BRUNA LEÔNCIO BARBOSA

**Redução da produção de H₂S no fígado de
camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.**

São Paulo
2019

BRUNA LEÔNCIO BARBOSA

**Redução da produção de H₂S no fígado de
camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Fisiologia Humana, do Instituto de
Ciências Biomédicas no
Departamento de Fisiologia e
Biofísica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

BRUNA LEÔNCIO BARBOSA

**Redução da produção de H₂S no fígado de
camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Fisiologia Humana, do Instituto de
Ciências Biomédicas no
Departamento de Fisiologia e
Biofísica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta
de Oliveira Carvalho

Versão corrigida

São Paulo
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barbosa Leôncio , Bruna
Redução da produção de H₂S no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. / Bruna Barbosa Leôncio ; orientadora Carla Roberta de Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2019.
85 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. SULFETO DE HIDROGÊNIO. 2. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOOLICA. 3. RESISTÊNCIA À INSULINA. 4. CISTATIONINA BETA SINTASE . 5. CISTATIONINA GAMA LIASE . I. Roberta de Oliveira Carvalho, Carla , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Leôncio Barbosa

Título da Dissertação/Tese: Redução da produção de H₂S no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Orientador: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da modulação da produção do H2S no fígado de camundongos obesos secundário à dieta hiperlipídica*", registrado sob o protocolo nº **92/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **09/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Carla Roberta de Oliveira Carvalho**
- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*
- Membros da Equipe: *Bruna Leôncio Barbosa (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Investigation of H2S production in liver of DIO mice*", protocol nº **92/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/9/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Carla Roberta de Oliveira Carvalho**
- Team members: *Bruna Leôncio Barbosa (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/Male	2 meses/months	80

São Paulo, 19 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

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

Decl. CEUA.209.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **92/2016/CEUA**, de 09/08/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "**Avaliação da modulação da produção do H₂S no fígado de camundongos obesos secundário à dieta hiperlipídica**", de responsabilidade da Profa. Dra. **Carla Roberta de Oliveira Carvalho**, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, para ampliar o número de amostras para confirmação:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	C57BL/6	Macho	2 meses	40

São Paulo, 14 de novembro de 2017.

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

Dedico a Deus, que é o grande inspirador e guia da minha vida! Foi por ele, com ele e para ele que realizei esse trabalho.

Dedico também àqueles que são a minha razão de viver: minha mãe Alair, meu pai Bruno, que já está no céu, mas intercede por mim. Ao meu marido Du e aos meus filhos Maria Eduarda e Bruno Fernando, que colaboraram muito para realização desse trabalho. É para eles e por eles!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Jesus que me deu a força e a graça necessária para concluir esse projeto. Sem ele eu jamais teria conseguido ir até o fim. Esse trabalho foi por ele, com ele e para ele. Agradeço também a Nossa Senhora das Graças que intercedeu por mim nesse tempo! Gratidão!

À minha orientadora, Carla Carvalho, por ter me dado a oportunidade e ter acreditado em mim quando eu não acreditava mais. Uma profissional incrível, mas muito mais do que isso, uma das pessoas mais humanas que já conheci. De uma empatia que não tem igual. Nos impulsiona a dar passos mais largos.

Ao Laboratório de Sinalização Intracelular, especialmente a Lay, Gabi, Flávia, Victor, me acolheram com muito carinho e não mediram esforços para me ajudar em todos os sentidos! Gratidão!

Ao Laboratório de Biologia Molecular, passamos a dividir o mesmo laboratório no meio do percurso e realmente nos tornamos uma só família. Obrigada por toda acolhida! Agradeço em especial ao técnico Gilson Murata. O que dizer do Gil? Que pessoa incrível! Sempre disposto ajudar, ensinar, colaborou muito no meu trabalho. Gratidão Gil!

E a todos dessa grande família, Fran que entrou junto comigo e dividiu as ansiedades de iniciante no mestrado, Takeo, Joice, Gisela, Tanyara e a professora Silvana Bordin, que sempre chega com muito bom humor e agradinho para nós!

Aos meus colaboradores, que contribuíram para o enriquecimento dessa dissertação Layanne Araújo, Amanda Monteiro, Karla Feitosa, Gilson Murata, Simone Teixeira, Gabriela Moreira, Leandro Rodrigues, Marcelo Muscará, Soraia Costa, Silvana Bordin.

Aos secretários do programa de pós-graduação, José Maria e Paloma, por todo o auxílio e paciência.

As agências de fomento, FAPESP (Processo: 2016/066911-3) – auxílio a pesquisa individual e bolsa CNPQ: 137123/2016-7 – TAXA DE BANCADA – 303543/2014-0, que contribuíram financeiramente para o desenvolvimento dessa dissertação.

A minha família, devo tudo a eles. Meu marido (Du) que pacientemente compreendeu toda minha correria, estresse, ausência e me apoiou em tudo. Em muitos momentos assumiu o cuidado total com a casa e filhos. Falando em filhos, meus filhos são tudo na minha vida, meus amores! Agradeço muito porque quando penso que não vou conseguir eu olho para eles, recupero a força e me

sinto encorajada a ir além. Maria Eduarda e Bruno Fernando, minhas inspirações! Meu tudo! Sem eles, não faria tanto sentido!

A minha mãe (Alair), meu Deus! Quantas vezes me socorreu e me ajudou em tudo! Abriu mão de momentos de descanso, adiou viagens nos meus momentos mais críticos nessa fase. Ela e o Claudio não mediram esforços. Amo muito e serei eternamente grata! Às minhas irmãs Silmara, Camila, Cinthia, meus cunhados, sobrinhos e sobrinhas, sobrinhos netos. Essa família que me inspira, me traz paz, tranquilidade, amor e muito acolhimento. Eles são o suporte! Gratidão a Deus por ter cada um deles na minha vida. Nossos encontros aos domingos são como combustível para começar um novo tempo.

E ao meu pai, que hoje já está no céu, mas intercede por mim de lá de cima! Tenho certeza que me ajudou muito durante todo esse tempo. Gratidão!

Aos meus amigos dos jovens sarados, minha segunda família que me sustentou na oração, em especial o núcleo de famílias que compreendeu as minhas ausências mesmo que isso gerasse sobrecarga. Sempre tinha uma palavra de apoio! Gratidão

À todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização dessa dissertação.

Bruna Leôncio Barbosa

RESUMO

Barbosa, BL. Redução da produção de H₂S no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. 2019. 85 p. Dissertação de mestrado em Ciências – Fisiologia Humana – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) é uma molécula gasosa sinalizadora que atua sobre processos fisiológicos e fisiopatológicos, promovendo a sulfidação de moléculas celulares como a Keap 1. É sintetizado principalmente pelas enzimas cistationina–gama-liase (CSE) e cistationina beta-sintase (CBS), ambas dependentes do co-fator 5'-fosfato de pirodoxal, e que utilizam o L-cisteína como substrato. Essas enzimas estão presentes em vários tecidos incluindo o fígado. O camundongo CBSKO apresenta fenótipo de homocistinúria, ou seja, além da homocisteinemia apresenta estresse oxidativo, fibrose e esteatose hepática. Ademais, há estudos *in vitro* sugerindo um papel desse gás reduzindo a captação de glicose hepática. A hipótese dessa dissertação é que a ingestão de dieta hiperlipídica (DHL) modifica a produção de H₂S no fígado de camundongos e que isso seja um evento precoce a instalação do fígado gorduroso ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Para isso, foram usados camundongos C57Bl6 alimentados com dieta hiperlipídica por 5 períodos diferentes (10, 20, 40, 60 e 80 dias de dieta) e avaliados a evolução ponderal, os consumos alimentar e calórico diários, a tolerância à glicose e à insulina (GTT, ITT e Kitt), nos animais vivos. Nos fragmentos hepáticos retirados após a eutanásia foram avaliados a produção de H₂S, a morfohistologia com corantes HE e *picrocirius red*, as expressões proteica e gênica das enzimas CBS e CSE, a quantificação do conteúdo de triglicérides, a detecção de F4/80 e as atividades de enzimas antioxidantes (catalase, GPx e arginase). A massa corporal foi aumentada a partir de 20 dias de DHL acompanhada de intolerância/resistência à insulina, no entanto, aos 10 dias da dieta já havia intolerância à glicose. Aos 40 dias de DHL foi detectado redução da produção de H₂S e início da presença de vesículas intracelulares nos hepatócitos, correspondendo a cerca de 5% dos hepatócitos com esteatose. No entanto, não houve relação clara entre expressão

proteica ou gênica das enzimas CBS e CSE com a produção do gás. Aos 60 dias de DHL houve esteatose em 20% dos hepatócitos. Aos 80 dias da dieta, além da esteatose em cerca de 25% dos hepatócitos, foram detectados sinais de inflamação através da detecção do marcador inflamatório F4/80 por imunohistoquímica, aumento de deposição de colágeno nos espaços vasculares e aumento da atividade da ALT sanguínea, caracterizando um quadro de transição inicial de esteatose para esteato-hepatite induzida pela DHL. Assim, concluímos que a produção hepática de H₂S foi reduzida antes da instalação do fígado gorduroso induzido pela DHL a despeito da ausência de modificação na expressão proteica das enzimas CBS e CSE.

Como esse gás modula a atividade da via Keap 1/Nrf2, centrais na manutenção do sistema antioxidante celular, é possível sugerirmos participação dessa redução não apenas no mecanismo celular/tecidual gerador do fígado gorduroso e mas também para a transição da esteatose para a esteato-hepatite.

PALAVRAS-CHAVES: Sulfeto de hidrogênio. Doença gordurosa hepática não alcoólica (DGHNA). Resistência à insulina. Cistationina beta sintase (CBS). Cistationina gama liase (CSE).

ABSTRACT

Barbosa, BL. Reduction in H₂S production in the livers of mice fed a hyperlipidic diet. 2019. 75 p. Master of Science Dissertation – Human Physiology – Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Hydrogen sulfide (H₂S) is a gaseous signaling molecule that regulates a variety of physiological and pathophysiological processes through sulphydratation. It is primarily synthesized by cystathionine-gamma-lyase (CSE) and cystathionine beta-synthase (CBS), which are expressed in the liver, require 5'-pyrodoxal phosphate as a co-factor, and use L-cysteine as a substrate. Interestingly, CBS knockout (CBS KO) mice present homocystinuria and associated homocysteinemia, as well as oxidative stress, fibrosis and hepatic steatosis. Furthermore, *in vitro* studies suggest that this gas reduces hepatic glucose uptake. It was hypothesized that mice fed a high fat diet (HFD) would display an early reduction H₂S production by the liver and that this event could occur prior in the establishment of fatty liver or NAFLD, which is associated with diet induced obesity (DIO). Towards the goal of gaining a better understanding of H₂S production during the onset and progression of DIO, male C57B16 mice were fed a HFD for 10, 20, 40, 60 or 80 days. During the experimental period, weight evolution, daily food and caloric intake, as well as glucose and insulin tolerance (GTT, ITT and Kitt) were evaluated. At the end of each time period hepatocyte morphology was assessed by HE and picrocirius red staining, CBS and CSE gene and protein expression were evaluated, triglyceride content was quantified, F4/80 antigen was detected and antioxidant enzyme (catalase, GPx and arginase) activities were determined. The results showed that mice fed a HFD for 20 days or longer presented an increase in final body weight. Reduced glucose tolerance and insulin resistance were observed after consuming the HFD for 10 and 20 days, respectively. Intracellular vacuoles were detected in the hepatocytes after 20 days of the HFD. The amount of compromised hepatocytes increased from 2% after 20 days of the HFD, to about 5% after 40 days, to approximately 20 to 25% after 60 and 80 days. After consuming the HFD for 80 days, there was an observed ballooning of hepatocytes, increased F4/80

detection indicating the presence of inflammatory infiltrates, increased collagen fiber detection in the vascular spaces, and increased serum ALT activity. There was a ~50% reduction in H₂S production in the liver samples from animals fed a HFD for 40 days; however, there was no clear relationship with the alterations detected in CBS and CSE gene or protein expression. Based on the results, the development of fatty liver occurs later in the DIO mice. Additionally, the spectrum of the developed NAFLD presented incipient steatohepatitis characteristics. The reduction in H₂S gas production appeared after the installation of insulin resistance, but prior to the establishment of NAFLD. Therefore, we conclude that alterations in hepatic H₂S production is an early event associated with the onset of NAFLD, and it may play a role in the progression from simple steatosis to NASH, considering its described effect upon the antioxidant system mediated by the Keap-1/Nrf2 pathway.

KEYWORDS: Hydrogen sulfide. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Insulin resistance. Cystathionine beta synthase (CBS). Cystathionine gamma lyase (CSE).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese de H ₂ S	19
Figura 2	Sulfidratação de cisteínas da proteína Keap	20
Figura 3	Esquema representativo dos grupos experimentais	29
Figura 4	Sistema teste com 270 pontos	36
Figura 5	Massa corporal (g) dos animais alimentados com DP e DHL	42
Figura 6	Consumo alimentar e calórico	43
Figura 7	Glicemia basal	45
Figura 8	Índice de desaparecimento da glicose (kitt)	45
Figura 9	Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT)	47
Figura 10	EXpressão proteica e grau de fosforilação da proteína AKT	48
Figura 11	Atividade das enzimas ALT e AST	49
Figura 12	Conteúdo total de triglicérides	50
Figura 13	Análise histológica por HE	52
Figura 14	Análise histológica com <i>picrosirius red</i>	53
Figura 15	Expressão gênica de citocinas	55
Figura 16	Expressão gênica e atividade da arginase 1	56
Figura 17	Expressão do marcador de macrófagos ativos F4-80	57
Figura 18	Produção de H ₂ S	58
Figura 19	Expressão gênica e proteica das enzimas CSE e CBS	59
Figura 20	Atividade enzimática de glutathione peroxidase e catalase	60
Figura 21	Esquema representativo dos resultados obtidos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> – PCR	34
tabela 2	Estimativa da eficiência alimentar e do ganho de peso	44
tabela 3	Representação sintética dos resultados obtidos.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

3MST	3 mercatopiruvato transferase
AG	Ácidos graxos
AKT	Proteína quinase
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AST	Aspartato aminotransaminase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Cisteína aminotransferase
CBS	Cistationina beta sintase
CEA	Constante de eficiência alimentar
CO	Monóxido de carbono
CSE	Cistationina gama liase
CYP7A1	colesterol 7-alfa hidroxilase ou citocromo P450 7A1
db/db	Camundongo diabético e obeso (com mutação inativadora do receptor de leptina)
DHGA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DHL	Dieta hiperlipídica
DM	Diabetes mellitus
DP	Dieta padrão
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
GH	Hormônio de crescimento
GPCC	Ganho de peso por consumo calórico
GPx	Glutathione peroxidase
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IKK β	Inibidor do fator nuclear kappa b
IMC	Índice de massa corporal
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
JNK	Cinases Jun N-terminal
Keap-1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
KO	<i>Knockout</i>
LXR2	<i>oxysterol-sensing transcriptional factor nuclear liver X receptor</i>
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like 1</i>
Nrf2	Fator nuclear 2 relacionado ao fator eritroide
ob/ob	Camundongo geneticamente obeso (ausência de leptina)
P5P	Piridoxal-5-fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
RI	Resistência à insulina
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Tecido adiposo branco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	<i>Animais</i>	29
3.2	<i>Monitoramento do peso corporal e ingestão alimentar</i>	30
3.3	<i>GTT e ITT</i>	30
3.4	<i>Coleta do fígado e sangue</i>	31
3.5	<i>Quantificação da produção de H₂S</i>	32
3.6	<i>PCR</i>	32
3.7	<i>Immunoblotting</i>	34
3.8	<i>Morfologia histológica</i>	
3.9	<i>Dosagem de AST e ALT</i>	
3.10	<i>Atividade enzimática de GPx, catalase e arginase 1</i>	
3.11	<i>Extração lipídica</i>	39
3.11	<i>Aspectos éticos para manejo dos animais</i>	40
3.13	<i>Análise estatística</i>	40
4	RESULTADOS	41
4.1	<i>Caracterização dos animais</i>	42
4.2	<i>Determinação da atividade sérica de AST e ALT e caracterização histológica hepática</i>	49
4.3	<i>Marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios</i>	54
4.4	<i>Produção de H₂S e expressão das enzimas CBS e CSE</i>	58
4.5	<i>Atividade das enzimas antioxidantes</i>	60
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÃO	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

O sulfeto de hidrogênio (H_2S), também conhecido como gás sulfídrico, é um gás incolor, com odor de ovo e carne podres. Além desse odor característico é tóxico e inflamável. Foi, infelizmente, usado no passado como arma química de Guerra, na década de 1910. Seus efeitos tóxicos estão relacionados à concentração de exposição e tempo; levando a sintomas que variam de leve irritação ocular, perda da capacidade olfativa, edema pulmonar, excitabilidade de sistema nervoso central e morte imediata por parada respiratória. No entanto, ele também é produzido pelos animais e humanos, principalmente pelas bactérias do sistema digestório. (FIORUCCI et al., 2006)

Na década de 1950 foi descoberto que células de mamíferos eram capazes de sintetizar esse gás (STIPANUK; BECK, 1982). Um primeiro papel fisiológico foi descrito como efeito neuromodulador do gás (ABE; KIMURA, 1996). Recentemente, foi evidenciado o efeito de H_2S na proteção ao prurido e inflamação da pele *in vivo* e *in vitro* (RODRIGUES et al., 2016). Além disso, foram também determinados efeitos sobre a pressão arterial (DONGÓ et al., 2018; WANG, 2012; YANG et al., 2008). Assim, o H_2S passou a ser considerado membro da família de mediadores biológicos denominados gasotransmissores, juntamente com o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO). Essas moléculas são capazes de atravessar livremente as membranas celulares sem a utilização de transportadores específicos (SZABÓ, 2007).

Zhao e colaboradores, 2001, demonstraram o papel do H_2S sobre os canais de potássio dependente de ATP (adenosina trifosfato), K_{ATP} . Estudos *in vivo* demonstraram efeito hipotensor transitório em ratos após injeção com doador do gás, independente da frequência cardíaca. Esse efeito foi antagonizado pelo bloqueio dos canais K_{ATP} com a glibenclamida. Além disso, uso de anéis isolados de aorta de ratos incubados com o gás mostrou efeito direto do gás sobre relaxamento desses vasos. Finalmente, através de *patch-clamp* os autores demonstraram aumento da corrente iônica do canal K_{ATP} com a presença do gás.

Os canais K_{ATP} também estão presentes nas células β pancreáticas e desempenham papel central no mecanismo de secreção de insulina induzida pela glicose. Com a metabolização intracelular da glicose há geração de ATP; conseqüentemente a razão ATP/ADP aumenta no citoplasma das células β pancreáticas. A consequência desta aumentada relação ATP/ADP é o fechamento dos K_{ATP} , com subsequente despolarização da membrana celular. Essa despolarização leva a abertura de canais de cálcio com conseqüente influxo de cálcio para a célula β resultando em manutenção da despolarização da membrana plasmática e desencadeamento do processo exocitótico (HABER et al., 2001). A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

O efeito do H_2S sobre a secreção da insulina foi demonstrado *in vitro* em células MIN 6 (células β pancreáticas de camundongos) e em ilhotas isoladas de ratos Wistar. O tratamento com doador de H_2S na presença de glicose induziu redução da produção de ATP e, conseqüentemente, redução da liberação de insulina (KANEKO et al., 2006; MOUSTAFA; HABARA, 2016).

O H_2S atua induzindo a sulfidação de moléculas. Sulfidação é um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) de cisteína para persulfetos (-SSH) (FILIPOVIC, 2015; MUSTAFA et al., 2009). Um alvo bem estabelecido cuja ação é regulada por sulfidação é o fator de transcrição chamado Keap1 (Proteína 1 Associada a ECH Semelhante a Kelch).

A sulfidação da proteína Keap 1 interfere com sua interação com outra proteína, o Nrf-2 (fator nuclear 2 relacionado ao eritroide). Quando não sulfidado o Keap 1 se associa ao Nrf2 e o direciona para a via de degradação do complexo ubiquitina/ligases. Assim, quando há sulfidação da Keap 1 há dissociação do complexo Keap 1/Nrf2 permitindo que o Nrf2 transfira do citoplasma para o núcleo celular. No núcleo, o Nrf2 se associa ao elemento de resposta

antioxidante (ARE) ativando a transcrição de vários genes de defesa antioxidante (CALVERT et al., 2009; FILIPOVIC, 2015) (Figura 1).

Figura 1: A proteína Keap-1 (Proteína 1 Associada a ECH Semelhante a Kelch) mantém Nrf-2 no citoplasma, onde pode ser degradado.

A sulfidação de cisteínas da proteína Keap1 não permite sua interação com Nrf-2 provocando a dissociação e translocação desse para o núcleo. No núcleo, ele se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) causando a transcrição de vários genes de defesa antioxidante (FILIPOVIC MILOS, 2015).

Os precursores do H_2S são L-cisteína e homocisteína. O primeiro é um aminoácido não essencial que pode ser obtido pela dieta ou sintetizado a partir de metionina. O segundo é um aminoácido sulfidrílico produzido como intermediário durante a metabolização da metionina. A L-cisteína também pode ser resultante da metabolização de homocisteína. Tanto metionina quanto L-cisteína estão presentes em ovos, carnes, produtos lácteos e cereais integrais (HINE; MITCHELL, 2014).

A produção endógena do H_2S envolve uma via enzimática e uma via não enzimática. A via enzimática é caracterizada pela ação de três enzimas. As enzimas dependentes de piridoxal-5-fosfato (P5P), cistationina- β -sintase (CBS) e cistationina- γ -liase (CSE), podem metabolizar L-cisteína, resultando na geração de H_2S . A L-cisteína pode também ser convertida em 3-mercaptopiruvato através da enzima cisteína aminotransferase (CAT), cuja atividade depende da presença de um alfa-cetoglutarato. A mercaptopiruvato transferase (3MST), que é amplamente localizada nas mitocôndrias, pode metabolizar o 3-mercaptopiruvato e, conseqüentemente, gerar H_2S (FLANNIGAN et al., 2013) (Figura 2).

A via não enzimática acontece nos eritrócitos. A quantidade gerada por essa via corresponde uma parcela muito pequena do total de H_2S produzido (SEARCY et al., 1998).

Figura 2: Biossíntese de H_2S em células de mamíferos.

Principais vias para síntese de H_2S . L-cisteína é o principal substrato para geração de sulfeto de hidrogênio a partir da ação das enzimas CBS, CSE e a via CAT/3MST neste processo.

A metabolização desse gás acontece de várias maneiras, sendo as mais importantes as que ocorrem na mitocôndria e no citosol. Na mitocôndria a via de oxidação do tiosulfato a sulfito e posteriormente a sulfato por ação da enzima sulfito oxidase (KIMURA, 2012) e no citosol o H_2S pode sofrer metilação pela tiol-S-metiltransferase, originando metanotiol e dimetilsulfeto. Em seguida, os metabólitos do H_2S são excretados principalmente pelos rins (FURNE et al., 2001). Assim, a manutenção de H_2S dentro de valores fisiológicos envolve vários processos. Além da oxidação e metilação há *scavenging* pela meta-hemoglobina e pela expiração (revisado por MANI et al., 2014).

O excesso de H_2S causa toxicidade e esse efeito envolve sua capacidade em bloquear a enzima citocromo C oxidase, inibindo a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e consequentemente, prejudicando o metabolismo energético (DORMAN et al., 2002; KHAN et al., 1990).

O fígado é um órgão importante tanto para a síntese quanto para a remoção do H_2S . Ambas as enzimas, CBS e CSE, estão presentes nesse órgão. Pessoas com deficiência de CBS apresentam a homocistinúria. Doença de base genética relacionada ao metabolismo de aminoácidos. O camundongo *knockout* para CBS (CBSKO) apresenta fenótipo semelhante às pessoas com homocistinúria, ou seja, além da homocisteinemia, estresse oxidativo, fibrose e esteatose hepática (ROBERT et al., 2005; WATANABE et al., 1995).

Ademais, há estudos *in vitro* sugerindo um papel desse gás reduzindo a captação de glicose hepática via inativação de AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) e glicoquinase, bem como interferindo com a produção hepática de glicose através de inibição da AKT e ativação da PEPCK (revisado por MANI et al., 2014). Por outro lado, há basicamente um estudo mostrando o papel do H_2S sobre o metabolismo hepático lipídico. Os autores demonstraram em camundongos CBSKO reduzida beta-oxidação e secreção de VLDL-colesterol e presença de esteatose (ENOKIDO et al., 2004).

A esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a manifestação hepática da síndrome metabólica, caracterizada pelo acúmulo de triglicérides em mais de 5% de hepatócitos na ausência de uso

excessivo de álcool (JIN; VOS, 2015). Essa doença tem um espectro que varia de simples acúmulo de gordura intracelular, denominada esteatose, até condição inflamatória, denominada esteato-hepatite (EHNA ou NASH) podendo evoluir para presença de fibrose a cirrose, que por fim levará a disfunção grave do fígado.

A identificação de esteatose hepática e esteato-hepatite é feito através da análise histológica do tecido. Na esteatose há presença de gotas de gordura intracelular em número igual ou maior a 5% dos hepatócitos, sem evidências de lesão hepatocelular na forma de balonização dos hepatócitos. Já na EHNA ou NASH há, além da esteatose, infiltrados celulares inflamatórios nos espaços perivascularares, balonização dos hepatócitos, com presença ou não de fibrose (STEFAN; HÄRING; CUSI, 2018).

Os macrófagos residentes ou células de Kupffer hepáticas tem papel importante no desenvolvimento de esteato-hepatite (EHNA), uma vez que produzem citocinas pró-inflamatórias e recrutam outras células inflamatórias. Em linhas gerais, o processo inflamatório é regulado pelo equilíbrio entre as células pró-inflamatórias M1 e as anti-inflamatórias M2. Assim, a liberação exacerbada de mediadores derivados das células M1 contribui para a patogênese da esteatose hepática, do recrutamento de células imunológicas inflamatórias e da ativação da fibrogênese (SICA; INVERNIZZI; MANTOVANI, 2014). Em contrapartida, a ativação da via M2 permite recrutamento de citocinas anti-inflamatórias que promovem a resolução da inflamação e reparação tecidual (WAN et al., 2014)

Uma consequência importante da ativação da via pro-inflamatória é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS) que levam ao estresse oxidativo e nitrosativo, respectivamente, causando danos celulares (LEFRANC et al., 2018; RAHAL et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produtos normais do metabolismo oxidativo, da bioenergética mitocondrial e da função do sistema imunológico. Isso é um processo fisiológico que ocorre após as refeições pelo aumento da glicose sanguínea, porém é equilibrado pela defesa antioxidante. No entanto,

pacientes diabéticos e pré-diabéticos são mais susceptíveis a estresse oxidativo pós-prandial devido ao prolongado período de exposição a hiperglicemia (TUCKER; FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2008). As formas de ROS mais frequentes são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^{\cdot-}$) e peróxido de lipídios, que estão envolvidos no desenvolvimento, morte e diferenciação celular. As RNS são óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Ambas as espécies reativas podem se ligar a ácidos nucleicos, enzimas, lipídios de membrana e proteínas, promovendo alterações nos processos fisiológicos celulares (GRAVES, 2012; RAJENDRAN et al., 2014; ROLEIRA et al., 2015).

Esse cenário está relacionado ao desenvolvimento de obesidade, doenças cardiovasculares e até insuficiência hepática (LEFRANC et al., 2018; RAHAL et al., 2014).

Pessoas com obesidade e resistência à insulina tem 4 a 11 vezes mais riscos de desenvolver DHGNA. A resistência periférica à insulina pode causar um aumento de lipídios hepáticos, devido ao aumento de ácidos graxos (AG) no plasma, glicose e insulina, que estimula a síntese de lipídios e prejudica a β-oxidação hepática. Dietas com alto teor de lipídios podem promover inflamação e estresse oxidativo, bem como causar resistência à insulina hepática antes de uma resistência à insulina sistêmica (NAGLE; KLETT; COLEMAN, 2008).

A resistência à insulina é um componente central da síndrome metabólica, que por sua vez, é um importante mecanismo fisiopatológico do DM2 (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HARCOURT; PENFOLD; FORBES, 2013).

Ocorre nos principais tecidos alvos da ação metabólica da insulina como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. No fígado, tem um papel importante na hiperglicemia de jejum. A elevada concentração de glicose sanguínea estimula as células β pancreáticas a uma secreção aumentada de insulina, resultando em hiperinsulinemia associada a concomitante intolerância à glicose e/ou hiperglicemia. A manutenção desse estado pode levar a uma insuficiência relativa na produção e secreção de insulina e, conseqüentemente

a instalação do DM tipo 2. Assim, pode-se dizer que a resistência à insulina (RI) hepática é um estado pré-diabético (SAH et al., 2016).

A RI está associada a defeitos nos elementos da complexa rede da via intracelular de sinalização desse hormônio; incluindo redução da fosforilação em resíduos tirosina do receptor de insulina (IR) e seus substratos mais importantes (IRS1/2), bem como redução da fosforilação em serina da AKT nos tecidos-alvos da insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2008; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Em situações de obesidade, há uma elevação nos níveis de citocinas inflamatórias teciduais, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que podem ativar diversas serinas quinases intracelulares (JNK e IKK β). A ação dessas quinases sobre o IRS1 está associada a redução ou inibição da ação da insulina (AGUIRRE et al., 2002; GO; UYSAL; MAEDA, 2009; QUON et al., 2002).

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas associadas ou não a doenças cardiovasculares. Define-se obesidade como aumento da massa corporal às custas de aumento da massa gorda. Em humanos adultos são utilizados o índice de massa corporal, IMC, e a circunferências da cintura para avaliação do estado nutricional. O IMC é analisado conforme a classificação definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS): < 18,5 corresponde a baixo peso; valores entre 18,5 e menor do que 25 correspondem a peso adequado; valores entre 25 e menor do que 30 correspondem a sobrepeso e valores iguais ou maiores do que 30 kg/m² correspondem à obesidade.(LEFRANC et al., 2018).

Nos modelos animais murinos a caracterização de obesidade e/ou sobrepeso é definida pela demonstração de aumento da massa corporal total às custas de aumento da massa gorda dos distintos territórios. Nos roedores, a massa gorda também está distribuída pelos tecidos adiposos localizados nas regiões subcutânea e visceral. Sendo que a visceral apresenta as divisões anatômicas: mesentérica, perigonadal, ovariana ou epididimal, peri-renal e pericardíaca. (PARK et al., 2001)

Ademais, a obesidade pode ser consequência de fatores genéticos, endócrinos e ambientais. Dentre os fatores genéticos existem os camundongos com defeitos na ação da leptina, os camundongos denominados db/db e ob/ob (SANCHES et al., 2015).

Dos fatores endócrinos classicamente conhecidos como indutores de obesidade estão os que são induzidos pelo excesso de glicocorticoides, os animais privados dos hormônios sexuais, os com excesso de GH e os com hipotireoidismo, principalmente (LEFRANC et al., 2018). Por outro lado, dois outros modelos animais bem conhecidos e utilizados são os animais submetidos a dieta hipercalórica, com base em excesso de lipídeos, e os envelhecidos.

O envelhecimento, tanto em humanos quanto nos modelos murinos apresentam um progressivo aumento da massa gorda acompanhado ou não de um quadro de sarcopenia. Além disso, esses animais apresentam intolerância à glicose acompanhada de hiperinsulinemia e resistência à ação da insulina (AMBROSI et al., 2017; LINGALA; GHANY, 2016; WANG; REN, 2018). Há dados na literatura demonstrando que nessa condição a resistência à insulina parece ser resultante de defeito da ação da insulina principalmente no tecido muscular e em menor extensão no fígado. Por outro lado, nos animais com obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, além de apresentarem intolerância à glicose e resistência à insulina, os valores de glicemia em jejum são maiores do que os detectados nos envelhecidos. Além disso, os alimentados com dieta hiperlipídica evoluem para uma condição semelhante ao diabetes do tipo 2 em humanos, inicialmente com hiperinsulinemia e com o decorrer do tempo com hipoinsulinemia relativa (TURNER et al., 2013).

Assim, considerando o potencial papel fisiológico do H_2S sobre a regulação da função hepática, avaliamos o efeito da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica na instalação da DGHNA e na produção desse gás em camundongos machos C57Bl6.

A hipótese dessa dissertação é que a ingestão de DHL modifica a produção de H_2S no fígado de camundongos e que isso é um evento precoce a instalação de DHGNA nesse modelo experimental.

2 OBJETIVO

Avaliar a produção do H_2S e a expressão gênica e proteica das enzimas CSE, CBS e MST em fígado de camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica (DHL).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem C57BL/6, fornecidos pelo biotério de criação da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada a 25 ± 2 °C com acesso *ad libitum* a ração e água. Foram utilizadas 2 dietas distintas, controle e hiperlipídica. A ração comercial para roedores (Nuvilab® - CR-1), que contém 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 5% de celulose e 4,5% de vitaminas e minerais e fornece 3.2 Kcal/kg de ração, foi usada como a dieta controle desde o desmame dos animais. A dieta hiperlipídica (DHL) peletizada foi adquirida da PragSoluções Biociências (Jaú, SP), continha 15,8% de proteína, 27% de carboidrato e 57,2% de lipídeos, além de vitaminas e minerais e forneceu 5.5 Kcal/kg de ração.

Camundongos com 11 a 12 semanas de idade foram distribuídos em 5 grupos que receberam a DHL pelos períodos de 10, 20, 40, 60 e 80 dias. Os controles foram pareados em 3 grupos para excluir a diferença etária com os correspondentes alimentados com a DHL. Assim, os experimentos foram conduzidos em 3 grupos centrais, como ilustrado na figura 2.

Figura 3: Esquema representativo dos grupos experimentais realizados.

Os camundongos iniciaram o recebimento da DHL com idade entre 11 e 12 semanas. Após os respectivos dias de consumo exclusivo da DHL foram realizadas as análises e a

eutanásia para coleta de sangue e fígado. Com isso, houve 3 grupos centrais analisados e que serão apresentados em conjunto na seção Resultados, com idade variando entre 13 e 25 semanas de vida no momento da eutanásia.

3.2 Monitoramento do peso corporal e ingestão alimentar

O peso corporal e a ingestão alimentar foram monitorados e utilizados para cálculos de eficiência alimentar e coeficiente de ganho de peso por consumo calórico.

O consumo alimentar foi avaliado a cada 2 dias desde o início da oferta da DHL. Seu valor foi obtido através da subtração entre a quantidade de alimento oferecido e o rejeito no dia posterior.

A eficiência alimentar foi medida através dos coeficientes de eficiência alimentar (CEA) e do ganho de peso por consumo calórico (GPCC). CEA é a relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido e GPCC é a relação do ganho de peso pelo número de calorias ingeridas.

$$CEA = (PF - PI) / TA$$

Em que PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento;

PI: peso corporal do animal no início do experimento em gramas,

TA: quantidade total de alimento ingerido no período em gramas.

$$CGPCC = (PF - PI) / \text{kcal ingeridas}$$

Em que PF: peso corporal (g) final do animal durante o período,

PI: peso corporal do animal (g) no início do experimento;

Kcal: valor calórico da dieta ingerida.

3.3 Testes de tolerância à insulina (ITT) e glicose (GTT)

Os testes foram realizados no período da tarde, com animais acordados e sob restrição alimentar de 6 horas (AGOUNI et al., 2010; FAM et al., 2008). Foi realizada secção superficial da cauda para coletadas de sangue antes (basal) e

após a administração de glicose ou insulina para mensuração da glicose sanguínea.

Os animais receberam 0,75 mU/g do peso de animal de insulina regular diluída em salina via dose única através de injeção intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas sequencialmente até 120 minutos para determinação da tolerância à insulina (4, 8, 12, 16, 30, 60, 90, 120 minutos). O período de 4 a 16 minutos foi utilizado para calcular a constante de decaimento da glicose (Kitt).

Para a realização do teste de tolerância à glicose os animais receberam, em dose única, uma solução contendo glicose via intraperitoneal (1 mg/g de peso corporal) (ZHAO et al., 2011) e tiveram coletadas alíquotas de sangue caudal após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão de glicose.

As glicemias foram mensuradas utilizando fitas reativas (Roche®) e aparato de leitura das fitas (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). A constante de decaimento da glicose foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$, onde $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos 4 a 16 minutos após infusão de insulina (BONORA et al., 2000).

3.4 Extração dos tecidos e sangue total

Animais sob restrição alimentar de 3 horas foram anestesiados profundamente com tiopental (50 mg/kg de peso corpóreo). Após confirmação do efeito anestésico pela ausência de retirada da pata a estímulo doloroso por pressão em uma das patas, eles foram submetidos a laparotomia ampla para retirada do fígado e coleta do sangue pela veia cava inferior. Amostra do fígado foi utilizada para as distintas análises: produção de H_2S , PCR, *immunoblotting* típico e análises histológicas. O sangue total foi centrifugado e o soro foi estocado em freezer a -70 graus C para posterior análise.

3.5 Quantificação da produção de H₂S em fragmentos de fígado (método do sulfeto de chumbo)

A capacidade de produção de H₂S foi avaliada em sobrenadantes de homogenatos de fígado com tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), contendo 5 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoridro (PMSF), na proporção 1:5 (1 g de tecido para 5 ml de tampão), em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado (10.000 g; 10 min, 4 °C) e o sobrenadante utilizado. Duzentos microlitros de cada amostra foram dispostos em placa de 96 poços, juntamente com 12,5 µl do substrato L-cisteína (10 mM), 12,5 µl do co-fator 5' fosfato de pirodoxal (2 mM) e 25 µl de tampão fosfato ou dos inibidores enzimáticos da geração de H₂S: PGL (DL-propargilglicina – 0,0002 - 10 mM, inibidor seletivo da CSE), BCA (β-ciano-L-alanina – 0,0002 - 2 mM, inibidor seletivo da CSE) ou CHH (o-carboximetil-hidroxilamina-hemiidratado – 0,0002 - 2 mM, inibidor não seletivo da CBS e CSE). Em seguida, o papel filtro (12 x 8 cm) impregnado com acetato de chumbo foi disposto sobre a placa contendo as amostras, acima da fase líquida. A placa foi incubada por 40 – 240 min a 37 °C. A medida da geração de H₂S no papel filtro foi mensurada via formação de sulfeto de chumbo (Hine et al., 2015). Tal reação resulta da interação do H₂S produzido pelas amostras com o acetato de chumbo contido no papel, culminando numa coloração escurecida do precipitado de sulfeto de chumbo, que permitiu sua quantificação via análise densitométrica. Os dados obtidos foram expressos como quantidade de H₂S gerado por período ou concentração de proteína, extrapolados pela curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de NaHS (1,95 – 2000 µM), dispostas na mesma placa das amostras.

3.6 PCR em tempo real (qPCR)

A extração de RNA de amostras do fígado seguiu as recomendações do fabricante do reagente comercial QIAzol®. Resumidamente, cerca de 100 mg do

tecido congelado foram imersos em 1 ml de QIAzol®, homogeneizados em tubos autoclavados usando-se um homogeneizador de bancada [Polytron PT2100 (Kinematica, Luzern, Suíça)] sob gelo até o final do processo. Posteriormente, o homogenato foi transferido para tubos de 1,5 ml e adicionado de 200 µl de clorofórmio. A solução foi agitada em vortex por 15 segundo e ficou em repouso a temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram submetidos à centrifugação (12000 g/ 20 min/ 4 °C) e a fase aquosa foi coletada.

Foram adicionados à solução coletada 500 µl de isopropanol e essa mistura foi agitada por inversão (10 vezes). Novamente, os tubos foram centrifugados (12000 g/ 10 min/ 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante da centrifugação foi lavado com 70 % etanol gelado e, após secagem em TA, foi ressuspenso em água ultrapura. A concentração de RNA da solução final foi quantificada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm através do equipamento Nanodrop. Uma alíquota foi submetida à eletroforese em gel de agarose desnaturante para análise da integridade das frações ribossomais.

As amostras com qualidade adequada foram submetidas à síntese de cDNA e amplificação por qPCR, de acordo com metodologia padrão.

A amplificação seguiu protocolo padrão de qPCR com *SYBR Green* [Power SYBR Green (Applied Biosystems – Life Technologies, Foster City, CA, EUA)]. Esse protocolo padrão consistiu de aquecimento a 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 3 min) e anelamento/extensão (60 °C, 1 min). Os dados (CTs) obtidos foram exportados para uma planilha Excel disponibilizada pelo fabricante para cálculo da expressão dos mRNA. As reações de amplificação foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real [Mx3005P (Agilent, Santa Clara, CA, EUA)]. A expressão de cada gene de interesse foi normalizada pela expressão do gene constitutivo B2M (β2-microglobulina).

Tabela 1: Sequencia dos *primers* utilizados para a análise da expressão gênica.

<u>GENE ALVO</u> <u>(camundongo)</u>	SEQUENCIA DE PRIMERS	# PB
<u>B2M</u>	F: CCCCCTGAGACTGATACATACG R: CGATCCCAGTAGACGGTCTTG	
<u>CSE</u>	F: TGCTGCCACCATTACGATTA R: GATGCCACCCTCCTGAAGTA	<u>105pb</u>
<u>CBS</u>	F: AGAAGTGCCCTGGCTGTAAA R: CAGGACTGTCGGGATGAAGT	<u>137PB</u>
<u>3-MST</u>	F: GGACATCCTGGAGAACTTGG R: GGAATTCAGTGAACGGGATG	<u>149PB</u>
<u>IL10</u>	F: TGCCAAGCCTTATCGGAAATG R: AAATCGATGAGAGCGCCTCAG	<u>150PB</u>
<u>F480</u>	F: CCTGAACATGCAACCTGCCAC R: GGGCATGAGCAGCTGTAGGA	<u>200PB</u>
<u>ARGINASE</u>	F: GGAAGAGTCAGTGTGGTGGTGC R: CAGGAGAAAGGACACAGGTTGC	<u>177PB</u>
<u>IL1β</u>	F: GGCAGCTACCTGTGTCTTTCCC R: ATATGGGTCCGACAGCACGAG	<u>203PB</u>

3.7 Immunoblotting ou Western Blot

Fragmentos do fígado de cada animal foram retirados e homogeneizados em tampão de extração total contendo SDS10%, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM utilizando Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, USA). Todas as amostras permaneceram em fervura por 7 minutos, e em seguida, foram colocadas no gelo. Os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel. Alíquotas dos sobrenadantes das amostras foram submetidos a quantificação proteica usando-se o reagente de Bradford (BioRad, USA). O restante dos sobrenadantes foram incubados com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V, amostra : tampão). O volume equivalente a 50 ug de proteínas totais de cada amostra tratada foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (DPS-PAGE 8% e 12%) no aparelho para minigel (BioRad, USA). Após a eletroforese, as proteínas separadas foram transferidas eletricamente do gel para uma membrana de

nitrocelulose, por meio de um aparelho de transferência (*BioRad*) por 2 h a 120 V, como descrito por Towbin et al. (1992). A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para detecção das enzimas chaves na síntese de H₂S CSE (cistationina gama-liase p45, 12217-1-AP, Protein Tech) e CBS (cistationina-β-sintase p60, H00D00875-MD1), para as proteínas da via da sinalização da insulina IRS-1 (06-248, Upstate); AKT (126811, Abcam); pSer⁴⁷³AKT (7985-R, Santa Cruz) em solução bloqueadora, porém acrescida de 3% de BSA (ao invés do leite Molico) durante a noite a temperatura de 4°C. Após esse período, as membranas foram lavadas por 3 ciclos com solução basal (10 minutos) e novamente incubadas com solução basal acrescida de 1% de BSA e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por uma hora a temperatura ambiente. Por fim, essas membranas foram submetidas a incubação rápida com a solução para detecção por quimiluminescência, como descrito no protocolo do kit comercial GE. A emissão de luz foi detectada e captada pelo sistema de detecção fotodocumentador GE Amersham Imager 600. As intensidades das bandas revelada foram determinadas através da densitometria óptica das imagens utilizando-se o programa Image J 1.43u (National Institutes of Health, USA). A análise foi feita utilizando-se a razão entre a leitura das bandas reveladas e a magnitude da marcação em 80% das membranas coradas com Ponceau e expressas como unidades arbitrárias.

3.8 Análise morfológica hepática

3.8.1 Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

Um fragmento de fígado de cada animal, retirado do lobo anterior esquerdo, foi fixado em solução de formaldeído 10%, durante 8 horas. Ao término do período de fixação, os fragmentos foram armazenados em cassetes

(individuais) e mantidos em solução de álcool 70% durante a noite. Posteriormente, o material foi submetido a uma sequência de banhos com álcool 95%, álcool 100% e xilol. Ao término dos banhos, o material foi incluído em parafina, a uma temperatura de 60°C. Os cortes foram realizados em micrótomo (Zeiss), com espessura de 5µm. Após disposição em lâminas de microscopia, foi realizada a coloração com HE para avaliação das vesículas correspondentes às gotículas de gordura nos hepatócitos. As imagens (20 de cada animal) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NIS-Elements BR 3.1 software. As imagens foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução para quantificação através de um sistema teste com 270 pontos (PT) (Figura 4).

Figura: 4 Sistema teste com 270 pontos.

Sistema teste foi fixado no monitor, cada ponto individual (PI) que ficava sobre as gotículas de gordura era contado. Após essa contagem foi feita uma relação de PI/PT, essa relação gerou uma densidade de volume de esteatose hepática. Os resultados foram expressos em percentagem. Adaptado de (CATTA-PRETA et al., 2011).

3.8.2 Picrosirius Red

Os cortes foram submetidos a coloração com *picrosirius* para identificar as fibras colágenas, em vermelho. As lâminas contendo os cortes foram incubadas com esse corante por 30 minutos e, em seguida, lavadas com água corrente.

Foram visualizadas 25 imagens (campos), 3 cortes diferentes de animais por grupo (n=5), usando objetiva de 20X.

A marcação de fibras colágenas foi identificada nos espaços porta-hepáticos e feito um cálculo do percentual de espaços-portas que apresentaram a deposição de colágeno em relação ao total observado em cada corte por animal.

3.8.3 Avaliação da expressão de F4-80 – Imuno-histoquímica (IHC)

Fragmentos de fígado incluídos em parafina, como descrito no item descrito acima (4.7), forneceram cortes com espessura de 5µm. Esses cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em etanol (100-75%) e em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica.

A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento (98 °C) em tampão citrato de sódio 10 mM contendo Tween 20 0,05% (pH 6.0, 10 min) e a peroxidase endógena foi bloqueada por H₂O₂ 1% (v/v) em tampão PBS (22 °C, 45 min). Cada uma das etapas posteriores foi seguida por lavagem das amostras em tampão PBS (100 mL, 5 minutos), exceto antes da incubação com o anticorpo primário, realizado em câmara úmida.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com a incubação com soro de cabra (doador do anticorpo secundário) diluído em PBS (1:1), acrescido de 10% de albumina do soro bovino (Sigma, St. Louis, MO), por 1 h à temperatura ambiente (22°C). Em seguida, os cortes foram incubados durante toda a noite com o anticorpo primário policlonal anti-F4-80 (Bio-Rad AbD Serotec, UK) diluído em PBS (1:200) com 0,3% de Tween 20 a 4°C. Adiante, os cortes foram incubados por 1 h com o anticorpo secundário biotinilado de coelho conjugado com imunoperoxidase (1:1000) (Sigma-Aldrich, USA) diluído em PBS, em temperatura ambiente.

Afim de amplificar a reação de imunoperoxidase, foi feita incubação com o complexo estreptavidina de um kit comercial (Vectastin ABC Kit; Vector Laboratories, USA) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi

adicionada uma gota de 3-3'-diaminobenzidina 0,3% (Pierce, Rockford, EUA) em PBS com H₂O₂ (0,03%, v/v), deixado incubar por 3 min. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, desidratados e dispostos sob as lâminas.

As imagens foram selecionadas e fotografadas com o auxílio de microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japão) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). A área imunomarcada foi analisada com o programa de imagem *Image Pro Plus* 4.5 (Media Cybernetics Co., Bethesda, MD, EUA). Pelo menos 5 áreas por lâmina foram selecionadas. Para garantir a comparação entre as secções, todas as configurações para obtenção das imagens (tempo de exposição e iluminação) foram mantidas constantes. A expressão de F4/80 foi calculada considerando a área total da imagem demarcada e a área ocupada pelas células marcadas com o anticorpo. Um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado à área selecionada. O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total.

3.9 Dosagem de enzimas hepáticas AST e ALT no soro.

As transaminases foram dosadas no plasma dos animais, seguindo o protocolo do kit comercial colorimétrico (Labtest, SP). O sangue foi coletado após a eutanásia dos animais e centrifugado por 10 minutos a 5.000rpm. Alíquotas do plasma foram armazenadas no biofreezer -70°C para posterior utilização.

3.10 Atividade das enzimas: Arginase, GPx (Glutathione peroxidase) e Catalase

Fragmentos de fígado previamente congelados foram homogeneizados em tampão contendo 50mM de Tris e inibidores de protease. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm a 4 graus por 10 min, para remoção dos debris teciduais. Cento e vinte microlitros do sobrenadante foram incubados com outros 120uL de MnCl₂ por 10min a 55°C. Essa mistura foi utilizada para a determinação de cada uma das 3 atividades enzimáticas, segundo os protocolos dos kits comerciais.

Para determinação da arginase, foi acrescido 240uL de L-arginina (0,5M) e deixado incubar a TA por 1h. Em seguida, foi determinada a concentração de ureia gerada, conforme kit comercial (LabTest, SP).

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi avaliada conforme descrita por Wendel (1980) e o tampão de ensaio consiste de 48mM fosfato de potássio, 0,12mM de NADPH, 0,38mM de EDTA, 0,95mM de azida sódica, 3,2U de glutathiona redutase, 1mM de glutathiona, 0,02mM de DTT e 0,0007% de peróxido de hidrogênio. O volume total do ensaio será de 175 microlitros de tampão de ensaio e 10 microlitros de homogenato será adicionado. A reação será iniciada pela adição da glutathiona e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida de decréscimo na absorbância em 340nm em um leitor de placas de 96 poços. Brancos foram realizados na ausência do homogenato. A primeira foi a conversão de glutathiona reduzida em glutathiona oxidada e peróxido de hidrogênio a água. A glutathiona oxidada atua como substrato da segunda reação e é catalizada pela glutathiona redutase. Assim, há recuperação da glutathiona reduzida através da oxidação do NADPH a NADP⁺. A oxidação de NADPH foi acompanhada por decaimento de absorbância a 340 nm diretamente proporcional a atividade de GPx.

A atividade da catalase foi realizada seguindo o protocolo do kit comercial Cayman Chemical Company, USA.

3.11 Extração lipídica

Amostras de fígado pesando 100mg foram homogeneizadas em 4mL de mistura metanol: clorofórmio (2:1). Essa solução ficou sob agitação contínua a 4°C durante a noite, em recipiente fechado. Após esse período foi adicionado 2mL de NaCl a 0,6% e submetida a centrifugação a 2.000g por 20 min. A centrifugação promoveu a separação em 2 fases, uma solúvel e outra insolúvel. A fase inferior, insolúvel, foi separada e submetida a evaporação através do *Speed Vac*. Por fim, esse pellet foi diluído em 200uL de isopropanol e utilizado para a determinação do triglicerídeo total usando kit comercial

LabTest (Adaptado de Folch et al., 1957). O resultado foi expresso como mg/g de tecido.

3.12 Aspectos éticos para manejo dos animais

Foram seguidos os preceitos para cuidado e manejo dos animais para experimentação, conforme orientação da CEUA/ICB/USP. Foi programado inicialmente uso de 80 animais para a execução desse projeto, sendo 10 por subgrupo experimental. No entanto, devido a um problema técnico/elético com o biofreezer que armazenava as amostras, várias foram perdidas e foi necessário ampliar o número de animais para um total de 120. Dessa maneira, foi possível concluir os experimentos previstos e que serão apresentados a seguir.

3.13 Análise estatística

Por ter havido 2 fatores distintos no conjunto dos dados obtidos, ou seja, idade e a dieta, a análise estatística foi realizada pareando os grupos com mesma idade, à exceção da realizada entre os grupos controles. A representação gráfica utilizada da diferença estatística foi com um asterisco (*) nas comparações em relação ao grupo controle correspondente e com letras diferentes quando referente aos 3 subgrupos controles.

O número de amostras para cada variável analisada está descrito nas legendas e variou de 3 a 10 animais para cada subgrupo.

Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.01[®] (GraphPad Software, La Jolla-CA, USA). As amostras foram avaliadas quanto à distribuição normal e submetidas à análise de variância ANOVA uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*) ou ao teste *T* de *Student*, para o grupo mais velho, alimentado por 80 dias e seus respectivos controles. ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$

4 RESULTADOS

4.1. Caracterização dos animais

A figura 4 mostra a massa corporal final dos animais alimentados com a DHL por períodos diferentes, 10 a 80 dias, e seus respectivos controles. Os animais foram inicialmente distribuídos nos diversos grupos de modo a garantir peso inicial semelhante. Ao final de cada período experimental tiveram a massa corporal avaliada. Todos iniciaram com idade entre 11 e 12 semanas de vida.

Os animais controles mantiveram a dieta padrão e seguiram pareados àqueles que receberam a DHL. Dentre os subgrupos controles, o com maior idade apresentou massa corporal maior que os demais (C1: $23 \pm 0,7^a$ g; C2: $25 \pm 1,5^a$ g; C3: $28 \pm 1,7^b$ g, $p < 0,05$). A ingestão da dieta hiperlipídica induziu aumento de peso corporal a partir de 20 dias de dieta e progressivamente maior até um platô com 60 dias de dieta (13%, 36%, 56% e 57% em relação aos respectivos controles, respectivamente, $p < 0,05$).

Figura 5: Massa corporal (g) dos animais alimentados com DP e DHL.

A massa corporal final foi avaliada no dia da eutanásia dos animais, quando ainda acordados, ao término do período correspondente à DHL, ou seja, 10, 20, 40, 60 ou 80 dias. Todos os animais iniciaram a DHL com idade entre 11 e 12 semanas. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$.

O consumo de ração padrão foi semelhante ao longo do tempo. Por outro lado, o consumo de DHL foi menor já no primeiro subgrupo, 10 dias, com valor médio individual de aproximadamente 2,5g/dia. Essa redução correspondeu a aproximadamente 20% do detectado nos subgrupos com dieta padrão (Figura 5A).

O consumo calórico dos animais com DHL foi cerca de 50% maior do que os controles (Figura 5B).

Figura 6: Consumo alimentar (g/animal/dia) e consumo calórico dos animais que receberam DP ou DHL.

Os animais controles (C) foram alimentados com dieta DP e os demais com a DHL por 10, 20, 40, 60 e 80 dias (H). Todos os animais iniciaram a ingestão da ração HL com 11 a 12 semanas de idade. Os animais controles estiveram pareados pela idade final correspondente ao grupo dieta HL. (A) Consumo individual diário das rações. (B) Consumo calórico calculado a partir do consumo da ração diário. A análise estatística utilizada foi ANOVA uma via, com post-hoc de Tukey e teste *T de Student* no grupo mais velho ($p < 0,05$) e os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

A tabela 2 apresenta uma estimativa da eficiência alimentar dos grupos que foram alimentados com as dietas padrão e hiperlipídica. A DHL resultou em aparente maior eficiência do que a padrão a partir do subgrupo 20 dias de consumo.

Tabela 2: Estimativa da eficiência alimentar e do ganho de peso por consumo calórico dos camundongos nos diferentes períodos.

GRUPO	Total de ração consumido no período experimental (g/ animal)	Total de ração consumido no período experimental (Kcal/g/ animal)	CEA calculado (PF-PI)/TA ingerido * 100	CGPC calculado (PF-PI)/Kcal ingerida * 100
C1	37	118	5 ± 3	2 ± 1
H10	27	148	8 ± 3	1 ± 1
H20	31	170	18 ± 8	3 ± 1
C2	92	294	3 ± 1	1 ± 0
H40	49	269	27 ± 3	5 ± 1
H60	48	264	36 ± 7	6 ± 1
C3	89	284	9 ± 2	3 ± 0
H80	60	330	38 ± 4	7 ± 1

PF: peso final; PI: peso inicial; TA: total alimento (ração).

Essa tabela apresenta cálculos obtidos a partir da média mensurada de consumo alimentar.

Após restrição de alimento por 6 horas a glicemia foi cerca de $30 \pm 17\%$ maior nos animais alimentados com a DHL desde 10 dias desse consumo (C1: $141 \pm 16 \text{ mg/dl}$; C2: $151 \pm 16 \text{ mg/dl}$; C3: $193 \pm 11 \text{ mg/dl}$; H10: $191 \pm 24 \text{ mg/dl}$; H20: $178 \pm 23 \text{ mg/dl}$; H4: $184 \pm 10 \text{ mg/dl}$; H60: $214 \pm 38 \text{ mg/dl}$; H80: $232 \pm 20 \text{ mg/dl}$; $p < 0,05$) (Figura 7).

Além disso, os animais controles mantiveram ao longo do período experimental uma taxa média de remoção da glicose induzida pela infusão aguda com insulina (Kitt) de $4\% \cdot \text{min}^{-1}$. Essa taxa foi reduzida a $2\% \cdot \text{min}^{-1}$, nos animais que receberam a DHL por 80 dias consecutivos (Figura 8).

Figura 7: Glicemia basal em camundongos submetidos a restrição alimentar por 6 horas e alimentados com DHL versus dieta controle.

As barras correspondem à média ($\pm$ DP) da glicemia obtida por amostras coletadas de secção caudal superficial em camundongos acordados e restritos à ração por 6 horas. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey, como recomendado pelo programa utilizado ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

Figura 8: Índice de desaparecimento da glicose (k_{itt}).

Com a glicemia mensurada aos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após infusão de insulina foi feito o cálculo da constante de desaparecimento da glicose (k_{itt}). Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com

DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles, $p < 0,05$. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

Os testes de tolerância à glicose, GTT, e à insulina, ITT, foram mais informativos quanto a evolução da homeostase metabólica dos diversos grupos do que o Kitt. Em síntese, houve modificações entre os animais controles com idades diferentes e nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (Figura 9).

A curva temporal de glicemia tanto nos animais que receberam a infusão de glicose (Figura 9 A-C) ou infusão de insulina (Figura 9 E-G) mostra que os controles apresentaram um padrão semelhante entre si. Nos GTTs houve aumento da glicemia aos 15 minutos após infusão, seguido de manutenção ou redução a partir dos 30 minutos, voltando a valores prévios à infusão aos 120 minutos. Enquanto que nas curvas dos ITTs houve redução da glicemia a partir dos 15 minutos da infusão do hormônio e gradual redução até os 60 minutos. No intervalo entre 60 e 120 minutos após a insulina a glicemia manteve-se menor do que a pré-infusão, mas relativamente constante nos 3 grupos de animais controles.

Por outro lado, o GTT dos animais alimentados com a DHL apresentou maior aumento da glicemia do que os respectivos controles a partir dos 15 minutos desde o grupo alimentado por 10 dias. O ITT também foi diferente entre os grupos com DHL e seus respectivos controles, no entanto, a primeira diferença foi detectada no grupo com 20 dias de DHL, com menor redução da glicemia no período entre 60 e 120 minutos da infusão do hormônio em comparação ao respectivo controle. A maior diferença nesse perfil glicêmico foi detectado no grupo alimentado por 80 dias com a DHL (Figura 9G).

A análise da AUC de cada um desses testes mostrou que o subgrupo C3 apresentou maior intolerância à glicose acompanhado de resistência à insulina que os demais grupos controles e a DHL induziu tanto redução da tolerância à glicose como da insulina (Figura 9 D e H). Além disso, a reduzida tolerância à glicose (Figura 9 A-D) precedeu a resistência à insulina nos grupos com DHL (Figura 9 E-F).

Figura 9: GTT e ITT em camundongos alimentados com DHL por diferentes períodos.

Os testes foram realizados em animais acordados e submetidos a restrição alimentar de 6 horas. Os controles receberam dieta padrão (barras pretas), normocalórica, e os demais receberam dieta hiperlipídica (barras cinzas) por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$. O número de amostras de cada

subgrupo está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$.

A expressão da proteína AKT, elemento importante das etapas iniciais da ação da insulina intracelular, foi maior no fígado dos animais controles mais velhos em relação aos demais controles (C1: $0,84 \pm 0,63$; C2: $0,55 \pm 0,06$; C3: $1,39 \pm 0,14$; $p < 0,05$). Além disso, a DHL induziu aumento dessa proteína nos animais com 60 dias de consumo e uma tendência estatística a redução nos animais com 80 dias dessa dieta ($p = 0,052$) (Figura 10A). O grau de fosforilação da AKT em resíduo Ser⁴⁷³, na condição de restrição alimentar de 6 horas, ficou próximo a zero nos diversos subgrupos (Figura 10B) e, consequentemente a relação estequiométrica entre grau de fosforilação e expressão dessa proteína também ficou ao redor de zero (Figura 10C).

Figura 10: Expressão proteica e grau de fosforilação da proteína AKT no fígado de camundongos alimentados com DHL por diferentes períodos.

Amostras de fígados foram retiradas nos animais em restrição alimentar de 6h após anestesia profunda e seguida de eutanásia por decapitação. Essas amostras foram tratadas para os ensaios de *immunoblotting* com os anticorpos específicos, como descrito em MM. O gráfico de barras corresponde a análise realizada em membranas contendo amostras de animais diferentes. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey, como recomendado pelo programa utilizado ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

4.2. Determinação da atividade sérica das enzimas AST e ALT e caracterização histológica hepática

A figura 11 mostra que não houve diferença na atividade das enzimas AST e ALT no sangue dos animais controles, alimentados com a dieta padrão. No entanto, com o tempo mais prolongado da dieta hiperlipídica, H80, foi detectado aumento da atividade da ALT (Figura 11 A), sem interferência na AST (Figura 11 B).

O conteúdo de triacilglicerol de amostras hepáticas foi semelhante entre os diversos grupos de animais (Figura 12).

Figura 11 – Atividade das enzimas ALT e AST no sangue de animais alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica por diferentes períodos.

Amostras de sangue foram retiradas dos animais após anestesia profunda e seguida de eutanásia por decapitação. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. O número de amostras de cada subgrupo está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

Figura 12: Conteúdo total de triglicérides no fígado de animais alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica por diferentes períodos.

As barras correspondem à média ($\pm$ SD) do conteúdo de triglicérides nas amostras de fígados. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais receberam dieta hiperlipídica por diferentes períodos, a saber, 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

Os cortes de fígado corados com HE dos diferentes grupos, como os apresentados na Figura 13, permitiram a quantificação do percentual de hepatócitos com vesículas intracelulares.

Os animais controles não apresentaram vacúolos nos hepatócitos. Por outro lado, foi possível detectar presença desses vacúolos a partir de 20 dias de DHL em $1,5 \pm 0,2\%$ dos hepatócitos. A análise quantitativa mostrou um progressivo aumento desse percentual para $5,6 \pm 0,7\%$ nos animais alimentados por 40 dias e para $22 \pm 3,7\%$ e $28 \pm 2,1\%$ nos animais com 60 e 80 dias de DHL, respectivamente (Figura 13, gráfico). Esses vacúolos estavam distribuídos

principalmente nos hepatócitos localizados dentro dos ácinos hepáticos. Além disso, o aspecto era microvacuolar ou microvesicular nas amostras dos animais alimentados até 60 dias com a DHL e com padrão macrovesicular, inclusive com presença de balonização de hepatócitos nos animais que se alimentaram por mais tempo com a DHL, H80.

Foi identificada a presença de fibras de colágeno no espaço porta-hepático com o corante *picrosirius red*. A figura 14 mostra cortes representativos dessa análise. Os fígados dos animais alimentados por 80 dias com a DHL apresentaram cerca de 60% dos espaços vasculares qualitativamente mais impregnados com o corante em comparação aos respectivos controles e demais grupos, indicando aumento da detecção de fibras colágenas nesses locais (Figura 14 - gráfico)

Figura 13: Análise histológica de cortes de fígados corados com HE.

Amostras de fígados foram retiradas nos animais após anestesia, fixadas e incluídas em parafina. Cortes de 5microm foram utilizados para coloração com hematoxilina e eosina. Imagens representativas de cada subgrupo 10, 20,40, 60 e 80 e seus respectivos controles estão apresentadas, com barra de escala de 100 μ m e aumento de 20X. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey, como recomentado pelo programa utilizado ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles, $p < 0,05$. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

Figura 14: Amostras de fígados dos animais coradas com *picrosirius red*, que marcam as fibras de colágeno.

Amostras de fígados foram retiradas nos animais após anestesia, fixadas e incluídas em parafina. Cortes de 5microm foram utilizados para coloração com *picrosirius red*. Imagens representativas de cada subgrupo estão apresentadas, com barra de escala de 100 μ m e aumento de 200X. O gráfico de barras corresponde a análise realizada em 3 a 4 animais de cada subgrupo. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles, $p < 0,05$. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

4.3. Marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios

Foram analisadas as expressões gênicas das citocinas e marcador pro-inflamatórios IL 1 β , TNF-alfa e F4/80 e dos fatores anti-inflamatórios IL10 e arginase 1 nos fragmentos hepáticos dos animais alimentados com dieta padrão e DHL. Além disso, foi medida a atividade indireta da arginase 1.

Nos animais controles mais velhos, subgrupo C3, foi detectado redução do mRNA da IL-10 (C1: $2 \pm 0,5$; C2: $0,9 \pm 0,5$; C3: $0,6 \pm 0,2$; $p < 0,05$) e ausência de mRNA ao TNF-alfa. A imposição da DHL não apresentou impacto sobre nenhuma dessas citocinas (Figura 15).

A arginase 1, por sua vez, apresentou aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão genica no grupo controle C2 e modulação devido a DHL. Nos animais com 40 dias de DHL houve aumento de aproximadamente 60% da expressão dessa enzima e nos com 80 dias redução de aproximadamente 30%,

em comparação aos respectivos controles (Figura 16A). A atividade enzimática não mostrou diferença entre os grupos, exceto pelo discreto, mas estatisticamente diferente aumento no grupo com 10 dias de DHL (Figura 16B).

Figura 15: Expressão gênica de citocinas inflamatórias (IL1B e TNF-alfa) e antiinflamatória (IL10) em fígado de camundongos alimentados com DHL.

Amostras de fígado congeladas coletadas após a eutanásia dos animais foram usadas para análise da expressão gênica de (A) IL10, (B) IL1B e (C) TNF-alfa, como descrito em MM. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. O número de amostras está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$.

Figura 16: Expressão gênica do marcador anti-inflamatório Arginase1 e atividade enzimática de Arginase 1.

Amostras de fígado congeladas coletadas dos animais após a eutanásia foram utilizadas para análise da (A) expressão gênica e (B) atividade da Arginase 1, conforme descrição em MM. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey, como recomendado pelo programa utilizado ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$. O número de amostras correspondente ao número de animais usados por grupo experimental está identificado abaixo de cada subgrupo entre parênteses.

O F4/80, marcador que identifica macrófagos ativados no tecido, foi detectado entre os hepatócitos nos cortes histológicos (Figura 16, painéis superiores). Houve aumento do mRNA do F4/80 no fígado dos animais alimentados pelo maior período desse estudo (Figura 16A). Além disso, foi detectado aumento na presença de células marcadas nos fígados dos animais controles mais velhos e aumento ainda maior no dos animais alimentados com a DHL pelo maior período, H80 (Figura 16B).

Figura 17: Expressão do marcador de macrófago em atividade F4-80.

Amostras de fígado foram incubadas com anticorpo anti-F4-80 como descrito em MM. Painel superior apresenta imagens representativas da imuno-histoquímica de cada subgrupo do estudo. Os gráficos inferiores apresentam (A) a expressão gênica desse marcador nas amostras de fígado (e (B) o percentual de células marcadas com o anticorpo anti-F4-80. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey, como recomendado pelo programa utilizado ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. O número de amostras, corresponde ao número de animais usados, está entre parênteses

abaixo de cada subgrupo. * $P < 0,05$ vs respectivo controle. Letras diferentes indicam a diferença estatística entre grupos controles. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$.

4.4. Produção de H_2S , expressão gênica e proteica das enzimas CBS e CSE

A Figura 18 mostra redução de aproximadamente 50% na capacidade de síntese de H_2S aos 40, 60 e 80 dias de DHL em comparação aos respectivos controles ($p < 0,05$).

Foi detectado alteração na expressão gênica das enzimas CBS e CSE (Figura 18 A e B). Os animais alimentados com a DHL por 10, 20 e 80 dias apresentaram redução da expressão das duas enzimas em comparação aos respectivos controles. CBS reduziu aproximadamente 30% nos tempos H10 e H20 e 80% nos animais que receberam dieta por 80 dias. CSE reduziu aproximadamente 70%, 50%, 80% respectivamente. Por outro lado, o subgrupo H40 apresentou aumento para de aproximadamente 115% da CSE.

A expressão proteica dessas enzimas revelou aumento para CBS nos subgrupos H10 ($187 \pm 36\%$) e H20 ($113 \pm 18\%$) e redução no H80 para $48 \pm 29\%$ ($p < 0,05$) em relação aos respectivos controles (Figura 18D). Acompanhado de redução da CSE no grupo H80 para aproximadamente 70% em relação ao respectivo controle (Figura 18E).

Figura 18: Produção de H_2S em fígado de camundongos alimentados com DHL.

Amostras de fígado foram utilizadas para medida da produção indireta de H_2S , como descrito em MM. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. O número de amostras está entre parênteses nos gráficos. * $P < 0,05$ vs respectivo controle.

Figura 19: Expressão gênica e proteica das enzimas CBS e CSE.

Amostras de fígados foram retiradas nos animais após anestesia profunda e seguida de eutanásia por decapitação. Essas amostras foram tratadas para extração do RNA mensageiro e para análise por *immunoblotting* com os anticorpos específicos, como descrito em MM. Os gráficos de barras correspondem a análise realizada em membranas contendo amostras de animais diferentes. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles. O número de amostras está entre parênteses nos gráficos. * $P < 0,05$ vs respectivo controle. Letras diferentes indicam a diferença estatística existente entre os controles, $p < 0,05$.

4.5. Atividade das enzimas antioxidantes: Glutathiona peroxidase (GPx) e Catalase

Não houve diferença na atividade das enzimas catalase e GPx devido o uso da DHL ou diferença da idade nos grupos controles. No entanto, foi possível detectar uma tendência estatística ($p=0,06$) de aumento de aproximadamente 30% da atividade dessa enzima no grupo alimentado por 10 dias com a DHL em relação ao respectivo controle (Figura 20).

Figura 20: Atividade enzimática de glutathiona peroxidase e catalase.

Amostras de fígados previamente congeladas foram tratadas para ensaios de atividade das enzimas GPx e catalase, como descrito em MM. Os gráficos de barras correspondem a análise realizada em cada subgrupo. Os controles receberam dieta padrão, normocalórica, e os demais dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos, a partir de 11 a 12 semanas de idade. Foi realizada análise estatística ANOVA uma via e pós-teste de Turkey ou teste *T de Student* para o grupo alimentado com DHL por 80 dias. * indica a diferença entre os grupos versus seus respectivos controles, $p<0,05$. O número de amostras está entre parênteses abaixo de cada subgrupo.

TABELA SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS

	C1	C2	C3	H10	H20	H40	H60	H80
Massa corporal final	↔	↔	↑	↔	↑	↑	↑	↑
Consumo alimentar diário	↔	↔	↔	↓	↓	↓	↓	↓
Consumo calórico diário	↔	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↑
Glicemia basal	↔	↔	↔	↑	↑	↔	↑	↑
Kitt	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↓
GTT	↔	↔	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ITT	↔	↔	↓	↔	↓	↓	↓	↓
AKT	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↑	↓
pAKT	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
pAKT/AKT basal	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Conteúdo TG	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
AST	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
ALT	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑
Esteatose (HE)	↔	↔	↔	↔	↑	↑	↑	↑
Colágeno (picosirius)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑
IL10 (RNAm)	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↔
IL1B (RNAm)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
TNF-alfa (RNAm)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Arginase-1 (RNAm)	↔	↔	↑	↔	↔	↑	↔	↓
Atividade	↔	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔
F4-80 (RNAm)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑
IH	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↑
H ₂ S	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↓
CBS (RNAm)	↔	↔	↑	↓	↓	↑	↔	↓
CBS WB	↔	↔	↔	↑	↑	↔	↔	↓
CSE (RNAm)	↔	↔	↔	↓	↓	↔	↔	↓
CSE WB	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↓
GPx	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Catalase	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔

↔: sem alteração; ↑: **aumento**; ↓: **redução**

5 DISCUSSÃO

Vimos que a dieta hiperlipídica é capaz de induzir aumento da massa corporal às custas de aumento da massa adiposa nos camundongos machos. Além disso, detectamos a instalação da DGHNA nesses animais, que foi precedida de intolerância à glicose, seguida de resistência à insulina e com redução na produção endógena hepática indireta do H_2S antes da instalação da esteatose hepática.

Por limitações do tempo para execução desse projeto de pesquisa e disponibilidade de animais fornecidos pelo biotério, os estudos acabaram sendo concluídos com animais em idades diferentes. Por conta disso, foi possível avaliar o impacto de uma idade maior sobre a produção do gás. Com o envelhecimento natural, tanto em humanos quanto em modelos murinos, há progressivo aumento da massa gorda que pode estar acompanhada de sarcopenia. Esse processo também apresenta intolerância à glicose, com hiperinsulinemia e resistência à insulina. Os animais controles mais velhos, grupo C3, apresentou esse fenótipo, com aumento da massa corporal, intolerância à glicose e resistência à insulina.

Os testes utilizados para a avaliação do efeito hipoglicemiante da insulina, ITT e índice de decaimento da glicose, Kitt, foram idealizados para uso em humanos e adaptados para uso em modelos animais. Assim, é interessante notar que o Kitt não apresentou a mesma resposta que o ITT. Houve redução desse índice apenas nos animais mais velhos e por mais tempo com a DHL, enquanto que com o ITT foi possível detectar redução do efeito hipoglicemiante da insulina a partir de 20 dias de DHL. Diante desse resultado, é possível considerarmos que o Kitt não é um teste acurado para avaliar a sensibilidade à insulina em camundongos.

O teste considerado padrão ouro para análise da ação metabólica da insulina é o *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico, tanto para humanos quanto para modelos animais. Estudos com esse método já demonstraram que a DHL é capaz de induzir resistência à insulina independente do aumento da massa adiposa visceral (PARK et al., 2001), mas também que há resistência à insulina

no fígado com 1 semana de DHL e no tecido muscular a partir de pelo menos 3 semanas (DONNELLY et al., 2005; TURNER et al., 2013).

No presente estudo, foi detectada maior glicemia após a infusão de mesma carga de glicose nos diversos animais com a DHL, ou seja, foi confirmada maior intolerância à glicose no modelo experimental usado. Há inúmeras evidências demonstrando o efeito adaptativo do pâncreas endócrino a dietas hiperlipídicas revisados em (BRUN; MAECHLER, 2016; JOUVET; ESTALL, 2017; KOWLURU; KOWLURU, 2018; WANG; YANG; ZHANG, 2016).

Assim, mesmo sem termos mensurado a insulinemia é possível especularmos que nosso modelo animal curse com hiperinsulinemia.

O aumento da massa corporal dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica foi resultante principalmente da maior eficiência alimentar desses. No entanto, nos primeiros 10 dias de DHL apesar do aumento do consumo calórico, não houve impacto sobre a massa corporal total dos camundongos. Em raciocínio simples, a homeostase energética é resultante do equilíbrio entre ingestão e gasto de energia. Com maior ingestão calórica e manutenção da mesma massa corporal, deverá ocorrer aumento do gasto energético, ou vice-versa. O gasto energético, por sua vez é resultante do tamanho corporal e da atividade física. Onde o tamanho e a composição corporal determinam a manutenção do gasto energético basal e corresponde a maior fração desse gasto diário, em cerca de 50 a 70%. A atividade física é o componente mais variável nessa relação e, o gasto energético induzido pelo consumo alimentar, em indivíduos em equilíbrio e com dieta mista, é da ordem de 10% (WESTERTEP, 2004).

Nas ultimas 2 décadas, com a identificação do tecido adiposo marrom (TAM), muito se aprendeu sobre a termogênese adaptativa independente do tremor muscular. Esses adipócitos contêm muitas mitocôndrias que expressam a proteína UCP1. Com isso, são capazes de oxidar rapidamente seus próprios estoques de AG e outros nutrientes vindos da circulação sanguínea, gerando, calor e aumentando o ritmo metabólico revisado por (MARLATT; RAVUSSIN, 2017). Assim, é possível a especulação de que para os animais alimentados com

a DHL por período curto de tempo, 10 dias, tenha havido aumento da termogênese adaptativa, em função do aumento do consumo calórico e que pode ter envolvido aumento da atividade física e/ou da atividade do TAM.

Outro aspecto relacionado a ingestão de DHL a longo prazo é o aumento de adipocinas e citocinas com ação pro-inflamatória (revisado por CARUSO; BALISTRERI; CANDORE, 2010). O tecido adiposo branco (TAB), em condições de normalidade da massa corporal, estoca lipídeos, regula a homeostase metabólica. Seus macrófagos residentes estão polarizados no fenótipo M2, liberando principalmente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e também expressando arginase. Em contraste, os macrófagos M1 expressam iNOS e citocinas pró-inflamatórias como IL1B e TNF-alfa. No entanto, com a obesidade o TAB torna-se inflamado, determinado por uma relação principalmente entre os adipócitos e os macrófagos (ZEYDA; STULNIG, 2007).

Há uma extensa lista de adipocinas e citocinas produzidas no tecido adiposo que atuam como mediadores endócrinos, induzindo resistência à insulina e aumentando a resposta inflamatória em outros tecidos. Dentre as adipocinas, a leptina em excesso está relacionada ao acúmulo de TG em tecidos outros que os adipócitos. As citocinas mais bem caracterizadas são IL-6, IL-1, TNF-alfa e IL10. As 3 primeiras são caracterizadas como pro-inflamatórias e a última anti-inflamatória (CARUSO; BALISTRERI; CANDORE, 2010; ZEYDA; STULNIG, 2007).

Assim, a presença de macrófagos ativados, marcados com o anticorpo anti-F4-80 (KHAZEN et al., 2005) nos fígados dos animais com 80 dias de DHL indicam estado inflamatório incipiente em comparação aos demais grupos. Aliás, a presença nos fígados dos animais controles mais velhos pode indicar presença de um estado inflamatório relacionado com o envelhecimento normal desses animais.

A DHL induziu presença de vacúolos intracelulares nos hepatócitos a partir de 20 dias de consumo. No entanto, o percentual de células com esses vacúolos foi de aproximadamente 3%. Para humanos, define-se esteatose quando existe pelo menos 5% ou mais de hepatócitos com vacúolos

intracelulares. Embora para camundongos essa definição não esteja estabelecida, nós consideramos presença significativa de esteatose quando foi detectado percentual maior do que 5% de células à semelhança ao demonstrado por ARAUJO et al., 2018. Assim, no modelo animal usado, a esteatose hepática foi detectada após o aumento da massa corporal, à detecção da intolerância à glicose e simultaneamente à resistência à insulina.

A esteatose hepática é causada por excessivo aporte de lipídios e/ou reduzida capacidade de oxidação. Além disso, há uma grande associação entre obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia e alteração do perfil sanguíneo de adipocinas (KITADE et al., 2017; NEUSCHWANDER-TETRI, 2019). Por conta do aumento da presença de obesidade e RI no mundo a presença da doença gordurosa hepática não alcoólica, DGHNA, está crescendo também.

Essa doença é constituída por um espectro contínuo de doenças associadas e caracterizadas por acúmulo progressivo de lipídeos nos hepatócitos. Progrida de uma simples esteatose para condição denominada estato-hepatite não alcoólica (EHNA), e em casos mais graves a fibrose e cirrose. EHNA com fibrose e cirrose é fator de risco importante para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. O marcador central dessa doença é o acúmulo de TG a partir da esterificação de glicerol e AGL. Esse acúmulo de TG acontece quando há descompasso entre o ritmo de entrada e/ou síntese de TG é maior do que de exportação ou catabolismo (KITADE et al., 2017). No entanto e a despeito das imagens coradas com HE indicando presença de esteatose hepática nos grupos a partir de 20 dias de DHL, a medida do conteúdo total de TG nos fígados não foi diferente entre os grupos, alimentados com a DHL ou padrão.

Há aqui pelo menos 2 considerações a serem feitas e ambas estão relacionadas à técnica empregada para as análises: a partir de fragmentos coletados e armazenados e não de um homogenato total do fígado de cada animal. A primeira envolve aspecto da circulação sanguínea hepática. O fígado dos camundongos é constituído por 4 lobos irrigados por dois sistemas à

semelhança do que ocorre nos humanos, via sistema portal e via artéria hepática, um ramo da artéria celíaca que por sua vez é ramo da aorta abdominal. A via sanguínea que leva os lipídios absorvidos pelo trato digestório é via arterial a partir do sistema linfático. Assim, o aporte dos lipídios assimilados da DHL ao fígado deve, necessariamente, ter vindo através da artéria hepática. A dúvida envolve a real homogeneidade do fluxo sanguíneo pelos distintos lobos hepáticos e regiões intra-hepáticas.

A segunda questão é sabermos qual o percentual de hepatócitos comprometidos com estatose pode impactar na medida de TG total como realizada nesse estudo. Por outro lado, a estratégia para visualização das gotas de gordura ideal teria sido usar o corante específico para gorduras, *oil red O*, ORO. Infelizmente, essa análise não foi realizada pois há necessidade de armazenamento das amostras de forma diferente da que feita nesse estudo. Ambas as questões levantadas podem ter tido algum impacto para a divergência entre a presença da esteatose e a medida de TG total.

Há várias evidências em modelos animais obesos e células isoladas indicando o efeito do TNF-alfa interferindo na via intracelular da insulina. No fígado, essa resistência à ação da insulina resulta em aumento da síntese de TG. Nesse contexto, há alguns mecanismos que estão presentes: (1) reduzida capacidade da insulina em inibir a lipólise no TA, com isso liberando mais AGL na circulação; (2) a hiperinsulinemia associada a RI e a hiperglicemia promovem a síntese de novo de lipídeos pelo fígado através da regulação dos fatores SREBP-1c e ChREBP; e (3) a hiperinsulinemia diretamente inibe a β -oxidação dos AG. Em conjunto, esses fenômenos promovem o acúmulo hepático de lipídeos, consequentemente do TG e aparecimento da esteatose (revisado por (PETERSEN; SHULMAN, 2018).

Ademais, a transição de esteatose para esteato-hepatite parece envolver pelo menos 2 fatores centrais. O primeiro fator envolve a presença do distúrbio metabólico e a resistência à insulina, que leva a esteatose. Tal situação é seguida de uma série de outros fatores como estresse oxidativo, lesão hepatocítica induzida por citocinas inflamatórias, distribuição de lipídios alterada

e hepatotocidade mediada pelos AGL, carga de colesterol intra-hepática anormal, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia. Adicionalmente, predisposição genética pode estar envolvida. De todos esses fatores, 2 são considerados centrais: estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2017).

Nossos dados mostraram que o distúrbio metabólico, mensurado pelo GTT e sua evolução com a resistência à insulina, foi detectada antes da esteatose instalada, considerando como marcador de esteatose o percentual de hepatócitos vacuolizadas maior que 5%. No entanto, mesmo com a progressão do percentual de hepatócitos comprometidos chegando a presença de balonização, infiltrado inflamatório nos espaços perivasculares, maior deposição de fibras colágenas, presença do marcador de macrófagos nos fígados dos animais alimentados com a DHL por 80 dias e aumento da enzima ALT, não foram detectados aumento de citocinas inflamatórias, nem alteração da atividade das enzimas antioxidantes nos fígados desses animais.

O observado aumento da expressão da enzima CBS nos fígados dos animais alimentados por 10 e 20 dias com a DHL não teve impacto sobre a produção do H_2S . Por outro lado, a reduzida produção do gás no fígado dos animais alimentados mais tempo com essa dieta hiperlipídica, 80 dias, teve simultânea redução dessa mesma enzima. Dados *in vitro* com células HepG2, linhagem de hepatócitos a partir de tumor, demonstraram que a menor expressão da CSE tem impacto negativo sobre o acúmulo e produção de glicose (revisado por MANI et al., 2014). Ademais, nessa mesma linhagem celular foi demonstrado efeito inibidor da insulina sobre a expressão da CSE (ZHANG et al., 2013). Assim, é provável que no animal intacto, a DHL ou o nutriente em maior quantidade - os lipídeos - tenham algum impacto sobre a regulação da expressão da CBS no fígado e, em menor impacto sobre a CSE.

Um outro fator importante que impacta na expressão de proteínas celulares envolve os processos de degradação proteica. O fator determinante para a degradação da CBS mitocondrial é o estado de oxigenação do grupo heme contido nessa enzima. Sob condições de normóxia, o oxigênio se liga ao

heme induzindo uma mudança conformacional tornando-o disponível para o reconhecimento pela Lon protease, levando à degradação da proteína CBS. Por outro lado, a isquemia ou hipóxia leva ao acúmulo de CBS nas mitocôndrias dos hepatócitos, uma vez que os grupos heme correspondentes estão desoxigenados e não são reconhecidos pela protease. A normalização da pressão parcial de oxigênio após uma reperfusão acelera a degradação das proteínas CBS (TENG et al., 2013). Embora não tenha sido investigado esse efeito no nosso estudo, é razoável considerarmos que esse mecanismo esteja potencialmente envolvido na variação da expressão proteica da CBS detectada. Podendo, representar ser um fenômeno adaptativo durante o processo de instalação da DGHNA e na sua progressão.

A reduzida produção do H_2S detectada no nosso estudo precedeu o aparecimento da esteatose. Esse dado foi semelhante ao observado por outro estudo utilizando camundongos que não expressavam a CSE, CSEKO, e alimentados com uma dieta hiperlipídica por 12 semanas (WEI GUO et al., 2018). Os autores descreveram acúmulo lipídico no fígado e resistência à insulina, acompanhados de inibição da atividade de Akt e represamento do fator transcricional FoxO1 no núcleo, com subsequente aumento da expressão de 2 enzimas envolvidas na gliconeogênese, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase). Outro elemento intracelular relacionado ao fenômeno observado nesses animais foi a inibição da proteína quinase AMPK, envolvida na estimulação da oxidação de ácidos graxos e na captação de glicose. Por fim, os autores demonstraram reversão de vários desses efeitos após a suplementação com um doador de H_2S . Por outro lado, e de modo distinto do que observamos, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 5 semanas apresentaram aumento da produção de H_2S bem como aumento da expressão gênica de CSE e CBS (HWANG et al., 2013).

Um mecanismo que parece estar associado com a redução da produção de H_2S e o aumento do conteúdo lipídico no fígado envolve a redução da formação de bile através da via LXR α e CYP7A1. Essa via está relacionada ao aumento da absorção de colesterol da dieta através da inibição de NPC1L1 e

regulação da CYP7A1. O resultado envolve inibição da metabolização do colesterol a ácido biliar, induzindo seu acúmulo no fígado. LI MENG e colaboradores, 2018, demonstraram que ácidos graxos livres inibem a produção de H₂S e expressão de CSE e aumentam expressão da enzima MST. Os dados se complementam e corroboram com nossos.

Outro aspecto importante do H₂S é atuar no processo inflamatório e anti-inflamatório. Estudos demonstraram que H₂S regula a modificação pós-tradução de NF-κB (fator de transcrição nuclear kappa B), a ativação ou não ativação da via depende do nível de H₂S. A via canônica NF-κB é considerada a principal via responsável pelo controle de eventos inflamatórios através da translocação de heterodímero p50/p65 para o núcleo. Uma vez translocado para o núcleo, há a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e outras quimiocinas como IL-6, TNF-α, IL-1β, MIP-1α (proteína inflamatória macrófago 1), MCP-1 (monócito quimioatrativo) e COX-2 (ciclooxigenase 2) (revisado por RODRIGUES; PERCIVAL, 2019). Fiorucci e colaboradores, 2007, demonstraram em animais acometidos por colite que a suplementação com H₂S, através do uso de doadores do gás, induziu redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias por inibição da via NF-κB.

Há evidências demonstrando que o H₂S exógeno reduz a expressão renal de TNF-α, IL-6 e IL-10 através da inibição da via NF-κB e aumenta a atividade de GPx e SOD em ratos com insuficiência renal crônica (WU et al., 2017). Por outro lado, Moore e colaboradores, 2007, sugeriram que concentrações farmacológicas de H₂S exógeno podem ativar a via de NF-κB e consequentemente induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias em células.

Por fim, há dois outros aspectos interessantes que podem estar relacionados a redução da produção do H₂S detectada e que merecem futura investigação. Ambos envolvem a biodisponibilidade do substrato nos hepatócitos. Um correlaciona obesidade e concentração plasmática de cisteína (EL-KHAIRY et al., 2003) e o outro a redução da atividade das enzimas que participam da síntese do gás e não suas expressões quer proteica quer gênica (TAMANNA et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo confirmaram nossa hipótese, ou seja, há redução da produção hepática de H_2S prévia a instalação da DGHNA induzida pela DHL. Além disso, confirmaram que a DHL induz aumento da massa corporal, aumento da glicemia basal e intolerância à glicose (IG) precoce, seguida da instalação da intolerância ou resistência à insulina e constitui um modelo de transição inicial de esteatose para esteato-hepatite com presença do marcador de ativação dos macrófagos, F4-80, e início do aumento da deposição de fibras colágenas nos espaços portais.

O esquema a seguir ilustra essas modificações detectadas ao longo do período de consumo da DHL por até 80 dias.

Figura 21: Esquema representativo dos resultados obtidos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 10, 20, 40, 60 e 80 dias consecutivos

7 REFERÊNCIAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1066–71, 1996.

AGOUNI, A. et al. In vivo differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, n. 1, p. 104–111, 2010.

AGUIRRE, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1531–1537, 2002.

AMBROSI, T. H. et al. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 771- 784.e6, 2017.

ARAUJO, L. C. C. et al. Uncaria tomentosa improves insulin sensitivity and inflammation in experimental NAFLD. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11013, 2018.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E581–E591, 2008.

BRUN, T.; MAECHLER, P. Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 10, p. 2540–2549, 2016.

CALVERT, J. W. et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through nrf2 signaling. **Circulation Research**, v. 105, n. 4, p. 365–374, 2009.

CARUSO, C.; BALISTRERI, C. R.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, 2010.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** [s.l: s.n.].

CATTA-PRETA, M. et al. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Archiv**, v. 459, n. 5, p. 477–485, 2011.

DONGÓ, E. et al. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, 2018.

DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation** <http://www.jci.org>, v. 115, n. 5, p. 1343–1351, 2005.

DORMAN, D. C. et al. Cytochrome Oxidase Inhibition Induced by Acute Hydrogen Sulfide Inhalation: Correlation with Tissue Sulfide Concentrations in the Rat. **Toxicology sciences**, v. 25, p. 18–25, 2002.

EL-KHAIRY, L. et al. Predictors of change in plasma total cysteine: Longitudinal findings from the Hordaland Homocysteine Study. **Clinical Chemistry**, v. 49:1, p. 7, 2003.

ENOKIDO, Y. et al. Abnormal Lipid Metabolism in Cystathionine β -Synthase-deficient Mice, an Animal Model for Hyperhomocysteinemia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 52961–52969, 2004.

FAM, B. C. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 6, p. E1323–E1332, 2008.

FILIPOVIC, M. R. Persulfidation (S-sulfhydration) and H₂S. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 230, p. 29–59, 2015.

FIORUCCI, S. et al. The Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract and Liver. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 259–271, 2006.

FIORUCCI, S. et al. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 996–1002, 2007.

FLANNIGAN, K. L. et al. Enhanced Synthesis and Diminished Degradation of Hydrogen Sulfide in Experimental Colitis: A Site-Specific, Pro-Resolution Mechanism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 9, 2013.

FURNE, J. et al. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: A specialized function of the colonic mucosa. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 255–259, 2001.

GO, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 13, n. 4, p. 2009, 2009.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.

HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos RESUMO. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2001.

HARCOURT, B. E.; PENFOLD, S. A.; FORBES, J. M. Coming full circle in diabetes mellitus: From complications to initiation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 113–123, 2013.

HINE, C.; MITCHELL, J. R. Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. **EXG**, 2014.

HWANG, S.-Y. et al. High-fat diet stimulates hepatic cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase expression. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2013.

JIN, R.; VOS, M. B. **Fructose and liver function -is this behind nonalcoholic liver disease?** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2015.

JOUVET, N.; ESTALL, J. L. **The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis** *Experimental Cell Research*, 2017.

KANEKO, Y. et al. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell: Possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*, v. 55, n. 5, p. 1391–1397, 2006.

KHAN, A. A. et al. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 103, n. 3, p. 482–490, 1990.

KHAZEN, W. et al. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters*, v. 579, n. 25, p. 5631–5634, 2005.

KIMURA, H. Metabolic Turnover of Hydrogen Sulfide. *Frontiers in Physiology*, v. 3, p. 3, 2012.

KITADE, H. et al. **Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments** *Nutrients*, 2017.

KOWLURU, A.; KOWLURU, R. A. **RACking up ceramide-induced islet β -cell dysfunction** *Biochemical Pharmacology*, 2018.

LEFRANC, C. et al. Mitochondrial oxidative stress in obesity: Role of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Endocrinology*, v. 238, n. 3, p. R143–R159, 2018.

LINGALA, S. M.; GHANY, M. G. M. MHS. Obesity is a concern for bone health with aging Sue. *HHS Public Access*, v. 25, n. 3, p. 289–313, 2016.

MANI, S. et al. Hydrogen sulfide and the liver. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 41, p. 62–71, 2014.

MARLATT, K. L.; RAVUSSIN, E. **Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings**Current obesity reports, 2017.

MOUSTAFA, A.; HABARA, Y. Reciprocal interaction among gasotransmitters in isolated pancreatic β -cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.

MUSTAFA, A. K. et al. H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. **SCIENCE SIGNALINGSIGNALING**, v. 2, n. 96, p. 1–9, 2009.

NAGLE, C. A.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. **Journal of Lipid Research**, 2008.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Non-alcoholic fatty liver disease. **Govaresh**, v. 23, n. 4, p. 203–212, 2019.

PARK, S. Y. et al. Effect of high fat diet on insulin resistance: Dietary fat versus visceral fat mass. **Journal of Korean Medical Science**, 2001.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**, v. 98, p. 2133–2223, 2018.

QUON, M. J. et al. Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor κ B Kinase Complex. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

RAHAL, A. et al. **Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay**BioMed Research International, 2014.

ROBERT, K. et al. Cystathionine β synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. **Gastroenterology**, 2005.

RODRIGUES, C.; PERCIVAL, S. S. **Immunomodulatory Effects of Glutathione, Garlic Derivatives, and Hydrogen Sulfide**Nutrients, 2019.

RODRIGUES, L. et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. **Pharmacological Research**,

v. 115, p. 255–266, 2016.

SAH, S. P. et al. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1165–1177, 2016.

SOFTIC, S; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic de novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Springer Link**, v. 61, n. 5, p. 1282–1293, 2017.

SANCHES, S. C. L. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

SEARCY, D. G. et al. Sulfur Reduction by Human Erythrocytes. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY**, v. 282, p. 310–322, 1998.

SICA, A.; INVERNIZZI, P.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 2034–2042, 2014.

STEFAN, N.; HÄRING, H.-U.; CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8587, n. 18, p. 1–12, 2018.

STIPANUK, M. H.; BECK, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. **Biochemical Journal**, v. 206, n. 2, p. 267–277, 1982.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. november, p. 917–935, 2007.

TAMANNA, N.; MAYENGBAM, S.; HOUSE, J.D.; TREBERG, J.R. Methionine restriction leads to hyperhomocysteinemia and alters hepatic H₂S production capacity in Fischer-344 rats. **Mech Ageing Dev.**, v. 176, p. 9-18, 2018.

TENG, H.; WU, B.; ZHAO, K.; YANG, G.; WU, L.; WANG, R. Oxygen-

sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine γ -synthase mediated by Lon protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31, p. 12679–12684, 2013.

TUCKER, P.; FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. Can Exercise Minimize Postprandial Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes? **Current Diabetes Reviews**, v. 4, n. 4, p. 309–319, 2008.

TURNER, N. et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1638–1648, 2013.

WAN, J. et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 130–142, 2014.

WANG, J.; YANG, X.; ZHANG, J. **Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR signaling in pancreatic β cells** *Cellular Signalling*, 2016.

WANG, R. Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 791–896, 2012.

WANG, S.; REN, J. Obesity Paradox in Aging: From Prevalence to Pathophysiology. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 61, n. 2, p. 182–189, 2018.

WATANABE, M. et al. **Mice deficient in cystathionine (8-synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia** *Medical Sciences*. [s.l: s.n.].

WEI GUO, DONG LI, YAN YOU, WANZHEN LI, BIN HU, SULIN ZHANG, LEI MIAO, MING XIAN, Y. Z. AND X. S. Cystathionine γ -lyase deficiency aggravates obesity-related insulin resistance via FoxO1-dependent hepatic gluconeogenesis. **The FASEB Journal**, p. 13, 2018.

WESTERTERP, K. R. Nutrition & Metabolism | Full text | Diet induced thermogenesis Nutrition & Metabolism. **Nutrition & metabolism**, v. 1, n. 1, p. 5, 2004.

WU, D. et al. Hydrogen sulfide ameliorates chronic renal failure in rats by inhibiting apoptosis and inflammation through ROS/MAPK and NF- κ B signaling pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

YANG, G. et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 587–590, 2008.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. **Adipose tissue macrophages** **Immunology Letters**, 2007.

ZHANG, L. et al. Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 114–126, 2013.

ZHAO, R. et al. Exenatide improves glucocorticoid-induced glucose intolerance in mice. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 4, p. 61–65, 2011.