormente estreptavidina acoplada à peroxidase. A reação será visualizada por incubação com ECL e exposição em filme fotográfico em câmara escura. Serão analisadas no pâncreas as expressões das proteínas

que fazem parte da cascata de sinalização da insulina: receptor de insulina, IRS-1 e 2, Akt, p-Akt, JAK-2, p-JAK-2, STAT-3, p-STAT-3 e SOCS-3; interação do PPAR- β/δ com o eixo incretinas (SREBP-1c e GLP-1R) e mecanismos apoptóticos (Bcl-2 e caspase 3); assim como a expressão das seguintes proteínas no tecido adiposo branco: IL-6, resistina, leptina, insulina, adiponectina, MCP-1 e TNF- α .

RT-PCR

As ilhotas pancreáticas isoladas e o tecido adiposo branco serão transferidos para microtubos autoclavados contendo solução de lise para extrair e isolar o RNAm. Este será quantificado utilizando contador espectrofotômetro. O cDNA será sintetizado a partir do RNAm das amostras. Para amplificação do cDNA, o mesmo será misturado com o primer do gene de interesse e levado ao Sybergreen Mix. As condições da reação de amplificação dependerão do gene em questão a ser amplificado. Será determinada a expressão gênica das mesmas proteínas designadas para Western blot.

Experimento 2:

Cultura de Células

A fim de confirmar os mecanismos propostos pela telmisartana no ensaio *in vivo*, será feita a cultura de ilhotas pancreáticas. Será adicionado ao meio de cultura o palmitato (AGS de 16 átomos de carbono) a fim de induzir a lipotoxicidade. Após 24 horas de incubação será adicionado ao meio:

- a) Telmisartana
- b) GW0742 (agonista PPAR- β/δ)
- c) GSK 3787 (antagonista PPAR- β/δ)
- d) Telmisartana + GSK 3787

As combinações referidas acima visam comparar os efeitos da telmisartana com o agonista PPAR- β/δ seletivo e a administração do antagonista desse fator de transcrição visa confirmar a ação da telmisartana, uma vez que esperamos bloquear o efeito proposto na presença do antagonista.

Pâncreas

Ilhotas isoladas pelo método da collagenase e da linhagem INS-1 serão cultivadas em culturas em monocamada, tal como descrito anteriormente na literatura [24], em meio RPMI-1640 normal suplementado com 10 mmol / l de HEPES, 10% de FCS inativado pelo calor, 2 mmol / l, L-glutamina, piruvato de 1 mmol / l de sódio, 50 mmol / l β -mercaptoetanol, 100 UI / ml de penicilina, e 100 ug / ml de estreptomicina a 37 ° C em um (5% de CO humidificada 2 / 95% ar) atmosfera. O clone (832/13) de INS-1 celular será usado porque ele apresenta melhor características de diferenciação em termos de secreção de insulina estimulada pela glicose do que a linha original de células INS-1 [25]. Quando as células atingiram 80% de confluência (após aproximadamente 7 dias), serão lavadas com PBS e pré-incubadas a 37 ° C durante 90 min numa solução de Krebs-Ringer HEPES bicarbonato (KRBH) contendo 1 mmol / L de CaCl₂, 5 mmol / l de NaHCO₃, 25 mmol / l de HEPES (pH 7,4) suplementado com 3 mmol / l de glucose, e 0,1% de BSA desengordurada (Fracção V, Sigma). Os fármacos serão adicionados ao meio durante os últimos 30 minutos do período de pré-incubação. As células serão então lavadas com PBS e incubadas durante os tempos indicados no mesmo meio suplementado KRBH contendo as substâncias a ser testadas. Serão analisadas as mesmas proteínas e genes que foram analisados *in vivo*.

14. TERMO DE RESPONSABILIDADE **(Leia cuidadosamente antes de assinar)**

Eu, Vanessa de Souza Mello (nome do responsável), certifico que:

- a) li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura:

Vanessa de Souza Mello

Data: _22_ / _10_ / 2014__