



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia



Ester dos Santos Alves

**Impacto da superexpressão do receptor de estrogênio alfa sobre a resistência hepática à insulina e o metabolismo energético do fígado**

Ribeirão Preto – SP  
2023

Ester dos Santos Alves

Impacto da superexpressão do receptor de estrogênio alfa sobre a resistência hepática à insulina e o metabolismo energético do fígado

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez

Ribeirão Preto – SP  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Alves, Ester dos Santos

Impacto da superexpressão do receptor de estrogênio alfa sobre a resistência hepática à insulina e o metabolismo energético do fígado. Ribeirão Preto, 2023.

76 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Camporez, João Paulo Gabriel.

1. Resistência à insulina. 2. Receptor de estrogênio alfa. 3.

Metabolismo energético hepático.

NOME: ALVES, E.S.

Título: Impacto da superexpressão do receptor de estrogênio alfa sobre a resistência hepática à insulina e o metabolismo energético do fígado.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 23/06/2023

Banca examinadora

Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Instituição: ICB - USP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Aprovada

*Para minha mãe, Nária Núbia;*

*Minha luz. Inspiração para lutar com todas as forças por aquilo que acredito.*

*Para meus irmãos, Rebeca e João Victor;*

*Minha demonstração de cuidado de Deus.*

*Para meu amado, João Marcos;*

*Meu maior apoiador. A prova da bondade de Deus comigo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus. Por tudo. Por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida. Fonte da minha inspiração e sabedoria. Até aqui o Senhor esteve comigo, me sustentou e nunca me abandonou. Obrigada por Teu amor e cuidado. Sem Deus eu nada seria.

À minha mãe, Nária Núbia Pereira dos Santos, por me dar a vida. A pessoa mais guerreira que eu conheço. Se hoje eu estou aqui é porque a minha mãe tanto batalhou por mim. Nunca mediu esforços para me proporcionar a melhor educação. Sempre me ensinou o caminho correto, e hoje eu sou muito grata. A melhor amiga que Deus me deu, obrigada por todo o apoio incondicional e pelos valores que sempre me transmitiu, entre os quais, a certeza de que tudo iria dar certo, e que se estivéssemos unidos como família, tínhamos tudo que precisávamos. Tudo o que sou é por você, mãe!

Aos meus irmãos, João Victor Pereira dos Santos e Rebeca dos Santos Alves. Deus não poderia ter me dado irmãos melhores. Eu amo dividir a vida com vocês. Sou muito grata por vocês serem tão presentes na minha vida. E sei que vocês sempre torceram e torcem por mim, por nós, pelo nosso crescimento. Se hoje eu estou aqui, é por vocês e pra vocês. Também à minha irmã emprestada, Letícia Scopel Largura. Um presente que Deus me concedeu, que está ao meu lado desde o dia que me conheceu, de fato, se tornou uma irmã. Você também faz parte desse momento.

Ao meu pai, João Geraldo Peroni Leopoldino. Obrigada por ser tão incrível e amar tanto a nossa família. Embora o que nos une não seja o sangue, você é uma das pessoas mais importantes da minha vida. Agradeço eternamente pelo amor que recebo e venho recebendo de você ao longo desses anos. Espero continuar lhe dando o orgulho que sei que você tem de mim.

Ao meu amor, João Marcos Gomes Chagas, minha demonstração da bondade de Deus. Não há palavras para descrever o quanto sou grata pela sua vida. Eu agradeço muito por todo o apoio que você me dá. A segurança que você proporciona. Agradeço muito pelo incentivo, principalmente pela compreensão, de entender que nem sempre eu poderia lhe dar a atenção que era necessária. Mas mesmo assim, permaneceu ao meu lado e aqui estamos com um relacionamento bem mais forte do que quando se iniciou. Muito obrigada por seu amor, você torna os meus dias mais leves.

Ao meu orientador, João Paulo Gabriel Camporez. Agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho, durante esse período me orientou da melhor forma possível, entendendo minhas limitações. Muito obrigado por todos os seus ensinamentos. A confiança depositada em mim e no meu trabalho foi fundamental e motivador. Por ter me conhecido e me aceitado durante esses anos. Me sinto honrada em ter sido orientada por um orientador tão leve, que extraiu de mim o melhor que eu poderia entregar.

Aos membros e pesquisadores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Energético, Alessandra Gonçalves da Cruz, Bruna Maria Fantini Trinca, Carolina Coelho Barretto Dias, Felipe Garcia da Silva Sucupira, Guilherme Fancio Bovolin, José Francisco Turino Silva, Julia Moreti, Layanne Cabral da Cunha Araujo, Marina Guerreiro Badoco e Marina Holanda. Agradeço por todos os aprendizados. Em especial ao meu amigo, Carlos Henrique Zanello Talarico, agradeço por ter aprendido tanto com você. Por todo o apoio científico e pessoal.

À minha colega de profissão e amiga, Jessica Denielle Matos dos Santos. Meu presente do mestrado. Muito obrigada por tanto apoio. Dividimos as nossas tristezas, as nossas alegrias, a nossa cultura, o nosso trabalho e até a nossa casa. Agradeço por estar comigo em todos os momentos, sejam eles no trabalho, e até mesmo quando chegávamos em casa e passávamos um fim de semana inteiro nos dando ao luxo de assistir várias séries e filmes. Obrigada por dividir comigo o Bequer, nosso gatinho, que foi muito importante para nós nesse momento. Sempre teremos algo que nos conecta.

Ao Laboratório de Controle do Metabolismo, do prof. Luiz Carlos Carvalho Navegantes e da profa. Ísis do Carmo Kettelhut, por todo apoio prestado. Em especial aos meus amigos, Henrique Jorge Novaes Morgan e Aline Zanatta Schavinski, por terem me dado muito suporte durante o mestrado, obrigada por toda a ajuda, ensinamentos e por tornar esse período da minha vida mais leve.

Aos membros e pesquisadores do laboratório do prof. José Antunes Rodrigues e da profa. Lucila Leico Kagohara Elias. Muito obrigada por todo suporte técnico e científico prestado para a realização deste trabalho.

Aos membros e pesquisadores do laboratório do prof. Luiz Osório Silveira Leiria, pelo suporte técnico e científico prestado para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da vida, que nunca pararam de se importar comigo e torcer por mim mesmo estando longe. Em especial à Heloísa Ulivi, Gisele Pereira, Marcilene Oliveira, Ingritir Lima e Gabriela Cristina.

A todo o corpo docente, técnico e administrativo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP por sempre estarem a disposição quando foi necessário. Em especial à profa. Lucila Leico, obrigada pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho como minha supervisora de relatório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; nº 134058/2021-6) pela concessão da bolsa de mestrado e, juntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Este trabalho é resultado do esforço de cada um de vocês que de alguma forma contribuíram para a realização deste. Obrigada por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem. Meu mais sincero obrigada.



*"Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."*

*Marie Curie*

## RESUMO

ALVES, Ester dos Santos. **Impacto da superexpressão do receptor de estrogênio alfa sobre a resistência hepática à insulina e o metabolismo energético do fígado**. 2023. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2023.

A resistência à insulina é definida como uma resposta biológica prejudicada da ação da insulina em tecidos-alvos. Associada à obesidade, são o fator central da síndrome metabólica, que engloba outras complicações como diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Essas anormalidades aumentam o risco de desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Estudos experimentais e clínicos revelam que o estradiol contribui de forma positiva para o metabolismo energético e os mecanismos dessas ações benéficas são mediadas pelo receptor de estrogênio alfa ( $ER\alpha$ ). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da superexpressão do  $ER\alpha$  no fígado induzido por vírus adeno associado (AAV) sobre o peso corporal, conteúdo hepático de triglicerídeos e tolerância à glicose em camundongos alimentados com dieta padrão (Chow) e dieta hiperlipídica (HFD). Camundongos machos C57BL/6J foram divididos em controle alimentados com Chow (Chow-Controle); controle alimentados com HFD (HFD-Controle); AAV alimentados com Chow (Chow-AAV); e AAV alimentados com HFD (HFD-AAV), durante 6 semanas. O vírus foi administrado por via intravenosa. Foi analisado a expressão gênica por meio de RT-qPCR e análise proteica por meio de Western Blotting, composição corporal por ressonância magnética, teste de tolerância à glicose, o conteúdo hepático de triglicerídeos e dosagem das enzimas hepáticas por análise bioquímica e o *clamp* hiperinsulinêmico-normoglicêmico. Demonstramos que a superexpressão do  $ER\alpha$  em animais alimentados com dieta padrão reduz a gordura total, retroperitoneal e perigonadal e esses animais apresentam aumento no consumo de oxigênio em cultura de hepatócitos primários, aumento expressão gênica de FGF21 e redução da expressão gênica de ACC. Demonstramos em animais alimentados com dieta hiperlipídica que houve uma diminuição no conteúdo de triglicerídeos hepático, demonstrado por histologia hepática. Bem como, evidenciamos que a superexpressão do  $ER\alpha$  em fígados de camundongos machos alimentados com HFD, é eficaz para melhorar a sensibilidade hepática à insulina. Nesta perspectiva, nossos resultados fornecem fortes evidências de que a sinalização hepática do  $ER\alpha$  é responsável por alguns dos efeitos protetores metabólicos do estrogênio em camundongos. A superexpressão do receptor de estrogênio melhora a função mitocondrial, levando a um balanço energético negativo nos hepatócitos, que conseqüentemente reduz o acúmulo de lipídios, protegendo os animais da esteatose hepática e da resistência hepática à insulina.

**Palavras-chave:** 1. Resistência à insulina. 2. Receptor de estrogênio alfa. 3. Metabolismo energético hepático.

## ABSTRACT

ALVES, Ester dos Santos. **Impact of estrogen receptor alpha overexpression on hepatic insulin resistance and liver energy metabolism.** 2023. 75 p. Dissertation (Master in Physiology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, State of São Paulo, 2023.

Insulin resistance is defined as an impaired biological response to insulin action in target tissues. Associated with obesity, they are the central factor in the metabolic syndrome, which encompasses other complications such as type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. These abnormalities increase the risk of developing nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Experimental and clinical studies reveal that estradiol contributes positively to energy metabolism and the beneficial actions are mediated by estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of ER $\alpha$  overexpression in adeno-associated virus (AAV)-induced liver on body weight, liver triglyceride content, and glucose tolerance in regular chow (Chow) and high fat diet (HFD) fed mice. Male C57BL/6J mice were divided into control fed Chow (Chow-Control); control fed HFD (HFD-Control); AAV fed Chow (Chow-AAV); and AAV fed HFD (HFD-AAV), for 6 weeks. The virus was administered intravenously. Gene and protein expression was analyzed by RT-qPCR and Western Blotting, respectively, body composition by Magnetic Resonance Imaging (MRI), glucose tolerance test, liver triglyceride content and liver enzyme dosage by biochemical analysis, and the hyperinsulinemic-euglycemic clamp were analyzed. We demonstrate that ER $\alpha$  overexpression in animals fed regular chow reduces total, retroperitoneal and perigonadal fat and these animals exhibit increased oxygen consumption in primary hepatocyte culture, increased gene expression of FGF21 and reduced gene expression of ACC. We demonstrated that animals fed HFD show decreased hepatic triglyceride content, as observed in liver histology. In this perspective, our results provide strong evidences that hepatic ER $\alpha$  signaling is responsible for some of the metabolic protective estrogen effects in mice. Overexpression of the estrogen receptor improves mitochondrial function, leading to a negative energy balance in hepatocytes, which consequently reduces lipid accumulation, and protect the animals from both hepatic steatosis and insulin resistance.

**Keywords:** 1. Insulin Resistance. 2. Estrogen Receptor Alpha. 3. Hepatic Energy Metabolism.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA 1: MECANISMO PROPOSTO DE RESISTÊNCIA À INSULINA HEPÁTICA INDUZIDA POR LIPÍDIOS.</b> .....	25
<b>FIGURA 2: MECANISMOS CELULARES POTENCIAIS PARA ATIVAR A SINALIZAÇÃO INFLAMATÓRIA</b> .....	27
<b>FIGURA 3: A CASCATA DE SINALIZAÇÃO UPR.</b> .....	28
<b>FIGURA 4: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS</b> .....	40
<b>FIGURA 5: PRINCÍPIO DE AÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA.</b> .....	42
<b>FIGURA 6: ANÁLISE DA SUPEREXPRESSION DO ERA.</b> .....	49
<b>FIGURA 7: COMPOSIÇÃO CORPORAL DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA.</b> .....	51
<b>FIGURA 8: ANÁLISE DO PERFIL GLICÊMICO DOS ANIMAIS</b> .....	52
<b>FIGURA 9: A SUPEREXPRESSION DE ERA REGULA A SENSIBILIDADE À INSULINA.</b> .....	53
<b>FIGURA 10: DOSAGEM QUANTITATIVA DE TAG NO FÍGADO E PLASMA.</b> .....	54
<b>FIGURA 11: ANÁLISE DE ENZIMAS HEPÁTICAS EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA</b> .....	56
<b>FIGURA 12: ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA</b> .....	56
<b>FIGURA 13: AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.</b> .....	57
<b>FIGURA 14: ANÁLISE DOS MARCADORES DE ESTRESSE DO RE EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA</b> .....	59

<b>FIGURA 15:</b> ANÁLISE DOS MARCADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA.....	60
<b>FIGURA 16:</b> ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA.....	62
<b>FIGURA 17:</b> ANÁLISE DOS MARCADORES DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA.....	63

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
AG	Ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
ATP	Adenosina trifosfato
AKT2	AKT serina/treonina quinase 2
ALT	Alanina aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
AST	Aspartato aminotransferase
ATF6	Ativador do fator de transcrição 6
BiP	<i>Binding Protein</i>
VDAC	Canais aniônicos dependentes de voltagem
SHAM	Cirurgia placebo
PGC-1 $\alpha$	Coativador-1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DAG	Diacilglicerol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
IRE1	Enzima requeredora de inositol 1
LKO	ER $\alpha$ -knockout no fígado
ROS	Espécies reativas de oxigênio
E2	Estradiol
FGF21	Fator de Crescimento de Fibroblastos 21
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
GDF12	Fator de Diferenciação do Crescimento 15
PERK	Fator de iniciação eucariótica semelhante a PKR2 quinase

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa $\beta$
eIF2 $\alpha$	Fosforilação do fator de iniciação eucariótica-2 alfa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g	Grama
SH	Grupos sulfidrila
TBG	Hormônio tireoidiano humano hepático
IMC	Índice de massa corporal
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
IKK $\beta$	Inibidor do fator nuclear kappa-beta quinase
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodalton
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
MME	Membrana mitocondrial externa
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ng	Nanograma
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
nPKC	Nova proteína quinase C
ORO	Oil Red O
OVX	Ovariectomia
O <sub>2</sub>	Oxigênio
ILPS	Peptídeos semelhantes à insulina
EGP	Produção endógena de glicose
chREBP	Proteína de ligação de elemento responsiva a carboidrato
SREBP1-c	Proteína de ligação reguladora de esterol-1c
GADD34	Proteína fosfatase 1 subunidade reguladora 15A
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
cPKC	Proteína quina C convencional

AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
GTT	Teste de tolerância à glicose
PKC	Proteína quinase C
αPKC	Proteína quinase C atípica
PKC $\epsilon$	Proteína quinase C epsilon
PKC $\theta$	Proteína quinase C theta
PKR2	Proteína quinase dependente de RNA
GPR78	Proteína regulada pela glicose-78
EGFP	Proteína Verde Fluorescente Aprimorada
FATPs	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
n	Quantidade de amostras/animais
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Ers1	Receptor de estrogênio 1
ER $\alpha$	Receptor de estrogênio alfa
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Receptor de insulina 1
PPAR- $\gamma$	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
TLRs	Receptor Toll-Like
RE	Retículo endoplasmático
RT-qPCR	<i>Reverse transcription-qPCR</i>
OXPPOS	Sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial
SAA	Soro amilóide A
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase
TAB	Tecido adiposo branco
RT	Transcriptase reversa
FAT/CD36	Translocase de ácidos graxos
TAG	Triglicerídeo / Triacilglicerol
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
AAV	Vírus adeno-associado



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>20</b>
1.1 Resistência à Insulina e Acúmulo de Lipídios Ectópicos .....	23
1.2 Resistência à Insulina e Inflamação .....	25
1.3 Resistência à Insulina e Estresse do Retículo Endoplasmático.....	27
1.4 Resistência à Insulina e Função Mitocondrial .....	29
1.5 Resistência à Insulina e Estradiol .....	30
1.6 Receptor de Estrogênio Alfa (ER $\alpha$ ) .....	31
<b>2. Hipótese.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Objetivo Geral .....</b>	<b>36</b>
3.3 Objetivos Específicos .....	36
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>38</b>
4.1 Animais .....	38
4.2 Vetor Para Aumento da Expressão do ER $\alpha$ .....	38
4.3 Delineamento Experimental .....	39
4.4 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) .....	40
4.5 Ressonância Magnética .....	40
4.6 Eutanásia e Coleta de Tecidos.....	40
4.7 Conteúdo Tecidual de Lipídios .....	41
4.8 Dosagem de Enzimas Hepáticas no Plasma.....	42
4.9 Avaliação da Expressão Gênica – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.10 Medição do Consumo de Oxigênio em Hepatócitos Primários.....	43
4.11 Peroxidação Lipídica e Níveis Antioxidantes .....	44
4.12 Avaliação da Expressão de Proteínas – Western Blotting .....	44
4.13 Análise Histológica – Coloração Oil Red .....	45
4.14 Avaliação in vivo da Sensibilidade à Insulina.....	45
4.15 Forma de Análise dos Resultados.....	46
<b>5. Resultados .....</b>	<b>48</b>
5.1 Superexpressão do Receptor de Estrogênio Alfa (ER $\alpha$ ) .....	48
5.2 Composição Corporal .....	50
5.3 Perfil Glicêmico dos Animais .....	51
5.4 Avaliação da Sensibilidade in vivo à Insulina.....	52
5.5 Perfil Lipídico dos Animais .....	54
5.6 Determinação de AST e ALT séricos .....	55

5.7 Marcadores Inflamatórios .....	56
5.8 Peroxidação Lipídica e Níveis Antioxidantes .....	57
5.9 Marcadores de Estresse do RE .....	58
5.10 Marcadores do Metabolismo Lipídico .....	60
5.11 Marcadores da Dinâmica Mitocondrial .....	61
5.12 Marcadores do metabolismo energético .....	62
<b>6. Discussão .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>70</b>
<b>Referências .....</b>	<b>71</b>

# Introdução

## 1. Introdução

Em 30 de julho de 1921, na Universidade de Toronto, no Canadá, a vida de quem sofria com Diabetes Mellitus (DM) ganhou uma nova perspectiva. Os pesquisadores Frederick Banting (1891-1941) e Charles Best (1899-1978) descobriram a insulina durante experimentos que tinham como objetivo o isolamento da secreção interna pancreática. Os pesquisadores injetaram um extrato pancreático em um cão diabético sem pâncreas e observaram que o açúcar presente em seu sangue caía acentuadamente (Lewis e Brubaker, 2021). Nesse contexto, surge um vasto e crescente universo de pesquisas sobre a ação e a resistência à insulina. Nos anos seguintes, as descobertas feitas por vários outros grupos de pesquisa amadureceram e construíram bases sólidas para a aplicação clínica, algumas outras descobertas, no entanto, ainda permanecem cientificamente incompletas e controversas.

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é um dos desafios médicos definidores do século XXI (Zimmet, et al. 2001). Nos Estados Unidos, a prevalência combinada de diabetes e pré-diabetes é superior a 50% (Menke, et al. 2015). A hiperglicemia de jejum que é o fator que define o DM2 é em grande parte secundária à ação inadequada do principal hormônio hipoglicemiante: a insulina. Compreender os mecanismos de ação da insulina é, portanto, essencial para o desenvolvimento contínuo de estratégias terapêuticas eficazes para combater o DM2.

A insulina é um hormônio peptídico que se liga aos receptores inseridos na membrana plasmática nas células-alvo para orquestrar uma resposta anabólica integrada à disponibilidade de nutrientes. Em todos os animais, a insulina ou peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) foram identificados (Chan e Steiner, 2000). Em invertebrados, os ILPs fornecem entrada de sinalização mitogênica, mas seus efeitos nos processos metabólicos e na seleção de combustível são menos significativos (Wu e Brown, 2006). Alavancando eventos de duplicação de genes ao longo do tempo evolutivo, os mamíferos desenvolveram funções especializadas para os hormônios peptídicos relacionados a insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1 e IGF-2 (Chan e Steiner, 2000). IGF-1 e IGF-2 promovem crescimento e diferenciação celular em mamíferos; em contraste, a insulina controla principalmente os fluxos metabólicos (Dupont, et al. 2001). No entanto, a indefinição dessas distinções funcionais é destacada pela alta homologia entre os receptores de insulina e IGF-1, que formam heterodímeros híbridos

em muitos tipos de células e compartilham muitos efetores a jusante (Bedinger e Adams, 2015; Siddle, 2011). A sobreposição nas funções de sinalização entre insulina e IGF-1 provavelmente também contribui para a relação bem estabelecida entre hiperinsulinemia e alguns tipos de câncer (PERSEGHIN, et al. 2012).

A molécula “madura” de insulina consiste em duas cadeias peptídicas, a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos ligadas entre si por duas pontes dissulfeto. Sua ação na célula inicia-se pela ligação do hormônio ao receptor de membrana, uma proteína heterotetramérica constituída por duas subunidades alfa (extracelulares), onde há um sítio de ligação para a insulina, e duas subunidades beta (transmembranas) responsáveis pela transmissão do sinal com atividade tirosina cinase (Kasuga et al., 1982). Agindo como um doador de fosfatos, a adenosina trifosfato (ATP) promove a fosforilação do receptor em resíduos de tirosina. Sendo assim, a insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos proteicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e defosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (Haber et al., 2001).

Embora muitos tipos de células somáticas expressem receptores de insulina, o papel da insulina na homeostase da glicose é tipificado pelos efeitos diretos da insulina no músculo esquelético, fígado e adipócitos brancos. Esses tecidos desempenham papéis distintos na homeostase metabólica, necessitando de vias de transdução de sinal de insulina específicas do tecido. Por exemplo, no músculo esquelético, a insulina promove a utilização e armazenamento de glicose, aumentando o transporte de glicose e a síntese de glicogênio. No fígado, a insulina ativa a síntese de glicogênio, aumenta a expressão gênica de enzimas lipogênicas e diminui a expressão gênica de enzimas da via gliconeogênica. No tecido adiposo branco (TAB), a insulina suprime a lipólise e aumenta o transporte de glicose e a lipogênese. Apesar desses diversos efeitos, os componentes proximais envolvidos na transdução do sinal de insulina são notavelmente semelhantes em todas as células responsivas à insulina. A diversidade de respostas fisiológicas à insulina em diferentes tipos de células deve-se em grande parte a distintos efetores distais (Petersen e Shulman, 2018).

Concentração elevada de insulina circulante para atingir uma resposta integrada de redução da glicose é geralmente observada em um indivíduo resistente à insulina. Uma variedade de condições clínicas – pré-diabetes, lipodistrofia (Petersen, et al. 2002),

síndrome do ovário policístico (Dunaif, 1997), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Marchesini, et al. 1999) – são acompanhadas por concentrações plasmáticas aumentadas de insulina em jejum. Este aumento da carga de trabalho para o pâncreas endócrino, e consequente descompensação das células  $\beta$ , é um importante mecanismo para o desenvolvimento de DM2 (Kahn, 2003; Kasuga, 2006; Schwartz, et al. 2017). No entanto, a importância da resistência à insulina na patogênese do DM2 é destacada por estudos prospectivos em humanos que revelaram a resistência à insulina como o melhor preditor do futuro diagnóstico de DM2 (Lillioja, et al. 1993; Warram, et al. 1990). Como a ação da insulina desempenha diferentes funções em diferentes tipos de células, a resistência à insulina tem diversas ramificações funcionais nos vários tecidos-alvo da insulina.

Sabe-se que o aumento do consumo de uma dieta rica em gorduras juntamente com a falta de exercícios físicos contribui amplamente para o desenvolvimento de DM2, obesidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares (Grundy, 2008). Essas anormalidades em conjunto são denominadas de síndrome metabólica, sendo, geralmente, o fator central dessa síndrome a resistência à insulina associada com a obesidade. Diversos mecanismos são atualmente considerados como causadores da resistência à insulina, como metabolismo anormal de lipídios e acúmulo ectópico do mesmo (Samuel, et al., 2010), disfunção mitocondrial (Jelenik and Roden, 2012), além de inflamação e estresse de retículo endoplasmático (Hotamisligil, 2010).

No período de 2008 à 2011, o gasto médio com o tratamento da obesidade no Brasil foi de R\$25 milhões, sendo constatado um aumento de R\$16 milhões entre 2008 e 2011. Os gastos médios com diabetes mellitus nestes quatro anos foi de R\$78 milhões, com um aumento de R\$25 milhões entre o primeiro e o último ano. O tratamento do infarto agudo do miocárdio, por sua vez, custou, em média, R\$197 milhões, com incremento de R\$93 milhões. Entre os sexos, as mulheres custaram mais que os homens, exceto para o infarto agudo do miocárdio. As regiões Sul, Sudeste e Nordeste revelaram maiores gastos nos tratamentos das enfermidades (Mazzocante, et al. 2012). Especificamente no Brasil, o plano de ações estratégicas para o enfrentamento de doenças crônicas do Ministério da Saúde destaca que diabetes, doenças do coração e acidente vascular encefálico levaram ao gasto econômico brasileiro de US\$ 4,18 bilhões entre os anos de 2006 a 2015. Pensando neste contexto, um grande desafio da saúde pública é que além de estratégias clássicas que já são indicadas pelo Ministério da Saúde, como por

exemplo, a incrementação de exercícios físicos na rotina e a redução do consumo de uma dieta mais calórica, se faz necessário a identificação de novos alvos moleculares que sejam capazes de evitar, ou pelo menos reduzir, a resistência à insulina e suas consequências metabólicas. Nesse contexto, surgem ainda diversos mecanismos já atualmente conhecidos como causadores da resistência à insulina, como por exemplo, o acúmulo de lipídios ectópicos, a inflamação, o estresse do retículo endoplasmático e o mau funcionamento mitocondrial.

### *1.1 Resistência à Insulina e Acúmulo de Lipídios Ectópicos*

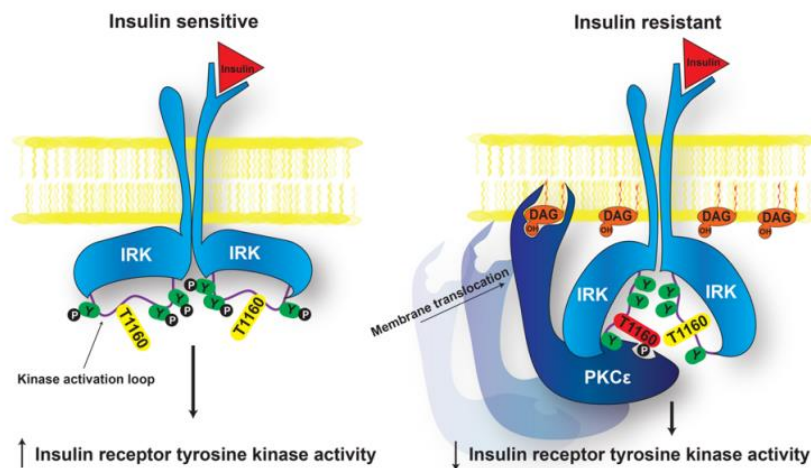
Uma das consequências do estilo de vida ocidental e dieta rica em gorduras é a DHGNA, que afeta cerca de 30% dos adultos e até 10% das crianças em países desenvolvidos (Cohen et al., 2011). DHGNA começa com o acúmulo de triacilglicerídeos (TAG) no fígado e é definida como a presença de gotículas de lipídeos no citoplasma de mais de 5% dos hepatócitos (Birkenfeld and Shulman, 2014). A esteatose (acúmulo anormal de gordura em um órgão ou tecido) resulta da interação entre dieta, microbiota intestinal (Jian et al., 2015; Kirpich et al., 2015), fatores genéticos (Romeo et al., 2008) e lipogênese *de novo* por meio da regulação positiva de fatores de transcrição lipogênicos como proteína de ligação reguladora de esterol-1c (SREBP1c), proteína de ligação de elemento responsiva a carboidrato (chREBP) e receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) (Anderson e Borlak, 2008). Primeiramente, o ácido graxo (AG) é armazenado no tecido adiposo como TAG. No entanto, em indivíduos obesos, os ácidos graxos parecem ser desviados de seu local de armazenamento primário para locais ectópicos, como tecido muscular esquelético e hepático, para reesterificação em TAG, talvez através do aumento da lipólise dos adipócitos. A absorção de ácidos graxos por esses órgãos provavelmente é facilitada pelas proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) e FAT/CD36 (translocase de ácidos graxos), que demonstraram estar elevadas em indivíduos obesos e pacientes com DHGNA (Greco, et al., 2008; Fabbrini, et al., 2009).

Essa doença se desenvolve quando o ritmo de síntese hepática de TAG, como resultado do aumento da captação de ácidos graxos e sua esterificação em TAG assim como da lipogênese *de novo* a partir do metabolismo de carboidratos e proteínas, excede o ritmo de catabolismo do TAG hepático por meio da oxidação de ácidos graxos ou a secreção de TAG em forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)

(Birkenfeld and Shulman, 2014). Diacilglicerol (DAG) é o penúltimo intermediário na síntese de TAG e, geralmente, corresponde com a concentração de TAG no fígado e no músculo esquelético, tanto em roedores quanto em humanos (Camporez et al., 2013; Camporez et al., 2015, Kumashiro et al., 2011). Como consequência, a associação entre DHGNA/resistência hepática à insulina e conteúdo intramiocelular de lipídios/resistência muscular à insulina foi também associada entre conteúdo de DAG no tecido e resistência à insulina. A observação direta do conteúdo de DAG no fígado associado a resistência hepática à insulina foi demonstrada tanto em roedores (Camporez et al., 2013; Camporez et al., 2015) quanto em humanos (Kumashiro et al., 2011), da mesma forma que o conteúdo de DAG no músculo associado com a resistência muscular à insulina (Camporez et al., 2017).

Como o DAG é um conhecido mediador lipídico bioativo, necessário para a ativação da proteína quinase C (PKC), foi dada atenção para um possível papel da atividade das PKCs na resistência à insulina. De fato, a ativação das nPKCs tem sido consistentemente observada em músculo e fígado em estado de resistência à insulina. A ativação da PKC $\theta$  associada ao acúmulo de DAG no músculo esquelético tem sido observada tanto em roedores resistentes à insulina (Camporez et al., 2013) quanto em humanos (Szendroedi et al., 2014). Esse aumento da ativação da PKC $\theta$  em músculo esquelético foi associado ao aumento da fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), consequentemente reduzindo a sinalização da insulina nesse tecido. Já no fígado, o aumento do conteúdo de DAG foi associado a ativação da isoforma PKC $\epsilon$  tanto em modelos experimentais de resistência hepática à insulina (Petersen et al., 2016; Camporez et al., 2017) quanto em humanos que apresentam esteatose hepática e resistência à insulina (Kumashiro et al., 2011). Foi proposto pelo estudo de Petersen e colaboradores (Figura 1) que nos hepatócitos, a PKC $\epsilon$  fosforila o receptor de insulina (IR) em treonina, reduzindo sua capacidade de se autofosforilar em tirosina e desencadear a sinalização da insulina a jusante, levando a resistência hepática à insulina (Petersen et al., 2016).





**Figura 1:** Mecanismo proposto de resistência à insulina hepática induzida por lipídios. Em fígado normal, sensível à insulina (esquerda), o Thr<sup>1160</sup> não interfere com a ativação da IRK, e a sinalização a jusante procede normalmente na ligação da insulina. Na DHGNA (direita), a acumulação de DAG promove a translocação da membrana de PKCε, que por sua vez fosforila INSR Thr<sup>1160</sup> para prejudicar a atividade IRK e assim induzir a resistência à insulina hepática. Y, tirosina; P, fosfato. Fonte: Autor.

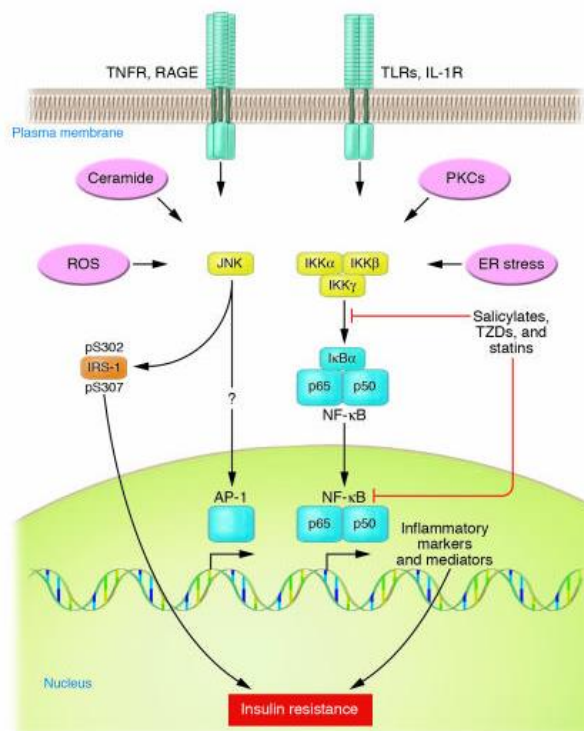
### 1.2 Resistência à Insulina e Inflamação

Outro mecanismo comumente associado a complicações metabólicas tem sido a inflamação de baixo grau e crônica. A citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) era capaz de induzir resistência à insulina. Essa foi uma ideia revolucionária de que uma substância produzida pela gordura – e superproduzida pela gordura expandida – tinha efeitos locais e potencialmente sistêmicos no metabolismo (Hotamisligil, et al. 1993; Feinstein, et al. 1993). O conceito de gordura como um local para a produção de citocinas e outras substâncias bioativas rapidamente se estendeu além do TNF- $\alpha$  para incluir leptina, Interleucina 6 (IL-6), resistina, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), Inibidor 1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1), angiotensinogênio, visfatina, Proteína de Ligação ao Retinol 4 (RBP4), soro amilóide A (SAA) e outros (Fukuhara, et al. 2005; Zhang, et al. 1994). A adiponectina é produzida de forma semelhante pela gordura, mas a expressão diminui com o aumento da adiposidade (Scherer, et al. 1995). Enquanto a leptina e a adiponectina são verdadeiras adipocinas que parecem ser produzidas exclusivamente por adipócitos, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, visfatina e PAI-1 também são expressos em níveis elevados em macrófagos ativados e/ou outras células. A quantidade relativa de cada um produzida pelo adipócito versus macrófagos associados ao tecido adiposo permanece desconhecida. Os locais de produção de resistina são mais complexos; eles incluem macrófagos em humanos, mas

tanto adipócitos quanto macrófagos em roedores (Steppan, et al. 2001). TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina e, sem dúvida, outras citocinas pró ou anti-inflamatórias parecem participar da indução e manutenção do estado inflamatório subagudo associado à obesidade. A MCP-1 e outras quimiocinas têm papéis essenciais no recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo. Essas citocinas e quimiocinas ativam vias intracelulares que promovem o desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (Shoelson, et al. 2006).

A expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de humanos obesos estava aumentada e foi associada com resistência à insulina e, interessante, foi reduzida com a perda de peso (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995). Já a falta de TNF- $\alpha$  em camundongos protegeu esses animais contra a resistência à insulina induzida por obesidade (Uysal et al., 1997) e a ablação do receptor de TNF- $\alpha$  especificamente no fígado reduziu a resistência hepática à insulina nesses animais (Bluemel et al., 2020).

O aumento da adiposidade ativa tanto c-Jun N-terminal cinase (JNK) quanto Inibidor da Subunidade beta do Fator Nuclear Kappa- $\beta$  Quinase (IKK $\beta$ ) (Yuan, et al. 2001; Aguirre, et al. 2000; Cai, et al. 2005). Muitos dos estímulos pró-inflamatórios mais típicos ativam simultaneamente as vias JNK e IKK $\beta$ , incluindo citocinas e Receptores do Tipo Toll (TLRs). Concordantemente, a inibição genética ou química de JNK ou IKK $\beta$ /Fator Nuclear Kappa-B (NF- $\kappa$ B) pode melhorar a resistência à insulina. Os vários mecanismos hipotéticos que podem explicar como a obesidade ativa JNK e NF- $\kappa$ B podem ser separados em vias receptoras e não receptoras (Shoelson, et al. 2006). Citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ativam JNK e IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B por meio de mecanismos mediados por receptores clássicos que foram bem caracterizados (Figura 2).

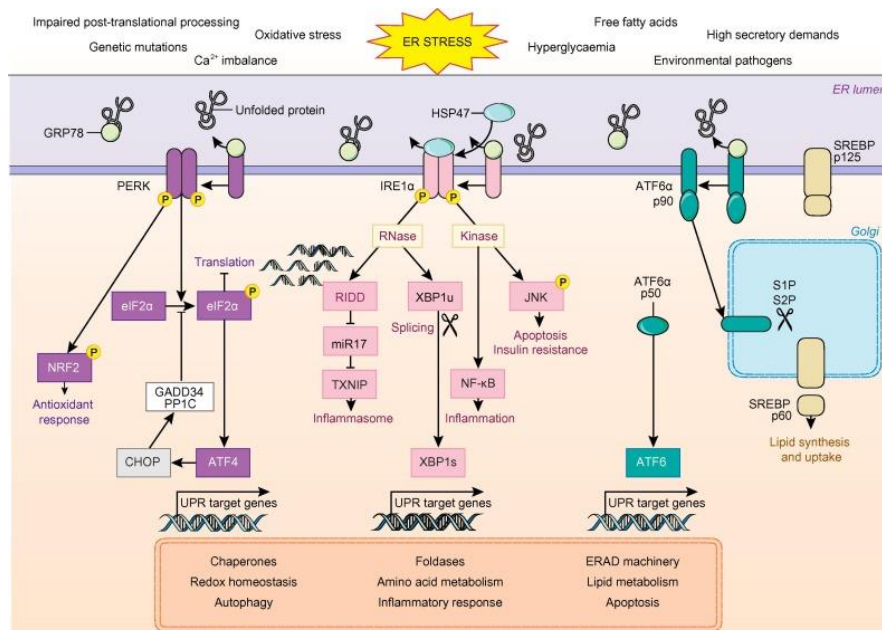


**Figura 2:** Mecanismos celulares potenciais para ativar a sinalização inflamatória. A obesidade e a dieta rica em gordura ativam as vias IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B e JNK em adipócitos, hepatócitos e macrófagos associados. Estímulos que demonstraram ativar essas vias durante a desregulação metabólica incluem ligantes para receptores TNF- $\alpha$ , IL-1, Toll ou AGE (TNFR, IL-1R, TLR ou RAGE, respectivamente), estresses intracelulares, incluindo estresse ROS e ER, ceramida e várias isoformas de PKC. A ativação de IKK $\beta$  induzida pela obesidade leva à translocação de NF- $\kappa$ B e ao aumento da expressão de vários marcadores e potenciais mediadores de inflamação que podem causar resistência à insulina. A ativação de JNK induzida pela obesidade promove a fosforilação de IRS-1 em locais de serina que regulam negativamente a sinalização normal através do eixo receptor de insulina/IRS-1. Exemplos incluem serina-302 (pS302) e serina-307 (pS307). Por contraste, não foram relatadas evidências de efeitos induzidos pela obesidade em fatores de transcrição, como AP-1, que são regulados por JNK. IKK $\beta$  e/ou NF- $\kappa$ B são inibidos ou reprimidos pelas ações de salicilatos, TZDs e estatinas. Fonte: Autor.

### 1.3 Resistência à Insulina e Estresse do Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) nos hepatócitos tem uma capacidade notável de se adaptar às mudanças extracelulares e intracelulares, garantindo que as funções metabólicas hepáticas vitais sejam preservadas. No entanto, em humanos, vários distúrbios (por exemplo, hiperlipidemia, inflamação, vírus, drogas) podem perturbar a homeostase do RE dos hepatócitos, contribuindo para a desregulação do metabolismo lipídico hepático e para doenças hepáticas (Lebaupin, et al. 2018). Conseqüentemente, o RE envolve uma via evolutivamente conservada denominada resposta de proteína mal dobrada (UPR) (Walter e Ron, 2011) para controlar a proteína hepática e a homeostase lipídica. A UPR reduz a carga proteica secretora, aumenta o envelhecimento da proteína

(transcrição de chaperonas e foldases) e aumenta a capacidade de depuração por promover a autofagia e a degradação associada ao RE (Figura 3) (Lebaupin, et al. 2018).



**Figura 3:** A cascata de sinalização UPR. Múltiplos estímulos endógenos e exógenos podem criar estresse de RE, levando ao acúmulo de proteínas desdobradas e subsequente ativação do UPR. O GRP78 dissocia-se dos três sensores transmembrana ER PERK, IRE1 $\alpha$  e ATF6 que ativam suas respectivas cascatas de sinalização para primeiro restabelecer a proteostase e promover a sobrevivência celular através da transcrição de genes-alvo UPR dos mecanismos listados na parte inferior. A PERK oligomerizada fosforila o eIF2 $\alpha$  que inibe a tradução para reduzir a carga proteica no RE, mas concomitantemente aumenta a expressão do fator de transcrição ATF4. Em um mecanismo de feedback negativo, ATF4 induz CHOP que induz GADD34, uma subunidade reguladora de PP1C, inibindo assim a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e reiniciando a tradução. A fosforilação de PERK de NRF2 está envolvida na regulação da homeostase redox. O IRE1 $\alpha$  oligomerizado possui atividades de RNase e quinase. HSP47, um regulador seletivo de IRE1 $\alpha$ , desloca GRP78 de IRE1 $\alpha$  para facilitar sua oligomerização. A ativação da função RNase de IRE1 $\alpha$  leva à degradação mediada por RIDD de mRNAs e microRNAs, como miR17 levando à expressão desinibida de TXNIP e ativação do inflamassoma NLRP3, e o splicing de XBP1 resultando na ativação do potente fator de transcrição XBP1s. A ativação de IRE1 $\alpha$  também pode levar ao recrutamento de quinases de estresse envolvidas na inflamação mediada por NF $\kappa$ B ou apoptose mediada por JNK e resistência à insulina. ATF6 (p90) é transportado do RE para o Golgi para ser clivado pelas proteases S1P e S2P, liberando assim o fator de transcrição citosólica ATF6 (p50). Fonte: Autor.

A UPR é um complexo e bem conhecido mecanismo que permite que a célula corresponda a demanda sintética de proteína à capacidade sintética de proteína (Dillin, et al., 2014). Existem três ramos da UPR que são controlados por três proteínas integrantes da membrana do RE: fator de iniciação eucariótica semelhante a PKR 2 quinase (PERK), enzima requeredora de inositol 1 (IRE1), e ativador do fator de transcrição 6 (ATF6) (Hotamisligil, 2010). Normalmente, no RE não estressado, essas três proteínas são mantidas inativas por ligação da chaperona BiP / GRP78 a PERK, IRE1 e ATF6; o acúmulo de proteínas mal dobradas leva a dissociação da BiP e ativação da UPR (Hotamisligil, 2010). Efeitores a jusante na resposta de estresse de RE com funções propostas na regulação metabólica inclui NF- $\kappa$ B e JNK.

O estresse do RE pode desencadear resistência à insulina por meio do acúmulo excessivo de gordura. Além disso, o estresse do RE pode interromper a ação da insulina por meio da ativação de cada braço da UPR (Ozcan, et al. 2004; Gregor e Hotamisligil, 2011; Hummasti e Hotamisligil, 2010). Através de sua função cinase, IRE1 $\alpha$  fosforila JNKs e I $\kappa$ B cinase, inibindo a sinalização da insulina. No entanto, isoladamente, a ativação de JNK mediada por IRE1 $\alpha$  mostrou-se insuficiente para induzir a resistência hepática à insulina, sugerindo assim uma relação causal na qual a resistência hepática à insulina é secundária à lipogênese ativada pelo estresse do RE (Jurczak, et al. 2012). Da mesma forma, o braço PERK contribui para a resistência à insulina. A desfosforilação seletiva de Fosforilação do Fator de Iniciação Eucariótica-2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) através da expressão forçada de Proteína Fosfatase 1 Subunidade Reguladora 15A (GADD34) levou a uma maior sensibilidade à insulina (Oyadomari, et al. 2008).

#### *1.4 Resistência à Insulina e Função Mitocondrial*

Tanto a resistência à insulina quanto o aumento da gordura ectópica foram associados a uma redução geral da função mitocondrial. Um acúmulo significativo de lipídios intramiocelulares no músculo esquelético foi observado em pacientes com resistência à insulina e DM2, o que pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de ácidos graxos livres e à sua oxidação prejudicada (Stump, et al. 2003; Befroy, et al. 2007). Em comparação com indivíduos saudáveis, a síntese de ATP no músculo é reduzida em pacientes diabéticos (Stump, et al. 2003), bem como em indivíduos com resistência à insulina (Petersen, et al. 2003), refletida por uma atividade mitocondrial reduzida e uma diminuição nas taxas de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Befroy, et al. 2007). Além disso, a disfunção mitocondrial tem sido especificamente associada ao estresse oxidativo, que é típico de diabetes e resistência à insulina (Jankauskas, et al. 2021; Sivitz e Yorek, 2010).

A resistência à insulina parece ter efeitos específicos do tecido nas características mitocondriais que provavelmente se correlacionam com as demandas metabólicas muito diferentes dos tecidos sensíveis à insulina divergentes. Por exemplo, estudos iniciais de expressão gênica revelaram vias metabólicas alteradas em fígados de pacientes com DM2, especificamente a regulação positiva de mRNAs centrais para Sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e gliconeogênese (Misu, et al. 2007; Takamura, et al. 2008), que contrasta com a

regulação negativa de mRNAs mitocondriais no músculo. Além disso, o aumento da expressão hepática de OXPHOS mRNA foi preditivo de glicemia em jejum independentemente da idade, índice de massa corporal (IMC) ou níveis de insulina em jejum (Misu, et al. 2007). A presença de captação de glicose dependente de insulina em miócitos e hepatócitos pode influenciar a forma como o estado de energia de um tecido regula sua função mitocondrial (Mitchell, et al. 2013).

### *1.5 Resistência à Insulina e Estradiol*

Curiosamente, os estudos e as prevalências de doenças relacionados com a resistência à insulina apresentam uma grande diferença entre homens e mulheres. Uma forte associação da prevalência e gravidade da DHGNA com idade, sexo e etnia é bem conhecida e foi apresentada no estudo de Tobari e Hashimoto (2014). Em uma distribuição de pacientes com DHGNA por estado de fibrose leve ou avançada em relação à idade e sexo, observou-se que a fibrose avançada era mais comum do que a fibrose leve em ambos os sexos, em sua geração mais velha. Mas quando se olhava para mulheres em idade reprodutiva e homens de mesma idade, as mulheres apresentavam menor risco (Tobari e Hashimoto, 2014).

Neste contexto, se pensa em uma diferença forte em mulheres e idade reprodutiva e homens de mesma idade, a presença do estradiol (E2), mais potente estrogênio, em grande quantidade. Sendo assim, nas últimas décadas, dados provenientes tanto de estudos clínicos como de estudos experimentais revelaram que, além de seu papel central no desenvolvimento sexual e reprodução, o estradiol contribui enormemente para a homeostase glicêmica (Louet, et al., 2004). E isso é sustentado de forma mais forte pelo fato de que a redução da concentração de estrogênio durante a menopausa é associada com o aumento de gordura visceral e, por sua vez, doenças metabólicas como resistência à insulina, DM2 e doenças cardiovasculares. Corroborando com isso, foi demonstrado que a sensibilidade à insulina é maior em mulheres antes da menopausa do que em homens (Nuutila, et al., 1995), e a terapia de reposição hormonal com estrogênio em mulheres após a menopausa reduziu o risco de desenvolvimento de DM2 (Margolis, et al., 2004).

Estudos experimentais também demonstram a importância do estradiol na homeostase metabólica. Aumento do peso corporal associado com aumento da gordura corporal é observado tanto em ratas (Camporez, et al., 2011) quanto em camundongos fêmeas (Camporez, et al., 2013) ovariectomizadas (OVX). Além disso, tanto

camundongos machos quanto fêmeas que não possuem a enzima aromatase (enzima responsável pela etapa final da síntese de estrogênios) apresentaram aumento do peso corporal, gordura corporal e hipertrofia dos adipócitos (Jones, et al., 2000). Foi demonstrado que o tratamento com estradiol em camundongos fêmeas OVX e alimentadas com dieta rica em gorduras reduziu o peso corporal e percentual de gordura, além do aumento da sensibilidade à insulina. Esses efeitos do estradiol no peso corporal e sensibilidade à insulina foram associados a uma redução do conteúdo ectópico de lipídios, tanto no fígado quanto no músculo, principalmente a redução de DAG o que, por sua vez, levou a uma redução da ativação das PKC $\epsilon$  (fígado) e PKC $\theta$  (músculo), aumentando a sensibilidade à insulina (Camporez, et al. 2013).

### *1.6 Receptor de Estrogênio Alfa (ER $\alpha$ )*

A existência de um receptor de estrogênio (ER) foi demonstrado por Elwood Jensen em 1958 (Jensen, et al. 1966), e o gene correspondente foi clonado em 1985. O receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ) foi clonado da próstata e ovário de ratos em 1996 (Kuiper, et al. 1996). O receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) é expresso principalmente em tecidos reprodutivos (útero, ovário), mama, rim, osso, tecido adiposo branco e fígado, enquanto a expressão de ER $\beta$  é encontrada no ovário, sistema nervoso central (SNC), sistema cardiovascular, pulmão, órgãos reprodutores masculinos, próstata, cólon, rim e sistema imunológico. Como membros da família de proteínas receptoras nucleares, os ERs são encontrados principalmente no núcleo, mas também no citoplasma e nas mitocôndrias (Jia, et al. 2015). Essas proteínas têm ações no núcleo celular, regulando a transcrição de genes-alvo específicos por meio da ligação a sequências reguladoras de DNA associadas. Ambos os subtipos são acentuadamente expressos nos sistemas cardiovascular e nervoso central. Existem alguns papéis fisiológicos comuns para os dois ERs, como no desenvolvimento e função dos ovários e na proteção do sistema cardiovascular. O subtipo alfa tem um papel mais proeminente na glândula mamária e no útero, bem como na preservação da homeostase esquelética e na regulação do metabolismo. O subtipo beta parece ter um efeito mais profundo nos sistemas nervoso central e imunológico, e geralmente neutraliza a hiperproliferação celular promovida por ER $\alpha$  em tecidos como mama e útero (Dahlman-Wright, et al. 2006; Heldring, et al. 2007).

Diante dos resultados que foram apresentados por diversos estudos, como aqueles citados acima, o interesse agora era compreender por meio de qual mecanismo o estradiol

conduzia essas ações metabolicamente benéficas. Foi sugerido então, que essas ações são mediadas pelo receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ), já que camundongos que não possuem esse receptor também apresentam obesidade (Heine, et al., 2000).

Recentemente foi demonstrado que a ativação do ER $\alpha$  aumenta a atividade mitocondrial e metabolismo sistêmico, protegendo camundongos fêmeas OVX contra obesidade induzida por dieta rica em gorduras (Hamilton, et al., 2016). Esse efeito do ER $\alpha$  sobre o metabolismo mitocondrial também foi demonstrado especificamente em músculo esquelético. Animais sem o ER $\alpha$  especificamente em músculo esquelético demonstram reduzida atividade mitocondrial, aumento ectópico de lipídeos e defeito no *turnover* mitocondrial, levando a intolerância à glicose e resistência à insulina (Ribas et al., 2016). Interessantemente, animais sem o ER $\alpha$  especificamente no fígado apresentam aumento do depósito de TAG hepático e aumento da susceptibilidade de DHGNA induzida por dieta rica em gorduras (Han et al., 2014), enquanto a ativação do ER $\alpha$  por tamoxifeno especificamente no fígado parece melhorar o metabolismo global em roedores via aumento da secreção do Fator de Diferenciação do Crescimento 15 (GDF15) (Guillaume et al., 2019).

Interessantemente, estudos mostram que a expressão da proteína ER $\alpha$  é significativamente menor em camundongos machos do que fêmeas de mesma ninhada para TAB, fígado e músculo. Em relação às fêmeas da mesma idade, os porcos Ossabaw machos também apresentaram expressão significativamente menor da proteína ER $\alpha$  no TAB e no fígado. Em comparação com camundongos fêmeas, a diminuição do conteúdo de ER $\alpha$  em machos foi acompanhada por pior tolerância à glicose. Coletivamente, esses dados sugerem que a expressão de ER $\alpha$  é consistentemente menor em homens do que em mulheres (Winn, et al. 2019).



Hipótese

## 2. Hipótese

A hipótese desse trabalho é de que a superexpressão hepática do ER $\alpha$  impacta positivamente a sensibilidade hepática à insulina e o metabolismo energético hepático de camundongos machos.

Essa hipótese foi fundamentada em cima dos fatos: 1) O E2 exerce efeitos benéficos no metabolismo energético via ER $\alpha$ . 2) As fêmeas são fisiologicamente protegidas contra a resistência à insulina induzida por lipídios quando comparadas com os machos por apresentarem uma maior expressão de ER $\alpha$ .

Objetivos

### 3. Objetivo Geral

Avaliar (*in vivo*) os efeitos da superexpressão do ER $\alpha$  especificamente no fígado sobre o metabolismo energético hepático e resistência hepática à insulina em camundongos.

#### 3.3 Objetivos Específicos

Utilizando camundongos machos para superexpressar o ER $\alpha$ , o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vivo* os efeitos da superexpressão especificamente no fígado sobre:

- a) Avaliar o acúmulo hepático de lipídeos;
- b) Analisar a expressão de marcadores inflamatórios;
- c) Analisar a expressão de marcadores de estresse de RE;
- d) Analisar a expressão de marcadores de função mitocondrial;
- e) Analisar a expressão de marcadores de síntese de lipídeos;
- f) Avaliar a respiração mitocondrial de hepatócitos primários;
- g) Avaliar as concentrações plasmáticas de enzimas hepáticas (AST e ALT);
- h) Mensurar a tolerância à glicose dos animais;
- i) Avaliar a sensibilidade à insulina *in vivo*;

## *Materiais e Métodos*

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos com background C57BL/6J, proveniente do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos da FMRP-USP dispostos em racks ventiladas (n=4), com temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $\approx 55\%$ ) controlada, ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), livre acesso à água e ração balanceada (Nuvilab CR1 – Nuvital) ou dieta hiperlipídica (HFD) contendo 45% das calorias provenientes de gordura (D12451, Research Diets, NJ, USA).

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, seguindo as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal-CONCEA, e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-FMRP) sob o protocolo nº084/2021.

### 4.2 Vetor Para Aumento da Expressão do ERA

Os vírus adeno-associados (AAVs) são um importante sistema vetorial para manipulação da expressão gênica e seu uso aumentou drasticamente nos últimos 20 anos. O AAV utilizado para este estudo foi o AAV8-TBG-m-Ers1 (Vector BioLabs, USA), expressa EGFP, do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein* (Proteína Verde Fluorescente Aprimorada), conduzido por um promotor de hormônio tireoidiano humano (TBG) hepático. O TBG é um promotor híbrido de 0,8 kb baseado no promotor da globulina de ligação ao TBG e no intensificador de microglobina/bicunina. Este promotor híbrido tem sido usado para a expressão de transgenes específicos do fígado.

Os AAVs são pequenos (20 nm), vírus de DNA de fita simples que pertencem à família *Parvoviridae*. Eles provocam uma resposta imune muito leve, especialmente os vetores AAV recombinantes (rAAVs) que sofreram modificações para evadir parcialmente o sistema imunológico (Rogers, et al., 2011; Rabinowitz, et al., 2019). Existem diferentes sorotipos de AAV (AAV1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9), cada um dos quais exibe várias eficiências de transdução nos diferentes tecidos-alvo (Zincarelli, et al., 2008).

Em camundongos, após a transdução de suas células-alvo, os AAVs entram no núcleo celular, onde persistem em uma forma episomal e raramente se integram ao genoma do hospedeiro (Duan, et al., 1999; Miller, et al., 2004).

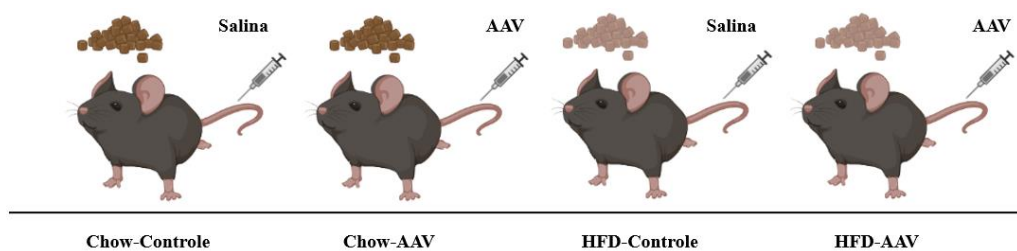
O número de hepatócitos transduzidos é proporcional à dose (isto é, cópias genéticas) do vetor AAV8-TBG administrado; quanto maior a dose do vetor, mais hepatócitos serão transduzidos. Isso permite o estudo da exclusão/superexpressão de um gene em todo o parênquima hepático (Bird, et al., 2018). Como tal, o AAV8-TBG é amplamente utilizado para recombinar a maioria dos hepatócitos e estudar os efeitos das alterações na expressão gênica em todo o fígado, servindo como um golpe único, nocaute/superexpressão de genes específicos de hepatócitos (Kiourtis, et al. 2021).

Quando os animais atingem sua oitava semana de vida, eles foram submetidos ao procedimento de inoculação do vetor viral por via intravenosa. Esses animais foram anestesiados com Isoforine® (isoflurano) que é indicado na indução e manutenção da anestesia geral. Esse anestésico foi colocado diretamente na seringa da bomba de infusão, sendo utilizado uma taxa de 5,0% e um volume de 0,8Lm para a indução. Para a manutenção do animal foi usado uma taxa de 3,0% e um volume de 0,45L/m, essa pode variar de acordo com o peso do animal. Além disso, foram preparadas seringas de 1mL, contendo a quantidade da solução do vetor viral em um volume de 100µL de salina para cada animal. Após os animais estarem em nível de manutenção do anestésico, foi injetada a solução contendo o vírus ou a salina via veia caudal.

#### *4.3 Delineamento Experimental*

Após os animais passarem pelo procedimento de inoculação do vetor viral, eles foram divididos de acordo com seus respectivos grupos, sendo alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta padrão (Chow) (Figura 4), permanecendo na alimentação durante 6 semanas:

- a) alimentados com Chow, sem superexpressão do receptor (Chow-Controle).
- b) alimentados com Chow, com superexpressão do receptor (Chow-AAV).
- c) alimentados com HFD, sem superexpressão do receptor (HFD-Controle).
- d) alimentados com HFD, com superexpressão do receptor (HFD-AAV).



**Figura 4:** Delineamento experimental dos grupos. Representação do esquema de divisão de grupos dos animais. (Criado em: BioRender.com)

#### 4.4 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

No início do dia, os animais foram retirados do biotério e levados até à sala de procedimento do laboratório, sendo submetidos à uma restrição alimentar de 6 horas. Duas horas antes de iniciar de fato o experimento, esses animais foram colocados em contenedores para adaptação ao local, com a finalidade de evitar qualquer tipo de estresse que possa ocorrer durante o procedimento, já que o estresse do animal pode influenciar em sua glicemia basal.

No início do experimento, foi verificada primeiramente a glicemia em jejum (tempo zero), posteriormente, é injetado, de forma intraperitoneal, uma solução de glicose à 20% (2 mg/kg de peso corporal – 20% de dextrose) nos camundongos. Em seguida, a glicemia foi monitorada por tempos, sendo eles de 15', 30', 45', 60', 90' e 120' pelo sangramento de via caudal. Ao final do experimento, os animais foram acomodados novamente em suas caixas e levados de volta ao biotério, aonde recebem suas respectivas alimentações.

#### 4.5 Ressonância Magnética

A composição corporal (massa magra, fluidos corporais e gordura total) foi avaliada nos camundongos conscientes, sem jejum, através da ressonância magnética (BRUCKER LF110 MRI). Os camundongos foram contidos em um tubo de contenção cilíndrico e esse tubo, com o animal, foi colocado dentro do aparelho da ressonância magnética, ficando ali por um período máximo de 60 a 80 segundos. O software do aparelho captura a porcentagem e quantidade em gramas.

#### 4.6 Eutanásia e Coleta de Tecidos

Para a eutanásia e posterior coleta de tecidos, os animais foram submetidos à uma restrição alimentar de 6 horas. A eutanásia foi realizada em um ambiente silencioso e



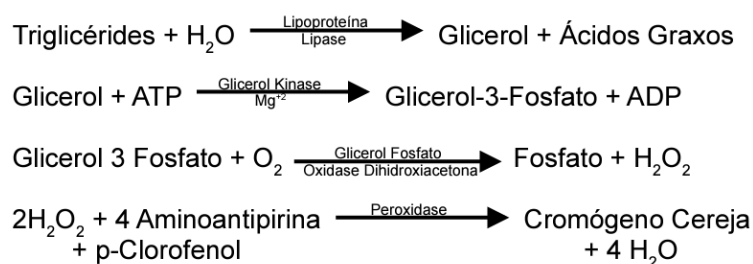
longe dos outros animais. A morte do animal sempre é confirmada antes que o cadáver seja descartado.

Os animais foram anestesiados com Isoforine® (isoflurano) com a bomba de infusão, sendo utilizado uma taxa de 5,0% e um volume de 0,8Lm para a indução. Quando esses animais perderam a sensibilidade, foi coletado o sangue através da veia cava abdominal. Esse sangue foi centrifugado, coletado apenas o plasma e guardado para posteriores análises. Também foi coletado o fígado, o músculo esquelético (quadríceps) e o TAB para as análises. Esses tecidos foram primeiramente congelados em nitrogênio, e em seguida, armazenados no freezer -80°C.

#### *4.7 Conteúdo Tecidual de Lipídios*

Para o método de extração e purificação de lipídios, descrito por Bligh e Dyer, foi utilizado de 50 à 100 mg de tecido (fígado) previamente congelados em nitrogênio e armazenados no freezer -80. Cada amostra foi homogeneizada com o homogeneizador Polytron em um tubo eppendorf com uma mistura de 1 mL de clorofórmio:metanol (2:1) até que todo o tecido seja dissolvido. Em seguida, os tubos foram agitados em temperatura ambiente de 3 à 4 horas. Após esse período, essa solução adicionada forma um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água). A determinação das solubilidades de cada componente pode ser avaliada através de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água) com um terceiro (metanol), completamente miscível nos outros dois. Adiciona-se 200 µL de ácido sulfúrico (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e agita levemente no vórtex. As amostras foram então centrifugadas à 2000 RPM durante 10 min à temperatura ambiente afim de separar fase aquosa e orgânica, que fica na camada inferior, contendo o conteúdo de triglicerídeos e fosfolipídeos. Com uma pipeta de 1 mL, a fase orgânica foi transferida para um novo tubo eppendorf e deixada para secar overnight. No dia seguinte, as amostras foram reconstituídas em 1 mL de álcool isopropílico e levadas ao vórtex até que estejam completamente homogeneizadas.

Para mensurar o conteúdo tecidual de TAG, utilizamos um reagente bioquímico (Bioclin), que é um método de teste enzimático colorimétrico, para uso de diagnóstico *in vitro*. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 Aminoantipirina e p-Clorofenol, na presença da Peroxidase, originam um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de TAG.



**Figura 5:** Princípio de ação da metodologia utilizada. (Bioclin)

#### 4.8 Dosagem de Enzimas Hepáticas no Plasma

Após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado e centrifugado (12000 RPM, 2 minutos) para separação do plasma. Para a análise de enzimas hepáticas (ALT e AST) foi utilizado um kit comercial de determinação cinética. Esse tipo de determinação geralmente é utilizado em reações em que o analito é uma enzima. A atividade da enzima é analisada por meio da reação dela com um composto químico denominado substrato. Essa reação gera um produto.

#### 4.9 Avaliação da Expressão Gênica – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A transcriptase reversa (RT) seguida de quantificação utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (qPCR) em tempo real ou, simplesmente reverse transcription-qPCR (RT-qPCR), é um método *in vitro* para amplificação enzimática de sequências definidas de DNA complementar obtido a partir do RNA. A técnica de RT-qPCR é uma das mais utilizadas em experimentos de quantificação da expressão gênica por ser considerado um dos métodos mais sensível e específico de quantificação gênica dos que outros utilizados para esta finalidade.

Para a análise pelo RT-qPCR, 50 mg da amostra (fígado) foi homogeneizada em 1 mL de trizol (Life Technologies) para extração do RNAm. A amostra foi incubada por 5 min à temperatura ambiente (25°C), e foi adicionado 200 µL de clorofórmio e incubado por 15 min à temperatura ambiente, centrifugada por 15 min a 2°C a 12000 rpm. A fase aquosa que contém o RNA foi separada, e em seguida adicionado 500 µL de álcool isopropílico, agitada por inversão e incubada por 10 min à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 10 min a 4°C a 12000 rpm, depois passando por um processo de lavagem, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 1 mL de álcool etílico 75%, e foi centrifugado por 5 min a 4°C a 75000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o RNA

então passa por uma etapa de dissolução, em que foi adicionado 50  $\mu$ L de água livre de RNase.

A leitura da concentração de RNA foi avaliada a 260 nm e a pureza a partir da relação 260/280 nm no aparelho nanodrop (DeNovix). Em seguida, a preparação do cDNA foi feito através da reação de transcrição reversa (High-Capacityc DNA kit, Applied Biosystems). Foi preparado um mix contendo os componentes: tampão RT 10x, mix dNTP 25x 100 Mm, primers RT 10x, transcriptase reversa, inibidor de RNase, água livre de RNase, e adicionado à amostra. A amostra foi então levada ao termociclador.

A expressão gênica foi analisada por RT-qPCR (Rotor Gene Q - Qiagen) e sonda fluorescente SYBR Green (Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG, Invitrogen). As análises da expressão gênica foram realizadas usando um método descrito por Livak e Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001).

Foram analisados os seguintes genes:

1. Receptor: ERs1.
2. Marcadores inflamatórios: TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ;
3. Marcadores da via de síntese de lipídios: FASN, ACC, SREBP1, SCD1.
4. Avaliação dos possíveis efeitos globais: FGF21.

#### *4.10 Medição do Consumo de Oxigênio em Hepatócitos Primários*

Hepatócitos primários de camundongos tratados com salina ou AAV foram isolados. As células foram lavadas 3 vezes com meio de recuperação (DMEM com alta glicose mais 10% de soro bovino fetal) e quantidades iguais de células (5.000) foram semeadas em cada poço de uma placa de cultura de células Seahorse XF96 (Seahorse Bioscience, North Billerica, Massachusetts). Em resumo, as células foram mantidas em meio de recuperação por 4 a 6 horas e depois foram lavadas com meio DMEM (baixa glicose mais 10% de soro fetal bovino) e incubadas durante a noite. Na manhã seguinte, as células foram lavadas com meio de ensaio XF96 pré-aquecido ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ). O meio de ensaio XF96 (180 $\mu$ L) foi então adicionado a cada poço. Imediatamente antes das medições, as células com meio de ensaio foram colocadas em uma incubadora umidificada sem tampão a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para permitir o equilíbrio de temperatura e pH. O meio XF Assay (200 $\mu$ L) foi adicionado em as amostras foram analisadas no analisador XF24.

#### 4.11 Peroxidação Lipídica e Níveis Antioxidantes

A peroxidação lipídica foi determinada medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método descrito por Lapenna et al., (2001). O nível de antioxidante dos tecidos foi determinado pela quantificação dos grupos sulfidríla (SH) de acordo com o método descrito por Faure e Lafond (1995) com algumas modificações.

#### 4.12 Avaliação da Expressão de Proteínas – Western Blotting

A técnica de Western Blotting se baseia na separação das proteínas por peso molecular através de uma eletroforese, seguindo-se da transferência para uma membrana e a detecção da proteína de interesse com um anticorpo específico.

O fígado também foi utilizado para a expressão proteica. O tecido dos animais foi pulverizado e homogeneizado em tampão RIPA a 4°C (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e PMSF 2 mM) com homogenizador Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments). Os extratos teciduais foram centrifugados à 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado utilizando-se o método de Bradford (BioRad). As amostras foram tratadas com tampão de Novex contendo DTT 200 mM e 60 µg de proteínas totais solubilizadas dos fragmentos do fígado dos camundongos. Essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (extrato total). Em cada gel foi pipetado um marcador com peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um sistema de transferência semidry (Bio-Rad) por 10 min. As membranas de nitrocelulose foram então incubadas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C por 2 horas para reduzir a ligação inespecífica de proteínas nas membranas.

Para avaliação, foram analisados as seguintes proteínas:

4. Marcadores de estresse de RE: fosfo-JNK, NFkB. (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA).
4. Via de síntese lipídica: SREBP1, SCD, fosfo-AMPK, (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA).

Todas as membranas foram incubadas com GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) para controle da quantidade de proteína na membrana. Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (3% de BSA ao invés de leite), por 12 h a 4°C e a concentração de cada anticorpo será de acordo com o sugerido pelo fabricante. Em seguida as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora por 30 min. Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase, por 1:30h em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit comercial (ECLPlus, Amersham).

#### 4.13 Análise Histológica – Coloração Oil Red

Fragmento de fígados foram embebidos em um molde com tissue-tek (Thermo Scientific), imediatamente após foi colocado em um recipiente contendo álcool isopropílico e congelado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). Depois foi cortado no criostato (Microm H560). Foram feitos cortes de 12 µm e acomodados três cortes, de diferentes partes do tecido, por lâmina (duas lâminas por animal). As lâminas foram coradas com ORO (5 minutos), em seguida lavadas em água corrente (30 minutos). As imagens (10 de cada animal) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NISElements BR 3.1 software. Essas imagens foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução. A quantificação do acúmulo de gordura no tecido será realizada através do programa Image J.

#### 4.14 Avaliação *in vivo* da Sensibilidade à Insulina

Para avaliação *in vivo* da sensibilidade à insulina foi realizado *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico como descrito anteriormente (Camporez et al., 2013), com algumas modificações. Para realização, foi implantado um cateter na veia jugular 7 dias antes do *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico. Para medida da produção endógena de glicose (EGP) basal, foi realizada a infusão de [3-3H]-glicose (Perkin- Elmer Life Sciences, USA) em um ritmo de 0.05 µCi/min por 120 minutos após 6 horas de restrição alimentar através da veia jugular. Após essa infusão basal, o *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico foi conduzido em animais acordados por 120 minutos com uma infusão inicial de insulina por 3 minutos (29 mU/kg) seguida por um infusão contínua de 3 mU/kg.min<sup>-1</sup> de insulina humana (Novolin; Novo Nordisk). Também foi realizada uma infusão contínua de [3-3H]-glicose (0.1 µCi/min), e uma infusão variável

de dextrose (20%) para manutenção da glicemia normal (~120 mg/dL). Após 75 minutos do início do *clamp* foi injetado um bolus de 10 $\mu$ Ci de 2-deoxy-d-[1-14C]glicose (PerkinElmer) para estimativa da captação tecidual de glicose estimulada por insulina. Amostras de plasma foram coletadas através da artéria carótida nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 minutos (Ayala et al., 2010). Além disso, os animais receberam de forma intravenosa uma solução contendo albumina mimetizando o plasma artificialmente durante o período de infusão com insulina, para compensação do volume de sangue retirado para amostras de plasma. Ao final do *clamp*, os animais foram anestesiados com uma injeção de pentobarbitol sódico (150 mg/kg) e o fígado foi retirado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido, e então estocados em  $-80^{\circ}\text{C}$  para subsequente análise.

#### *4.15 Forma de Análise dos Resultados*

Os resultados foram analisados utilizando o GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). O mínimo de amostras por grupo foi definido por um n suficiente para realizar a análise da distribuição de amostras através do teste de normalidade D'Agostino-Pearson omnibus recomendado pelo programa GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Quando necessário, foi realizado o teste t para amostras não pareadas. O nível de significância mínima aceitável foi  $p < 0,05$ .

Resultados

## 5. Resultados

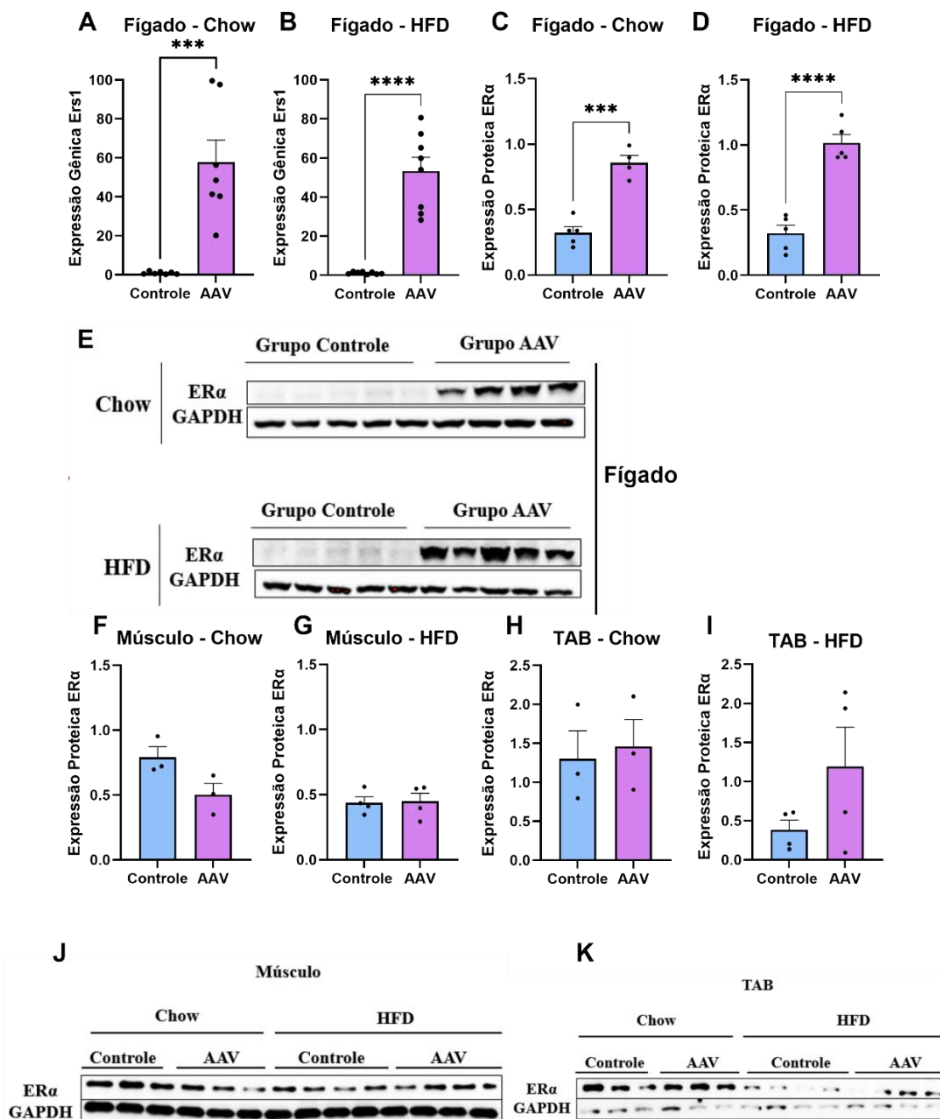
### 5.1 Superexpressão do Receptor de Estrogênio Alfa (ER $\alpha$ )

As amostras de fígado dos animais foram utilizadas no RT-qPCR para confirmar a superexpressão do gene nos animais em tratamento com o vírus. A expressão do gene *Ers1* (*do inglês Estrogen Receptor 1*) nos animais vírus foi aumentada quando comparada aos animais controle, naqueles tratados com dieta padrão ( $p < 0,0001$ ) tanto quanto com dieta hiperlipídica ( $p < 0,001$ ) (Figura 6).

Além da confirmação de superexpressão por técnica de RT-PCR, as amostras de fígado dos animais também foram utilizadas para verificar a quantificação de proteínas. A expressão da proteína ER $\alpha$  nos animais vírus foi aumentada quando comparada aos animais controle, naqueles tratados com dieta padrão ( $p < 0,0001$ ) (figura 6) tanto quanto com dieta hiperlipídica ( $p < 0,0001$ ) (Figura 6).

Amostras do TAB e do músculo também foram coletadas para avaliar a expressão gênica e proteica, afim de confirmar o receptor foi superexpresso apenas no fígado. Este fato foi confirmado, visto que em ambas as análises, não houve diferença na expressão do receptor (Figura 6).





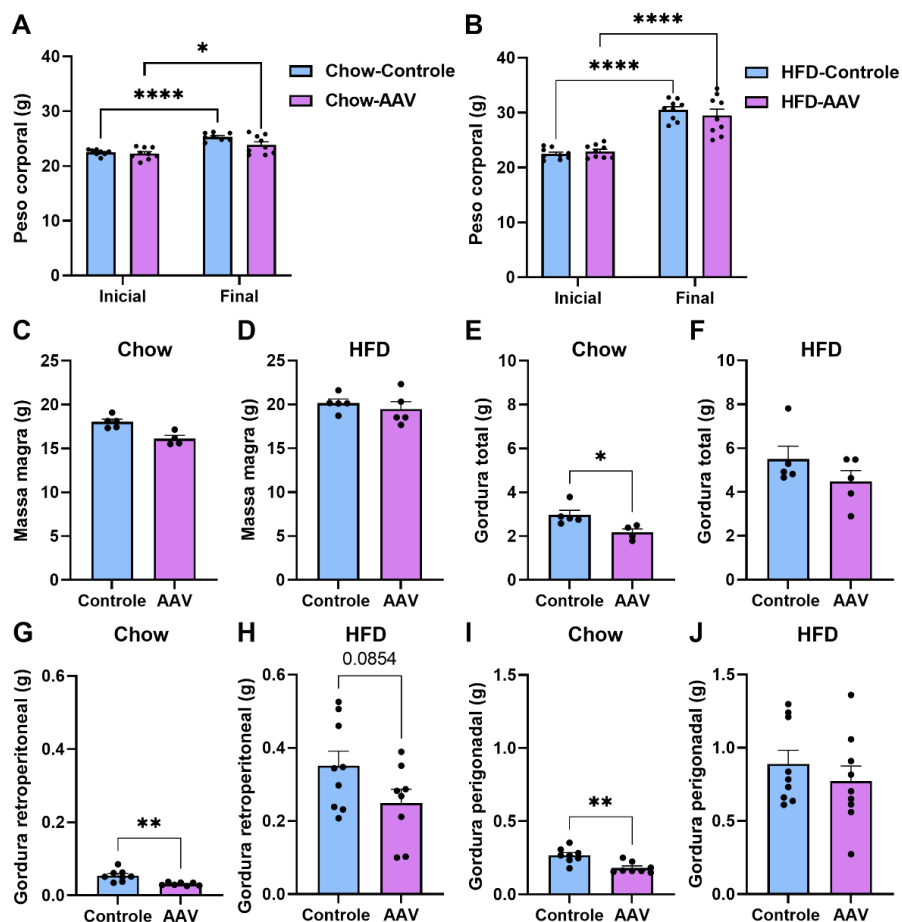
**Figura 6:** Análise da superexpressão do ER $\alpha$ . **A)** Análise de RT-qPCR, para avaliação da expressão gênica do Ers1 em animais tratados com dieta padrão (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^{***} < 0,0003$ , ( $n = 9$ ) **B)** Análise de RT-qPCR, para avaliação da expressão gênica do Ers1 em animais tratados com dieta hiperlipídica (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^{****} < 0,0001$ , ( $n = 9$ ). **C)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  em animais tratados com dieta padrão (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^{***} < 0,0003$ , ( $n = 5$ ). **D)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  em animais tratados com dieta hiperlipídica (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^{****} < 0,0001$ , ( $n = 5$ ). **E)** Análise qualitativa da proteína ER $\alpha$  em animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, através do ImageJ. **F)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  no músculo de animais tratados com dieta padrão. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t. ( $n = 5$ ). **G)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  no músculo de animais tratados com dieta hiperlipídica. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t. ( $n = 5$ ). **H)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  no TAB de animais tratados com dieta padrão. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t. ( $n = 3-5$ ). **I)** Análise da expressão proteica do ER $\alpha$  no TAB de animais tratados com dieta hiperlipídica. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t. ( $n = 3-5$ ). **J)** Análise qualitativa da proteína ER $\alpha$  no músculo em animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, através do ImageJ. **K)** Análise qualitativa da proteína ER $\alpha$  em TAB em animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, através do ImageJ.

## *5.2 Composição Corporal*

Os animais foram pesados semanalmente, para além de acompanhar o ganho de peso durante o tratamento, avaliar o peso e a indução da obesidade ao final do mesmo. Não foi possível observar diferenças significativas no peso final entre os grupos quando se avaliou o tratamento. Bem como, o delta do peso corporal também não demonstrou diferença significativa. (Figura 7)

Através da análise da composição corporal pelo aparelho de ressonância magnética, não houveram diferenças significativas na massa magra entre os grupos, mas o grupo que recebeu o vírus, alimentado com dieta padrão, apresentou uma menor gordura total quando comparado ao que recebeu apenas a salina. (Figura 7).

A gordura retroperitoneal e perigonadal dos animais foi pesada no momento da eutanásia para análise. O grupo que recebeu o vírus, alimentado com dieta padrão, apresentou menor gordura retroperitoneal e perigonadal quando comparado aquele que recebeu apenas salina. A gordura total, retroperitoneal e perigonadal reduziu em aproximadamente 26%, 42% e 32%, respectivamente. E não foi possível observar diferenças significativas no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. (Figura 7).

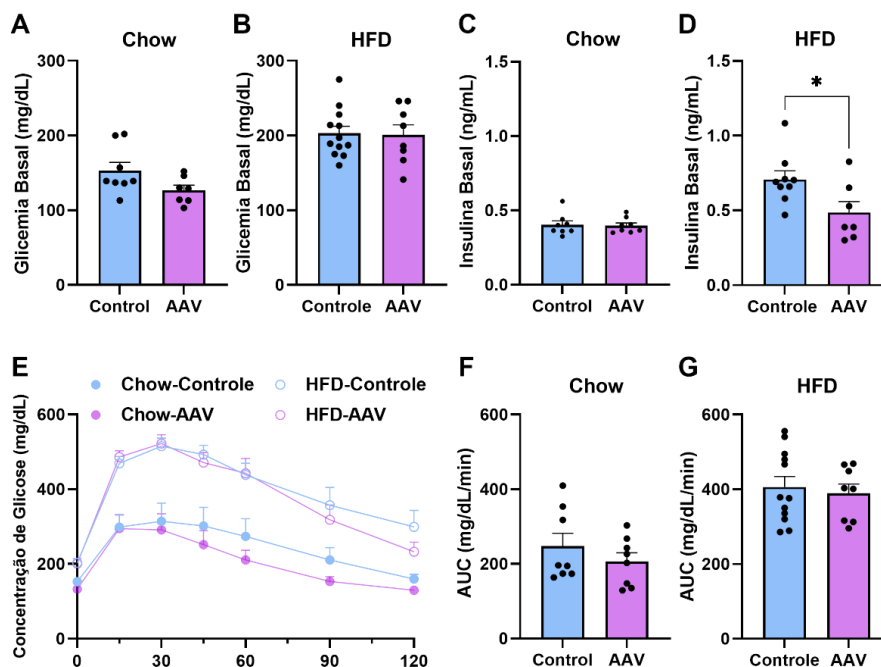


**Figura 7:** Composição corporal dos animais alimentados com dieta padrão (Chow) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Análise comparativa do peso antes e depois da inoculação do vírus nos animais alimentados com dieta padrão. ANOVA “two-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, (n=9). **B)** Análise comparativa do peso antes e depois da inoculação do vírus nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. ANOVA “two-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, (n=9). **C)** Massa magra (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **D)** Massa magra (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **E)** Gordura total (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p < 0,05$ , (n = 5). **F)** Gordura total (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p < 0,05$ , (n = 5). **G)** Análise da gordura retroperitoneal (Chow) através da ressonância magnética. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 8-9). **H)** Análise da gordura retroperitoneal (HFD) através da ressonância magnética. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p = 0,0854$  (n = 8-9). **I)** Análise da gordura perigonadal (Chow) através da ressonância magnética. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^{**} < 0,0016$  (n = 8-9). **J)** Análise da gordura perigonadal (HFD) através da ressonância magnética. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 8-9).

### 5.3 Perfil Glicêmico dos Animais

Após 5 semanas de tratamento foi realizado o GTT. Quando analisada a curva do GTT e a área sob a curva (AUC), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 8).

Também foram avaliadas as concentrações de glicemia e insulina basal. Quando analisada a glicemia dos animais, não foi possível observar diferenças significativas entre o tratamento. Mas, ao analisar a insulina, foi possível observar uma diferença significativa no grupo tratado alimentado com a dieta hiperlipídica, ( $p < 0,0180$ ) (Figura 8).

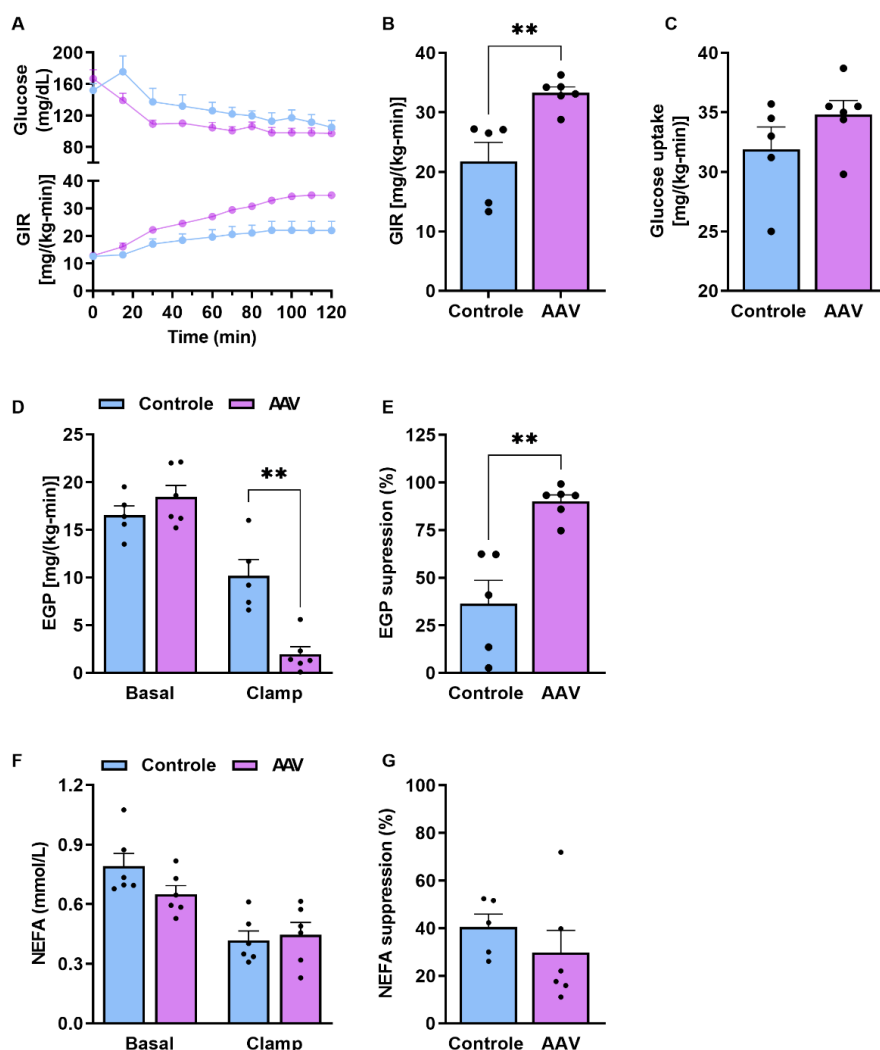


**Figura 8:** Análise do perfil glicêmico dos animais. **A)** Glicemia basal (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 7$ ). **B)** Glicemia basal (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 12$ ). **C)** Insulina basal (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 8$ ). **D)** Insulina basal (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^* < 0,05$  ( $n = 9$ ). **E)** Análise da curva de GTT. ANOVA “two-way”, sem valor de P considerativo, ( $n = 9$ ). **F)** Área sob a curva (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 8-12$ ). **G)** Área sob a curva (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 8-12$ ).

#### 5.4 Avaliação da Sensibilidade *in vivo* à Insulina

Para examinar os mecanismos fisiológicos pelos quais a superexpressão do ER $\alpha$  aumenta a sensibilidade à insulina *in vivo*, realizamos o *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico para avaliar a ação da insulina no fígado de camundongos tratados que foram alimentados com a dieta hiperlipídica. A superexpressão do ER $\alpha$  resultou em uma melhora acentuada na sensibilidade à insulina no fígado, conforme refletido por aumento na taxa de infusão de glicose em camundongos alimentados com HFD (Figura 9, B). Embora a produção endógena basal de glicose (EGP) tenha sido semelhante entre os grupos (Figura 9, D e E), a medição de EGP em condições hiperinsulinêmicas revelou

supressão acentuada de EGP em camundongos com a superexpressão do ER $\alpha$  em comparação com os controles, indicando aumento da sensibilidade hepática à insulina e proteção contra resistência à insulina hepática induzida por HFD. As concentrações plasmáticas basais de ácidos graxos foram semelhantes entre os grupos, e a capacidade da insulina de suprimir as concentrações plasmáticas de ácidos graxos durante o *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico também foram semelhantes (Figura 9, F e G), sugerindo que não há supressão de insulina da lipólise por TAB.

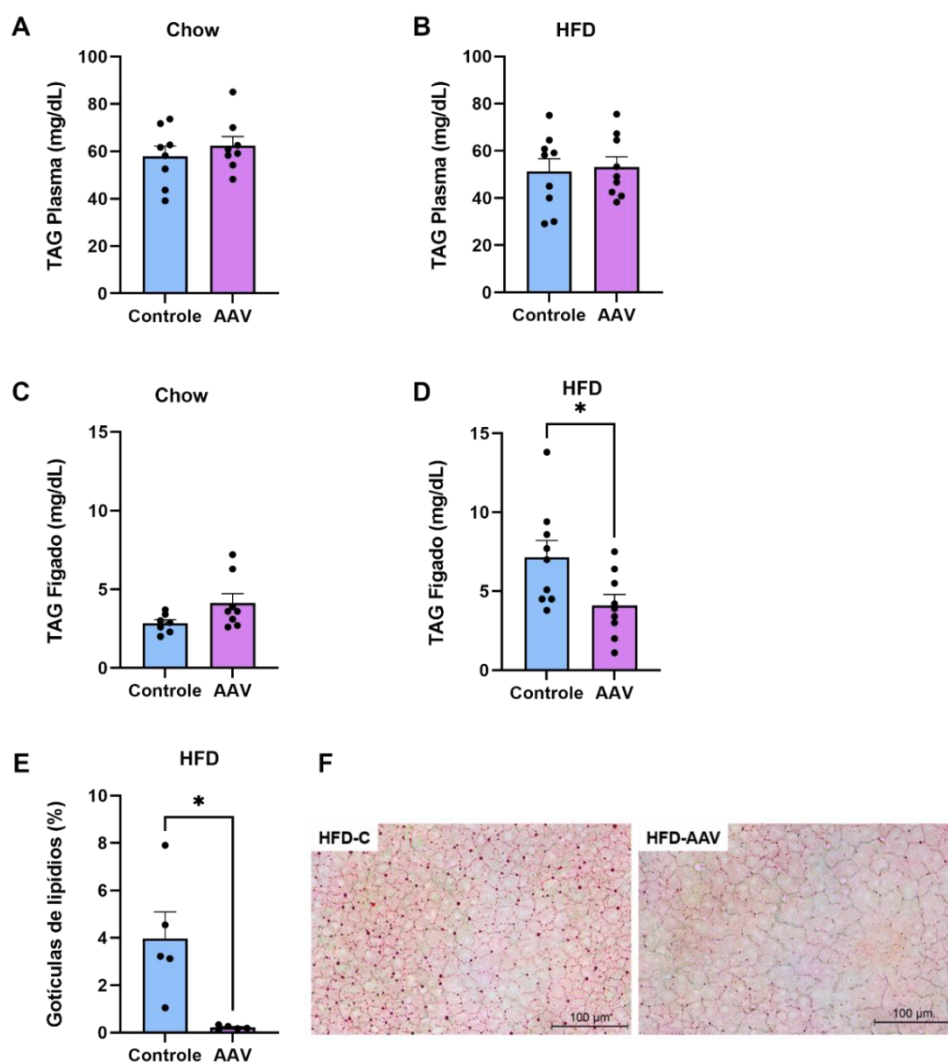


**Figura 9:** A superexpressão de ER $\alpha$  regula a sensibilidade à insulina. **A)** A curva da taxa de infusão de glicose (GIR) durante os últimos 40 minutos do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. **B)** A taxa de infusão de glicose (GIR) durante os últimos 40 minutos do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. **C)** Captação de glicose no corpo inteiro durante o clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. **D)** EGP basal. **E)** Supressão da produção endógena de glicose. **F)** Os ácidos graxos basais não esterificados (NEFAs) foram semelhantes entre os grupos. **F)** A supressão de NEFA estimulada por insulina durante o clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico semelhante entre os grupos. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-6).

### 5.5 Perfil Lipídico dos Animais

Os níveis de triglicerídeos no plasma dos animais, não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 10, A e B). Quando analisado o tecido hepático, os níveis de TAG evidenciaram diferenças significativas no grupo tratado com dieta hiperlipídica (Figura 10, D).

A análise feita por meio da coloração de ORO, corrobora com os achados no teste bioquímico, o tecido hepático dos animais que receberam o vírus (Figura 10, E) apresentaram uma menor porcentagem de gotículas de gordura, quando em comparação aos animais controle. A análise quantitativa mostrou uma redução de aproximadamente 95%, em comparação aos animais que receberam apenas a salina (Figura 10, F).



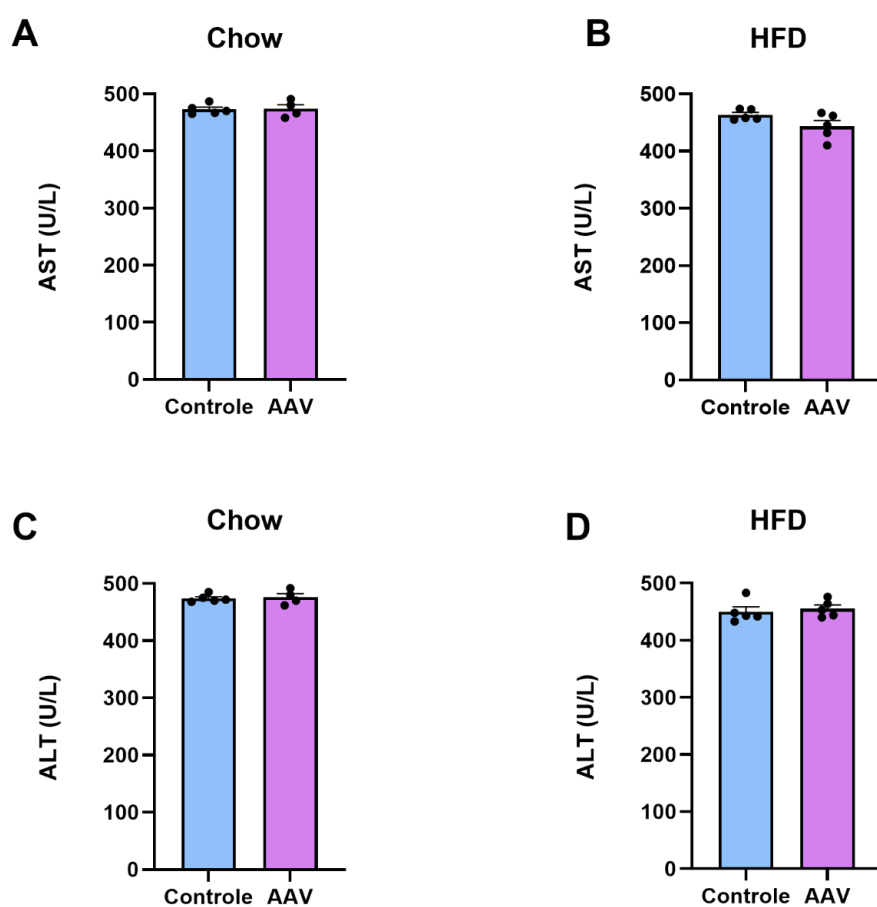
**Figura 10:** Dosagem quantitativa de TAG no fígado e plasma. **A)** Dosagem de triglicerídeos no plasma (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 8). **B)** Dosagem de triglicerídeos no plasma (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 8). **C)** Dosagem de triglicerídeos no fígado (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m.,

respectivamente. Test-t, (n = 8). **D)** Dosagem de triglicerídeos no fígado (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^* < 0,05$  (n = 8). **E)** Análise quantitativa de gotículas de lipídios, por Oil Red O. As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^* < 0,05$  (n = 5-6). **F)** Imagem representativa do fígado, corado por Oil Red O.

### 5.6 Determinação de AST e ALT séricos

As enzimas AST e a ALT estão presentes nas células do fígado (hepatócitos) e são liberadas no sangue em consequência de lesão hepática de naturezas diversas. A elevação dessas enzimas é a anormalidade mais comumente encontrada em rotina de testes hepáticos, tornando-se, por isso, marcador útil para diagnóstico e monitoramento das doenças do fígado.

A dosagem de enzimas hepáticas também foi feita para avaliar a função hepática, afim de verificar se era encontrado alguma toxicidade no fígado destes animais. Não houve nenhuma alteração significativa nas enzimas hepáticas AST e ALT, entre os grupos controle e vírus, nos animais tratados com dieta padrão, nem no grupo tratado com dieta hiperlipídica (Figura 11).

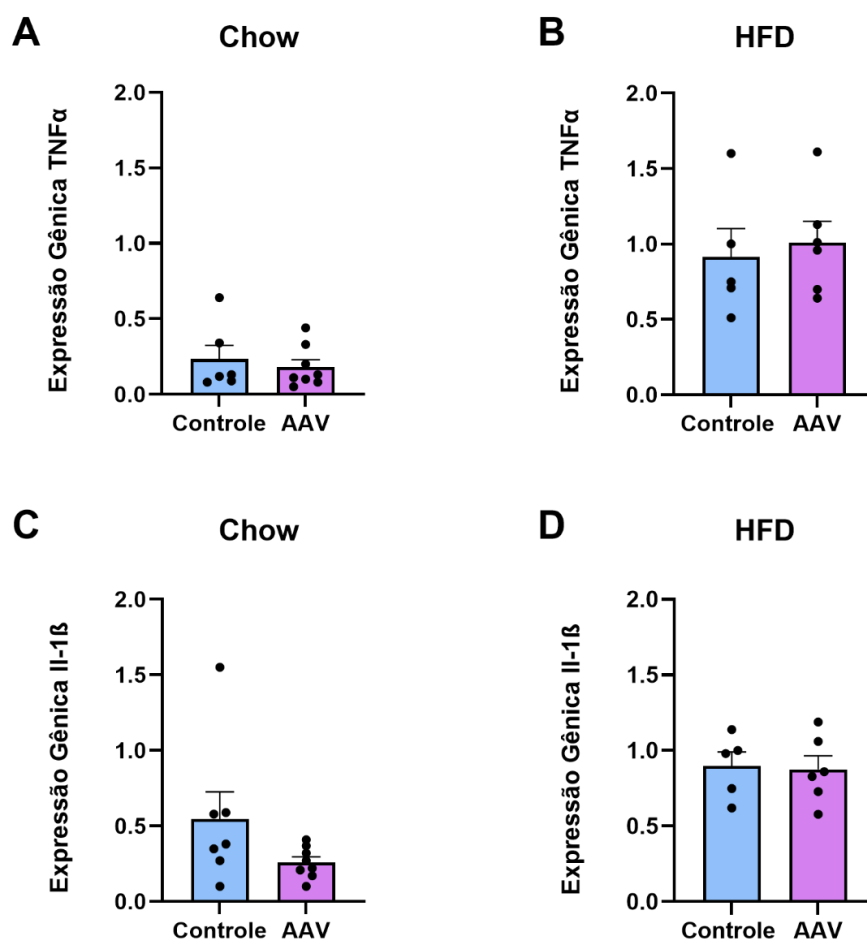


**Figura 11:** Análise de enzimas hepáticas em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** AST (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **B)** AST (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **C)** ALT (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **D)** ALT (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5).

### 5.7 Marcadores Inflamatórios

Para avaliar se o nosso tratamento ou dieta estava levando à uma inflamação, avaliamos alguns genes envolvidos nesse mecanismo. TNF- $\alpha$  e Il-1 $\beta$ , citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de inflamação.

A expressão gênica dessas citocinas não revelou diferença significativas entre o tratamento, em ambos os grupos (Figura 12), confirmando também através desta análise que o nosso modelo não apresenta inflamação.



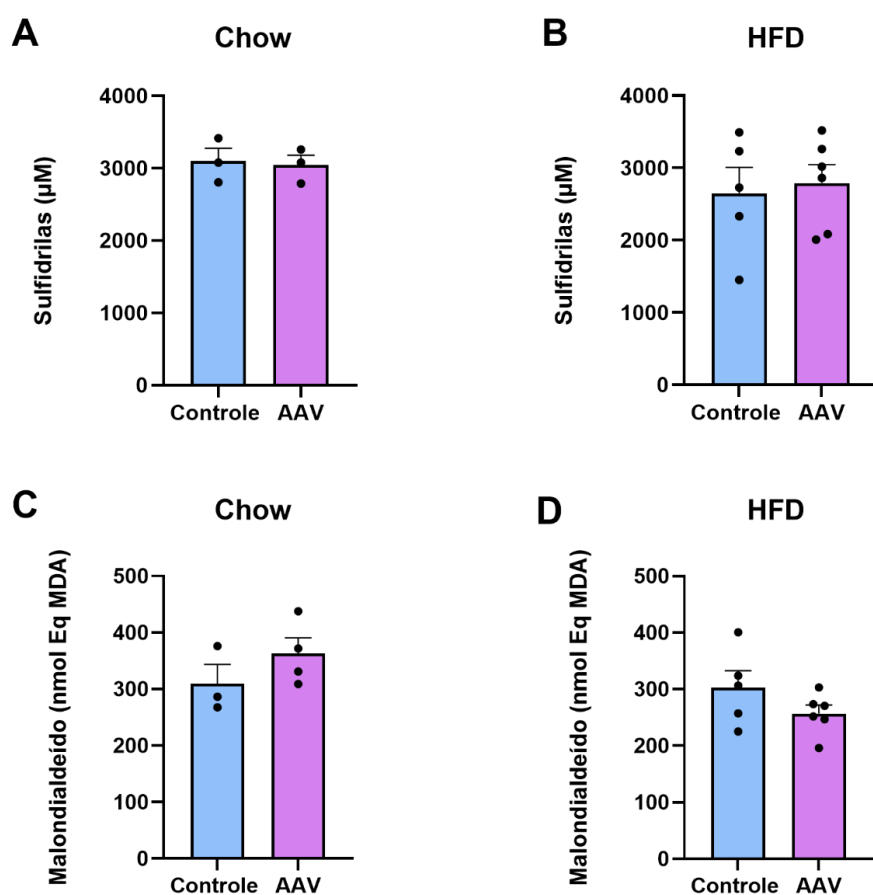
**Figura 12:** Análise de marcadores inflamatórios em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Expressão gênica de TNF- $\alpha$  (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-8). **B)** Expressão gênica de TNF- $\alpha$  (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-8). **C)** Expressão gênica de Il-1 $\beta$  (Chow). As colunas



representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-8). **D**) Expressão gênica de Il-1 $\beta$  (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-8).

### 5.8 Peroxidação Lipídica e Níveis Antioxidantes

Para investigar o estresse oxidativo dos animais, foram analisadas as concentrações de TBARS e a produção e determinação de SH. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas respectivas análises. Diante desses achados, pode-se concluir que sem alteração nos marcadores indiretos, não houve um estado de estresse oxidativo (Figura 13).

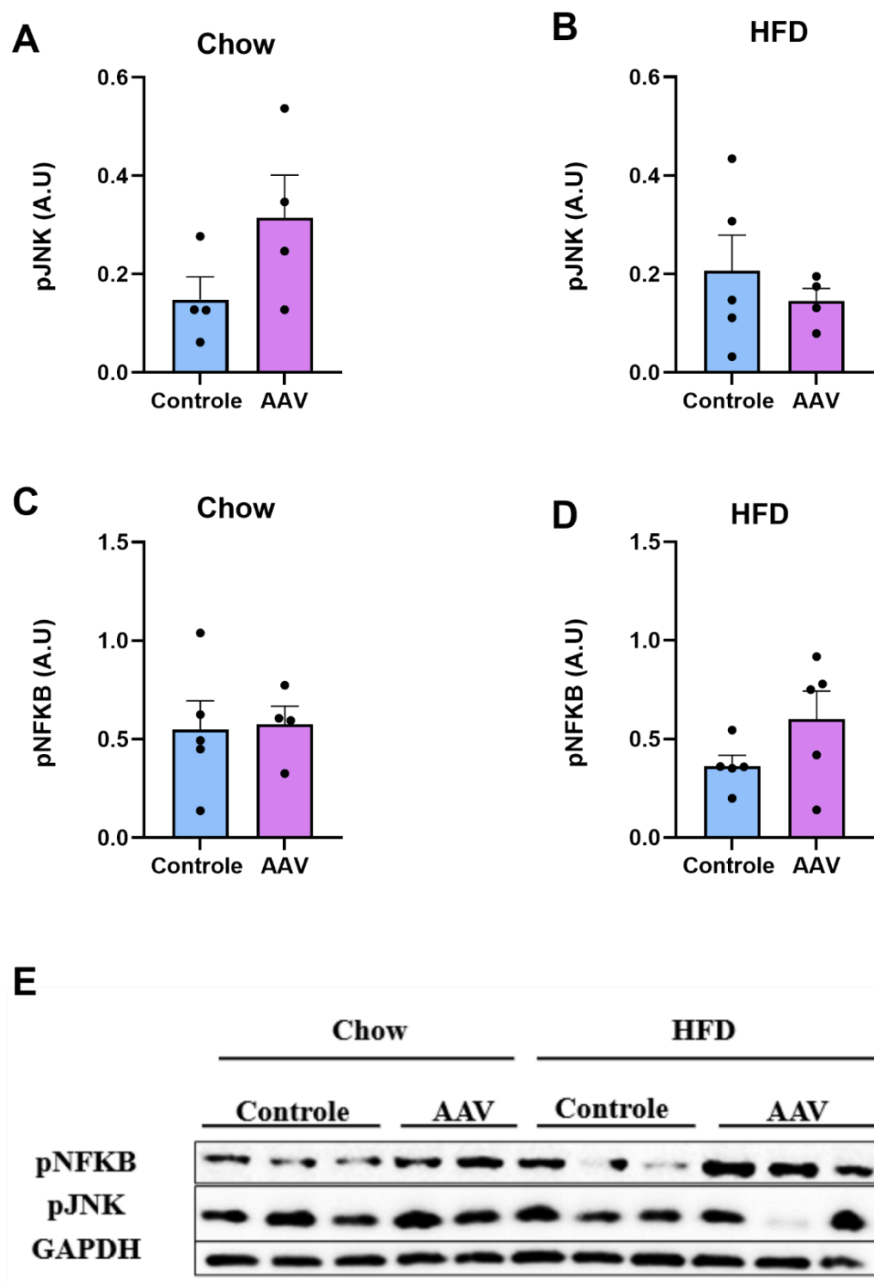


**Figura 13:** Avaliação de estresse oxidativo. **A**) Análise de grupos sulfidrilas (SH) (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 3). **B**) Análise de grupos sulfidrilas (SH) (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-6). **C**) Análise da concentração de TBARS (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 3-4). **D**) Análise da concentração de TBARS (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5-6).

### *5.9 Marcadores de Estresse do RE*

Como colocado na introdução descrita aqui, a via de estresse do RE está associada com a resistência à insulina. Analisamos então a atividade da fosfo-JNK e fosfo-NFKB nesses animais através do Western Blotting.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, tanto entre o tratamento quanto entre as dietas, confirmando assim que o nosso modelo experimental não apresenta estresse do RE como responsável pela resistência hepática à insulina (Figura 14).

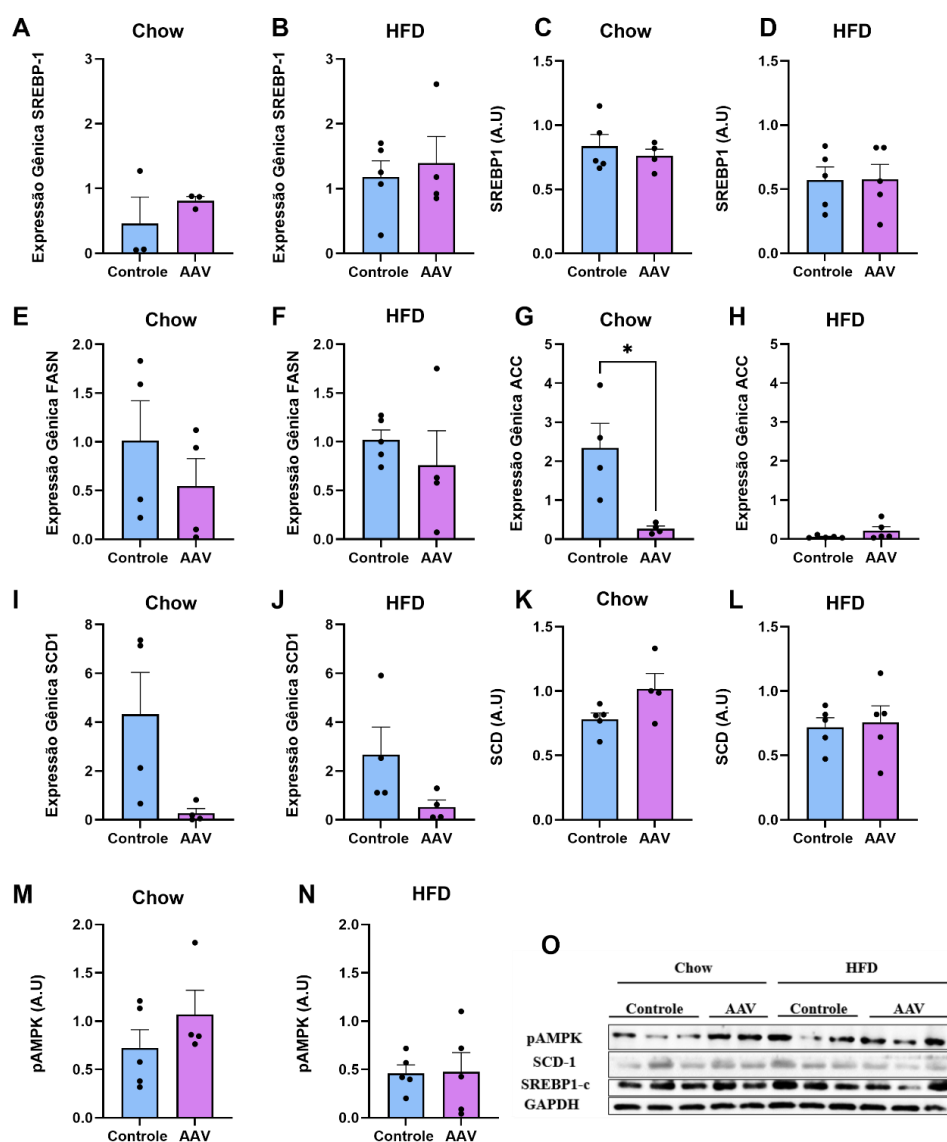


**Figura 14:** Análise dos marcadores de estresse do RE em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Análise quantitativa fosfo-JNK (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4). **B)** Análise quantitativa fosfo-JNK (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4-5). **C)** Análise quantitativa fosfo-NFkB (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4-5). **D)** Análise quantitativa fosfo-NFkB (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4-5). **E)** Análise qualitativa das proteínas fosfo-JNK e fosfo-NFkB.

### 5.10 Marcadores do Metabolismo Lipídico

De acordo com o que foi descrito em estudos anteriores e também na introdução deste trabalho, sabe-se que a resistência à insulina também pode ser desenvolvida a partir do acúmulo de lipídios ectópicos. Para visualizar melhor se esta via está influenciando na homeostase dos animais, foi avaliada a expressão gênica e proteica de marcadores envolvidos, como o SREBP1-C, ACC, SDC1, FASN e AMPK.

As análises, tanto gênicas quanto proteicas, não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. Mas quando analisado a expressão gênica de ACC nos animais alimentados com dieta padrão, é possível observar uma redução da expressão nos animais tratados. (Figura 15, G).



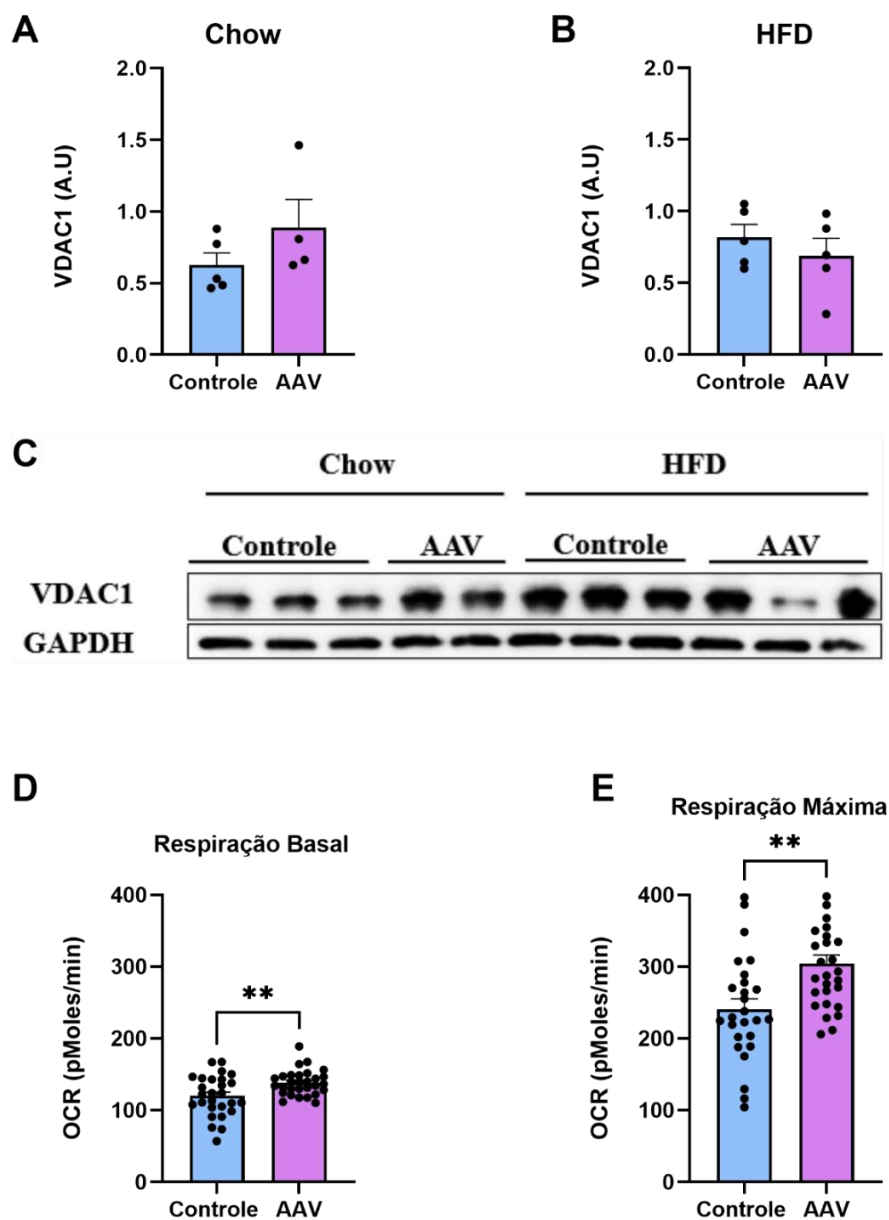
**Figura 15:** Análise dos marcadores do metabolismo lipídico em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Expressão gênica de SREBP1-C (Chow). As colunas representam

a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4). **B)** Expressão gênica de SREBP1-C (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **C)** Expressão proteica de SREBP1-C (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **D)** Expressão proteica de SREBP1-C (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **E)** Expressão gênica de FASN (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4-5). **F)** Expressão gênica de FASN (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **G)** Expressão gênica de ACC (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^* < 0,05$  (n = 3-5). **H)** Expressão gênica de ACC (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **I)** Expressão gênica de SCD1 (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **J)** Expressão gênica de SCD1 (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 4-5). **K)** Expressão proteica de SCD (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **L)** Expressão proteica de SCD (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **M)** Expressão proteica de fosfo-AMPK (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **N)** Expressão proteica de fosfo-AMPK (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **O)** Análise qualitativa das proteínas fosfo-AMPK, SCD1, SREBP1-c.

### *5.11 Marcadores da Dinâmica Mitocondrial*

Os processos como fusão, fissão, biogênese e mitofagia mitocondriais determinam a morfologia, a qualidade e a quantidade de mitocôndrias, elas são controladas em resposta à sinais estressores afim de garantir a adaptação da função mitocondrial às demandas celulares. Nesse contexto, avaliamos os Canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC), que é a proteína mais abundante na membrana mitocondrial externa (MME). Exercendo o controle da atividade através da regulação da troca de metabólitos, além de ter função crucial no mecanismo de apoptose. Na análise da proteína, não foi possível observar diferença significativa (Figura 16, A, B e C).

Avaliamos também o consumo de oxigênio em hepatócitos isolados e encontramos um aumento de aproximadamente 15% na frequência respiratória basal em hepatócitos isolados de camundongos tratados com o vetor viral (Figura 16, D). Seguido também por uma maior capacidade respiratória nos animais tratados, como observado na figura, um aumento de aproximadamente 26% (Figura 16, E).

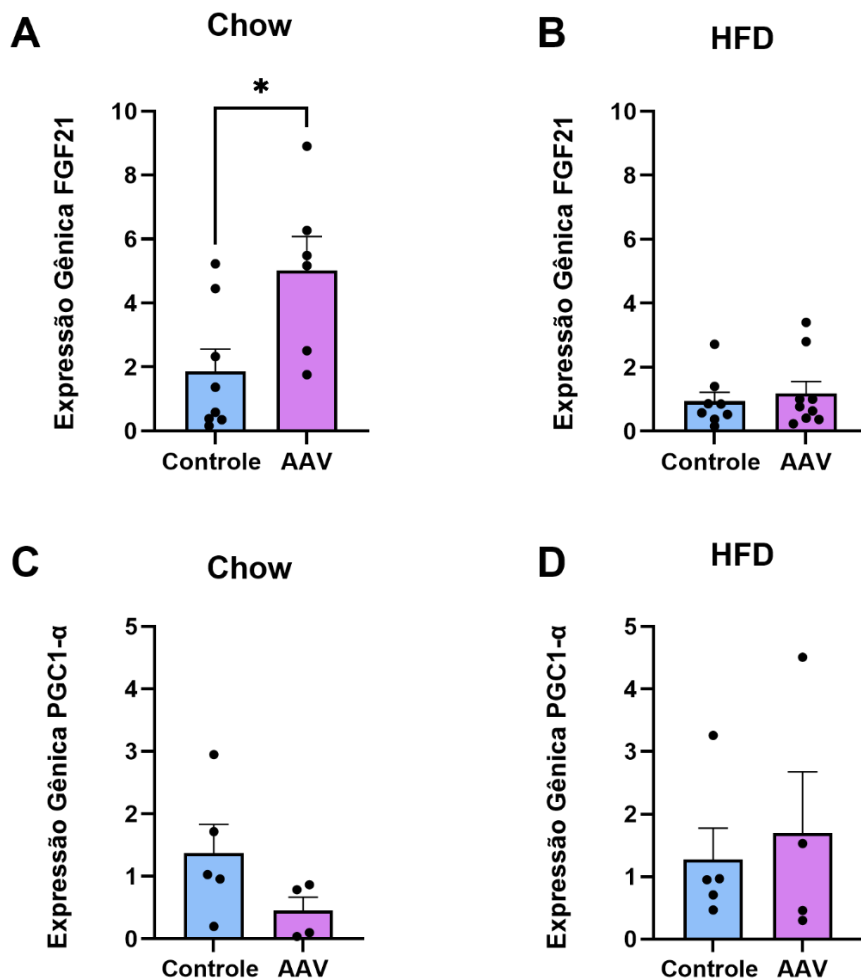


**Figura 16:** Análise da função mitocondrial em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Expressão proteica de VDAC1 (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **B)** Expressão proteica de VDAC1 (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, (n = 5). **C)** Análise qualitativa da proteína VDAC1. **D)** Consumo de O<sub>2</sub> basal em hepatócitos isolados. **E)** Consumo máximo de O<sub>2</sub> em hepatócitos isolados.

### 5.12 Marcadores do metabolismo energético

Além disso, também foram avaliados outros dois genes importantes, já bem descritos anteriormente, para o metabolismo lipídico e homeostase glicêmica. Avaliamos o Coativador-1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PGC-1 $\alpha$ ) e o Fator de Crescimento de Fibroblastos 21 (FGF21).

Quando analisado o FGF21, o grupo alimentado com dieta padrão que recebeu o tratamento apresentou um aumento na expressão gênica quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina (Figura 17, A). Não foi possível observar diferenças significativas no grupo alimentado com HFD (Figura 17, B). Não foi possível observar diferenças significativas nos grupos na análise gênica de PGC-1 $\alpha$  (Figura 17, C e D).



**Figura 17:** Análise dos marcadores de metabolismo energético em animais alimentados com dieta padrão (CHOW) e dieta hiperlipídica (HFD). **A)** Expressão gênica de FGF21 (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t,  $p^* < 0,05$  ( $n = 6-8$ ). **B)** Expressão gênica de FGF21 (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 9$ ). **C)** Expressão gênica de PGC1- $\alpha$  (Chow). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 5$ ). **D)** Expressão gênica de PGC1- $\alpha$  (HFD). As colunas representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test-t, ( $n = 5$ ).

Discussão



## 6. Discussão

A sinalização de estrogênio tem se mostrado importante para o controle metabólico, conforme evidências demonstradas ao longo dos anos (ROPERO, et al. 2008; KIM, et al. 2014; COYOY, et al. 2016). Levando em consideração o papel da sinalização hepática de estrogênio na limitação dos efeitos adversos da alimentação rica em gordura em mulheres, estudos apontam que a sinalização hepática de estrogênio também possa limitar esses efeitos em homens (HANDGRAAF, et al. 2013; KIM, et al. 2014; ZHU, et al. 2013). Nesta perspectiva, foi evidenciado que camundongos machos ER $\alpha$ -knockout no fígado (LKO) apresentaram resistência à insulina e prejudicaram a sinalização da insulina hepática, com aumento dos níveis de proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e TAG no fígado, diminuição da síntese hepática de glicogênio e aumento da produção hepática de glicose durante a hiperinsulinemia (ZHU, et al. 2014). Portanto Assim, esses resultados demonstram que a sinalização hepática do ER $\alpha$  é um mediador dos efeitos metabólicos protetores do estrogênio em homens.

Estudos anteriores mostram que a gordura corporal e a gordura visceral aumentam significativamente em mulheres na pós-menopausa, quando os níveis de produção do estrogênio estão reduzidos devido a diminuição do gasto energético (LOVEJOY, et al. 2008). Esses achados corroboram com nosso estudo, onde demonstramos que a superexpressão do ER $\alpha$  em animais alimentados com dieta padrão reduz a gordura total, retroperitoneal e perigonadal. Ainda, demonstramos que esses animais apresentam aumento no consumo de oxigênio em cultura de hepatócitos primários. Estudos anteriores mostraram que paralelamente à resistência à insulina em miócitos com expressão reduzida de ER $\alpha$ , houve uma redução acentuada na funcionalidade mitocondrial, incluindo taxas diminuídas de consumo de oxigênio (RIBAS, et al. 2016). É razoável concluir que esses defeitos combinatórios na função mitocondrial contribuíram para a inflamação tecidual e para a ação prejudicada da insulina no músculo esquelético, porque cada uma dessas características da disfunção mitocondrial demonstrou independentemente promover sinalização inflamatória e resistência à insulina (KIM, et al. 2008; TADDEO, et al. 2013; MARTIN, MCGEE. 2014). Sugerimos que no tecido hepático, pode ser pelo mesmo mecanismo, necessitando de mais estudos. Esses dados corroboram com evidências observadas por Camporez, et al (2013), onde camundongos OVX exibiram redução no consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>), produção de dióxido de carbono

(CO<sub>2</sub>) e gasto de energia corporal total, em comparação com camundongos que passaram por uma cirurgia placebo (SHAM) e OVX+E2, levando ao aumento do peso corporal associado ao aumento da massa gorda. Com isso, destacamos que a superexpressão do ER $\alpha$  especificamente no fígado, pode melhorar a composição corporal, e o aumento no consumo de oxigênio em hepatócitos pode levar à um balanço energético negativo.

Nesta perspectiva, o FGF21 é um hormônio ativado em resposta ao estresse, produzido principalmente pelo fígado e seu nível aumenta em condições metabólicas prejudicadas, como obesidade (ZHANG, et al. 2008) e esteatohepatite não alcóolica (BARB, et al. 2019). Assim, acredita-se que o aumento do FGF21 seja causado pelo acúmulo de gordura no fígado (LI, et al. 2010). Entretanto, atualmente, não se sabe ao certo como ocorre a sinalização intracelular do FGF21, uma vez que os mecanismos envolvidos nesse processo, ainda não foram completamente compreendidos. Estudos clínicos recentes com diferentes análogos do FGF21 têm mostrado seu potencial terapêutico na promoção da regulação metabólica, especialmente na redução dos níveis elevados de lipídios em pessoas com obesidade e condições metabólicas relacionadas (CHARLES, et al. 2019; TALUKDAR, et al. 2016).

O nosso estudo mostrou que os animais alimentados com dieta padrão apresentaram maior expressão gênica de FGF21. O FGF21 tem demonstrado reduzir o peso corporal e a quantidade de gordura em diversos modelos animais com resistência à insulina e obesidade (XU, et al. 2009; COSKUN, et al. 2008; BERGLUND, et al. 2009). Evidências demonstradas no presente trabalho corroboram com o estudo realizado por Camporez, et al. (2013) que mostrou redução na massa gorda em camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica após administração crônica de FGF21. Em conjunto aos dados já apresentados anteriormente, mostramos que a superexpressão do ER $\alpha$  pode aumentar a expressão gênica do FGF21, sendo importante regulador metabólico, podendo ser responsável pela melhora na composição corporal.

O acúmulo excessivo de gordura no fígado pode ser causado pelo aumento da produção e armazenamento do mesmo e pela redução da sua oxidação e exportação. Estudos mostraram que a prevalência de DHGNA é menor em mulheres na pré-menopausa em comparação com homens, mas aumenta significativamente em mulheres na pós-menopausa, excedendo a prevalência em homens (SUZUKI, ABDELMALEK. 2009). Estudos clínicos e experimentais sugeriram que os estrogênios podem ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da DHGNA (LONARDO, et al. 2006; ZHU, et al.

2013). No entanto, atualmente, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais baixos níveis de estrogênio contribuem para a doença hepática gordurosa. No presente estudo, demonstramos que a expressão gênica de ACC em animais alimentados com dieta padrão que receberam o tratamento é reduzida em aproximadamente 80%. Sabe-se que o estrogênio exerce efeitos protetores contra a esteatose hepática, já tendo sido demonstrado que camundongos OVX que recebem o tratamento com E2 têm os níveis de expressão de genes lipogênicos, como ACC, reduzidos consideravelmente (FU, et al. 2016). Dessa forma, evidenciamos que o estrogênio, via ER $\alpha$ , pode diminuir o acúmulo de lipídios no fígado através da inibição da expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios.

O acúmulo de lipídeos ectópicos está fortemente associado à resistência hepática à insulina. Em estudos com ratos e camundongos, foi observado que dietas ricas em gordura a curto prazo resultam em esteatose hepática e resistência hepática à insulina, sem acúmulo de lipídios nos músculos ou resistência periférica à insulina. Isso indica que o acúmulo de lipídios ectópicos no fígado está especificamente associado à resistência hepática à insulina e separa essa condição da obesidade e adiposidade visceral (SAMUEL, SHULMAN. 2016). Embora tenham sido sugeridos vários modelos para descrever como a resistência hepática à insulina se desenvolve (SAMUEL, SHULMAN. 2012) um vasto conjunto de trabalhos suporta que o acúmulo de DAG e aumento da ativação de PKC $\epsilon$  têm papel no comprometimento da ação hepática da insulina.

O presente estudo demonstrou que animais submetidos à uma alimentação rica em gordura, administrados com AVV hepático, apresentam diminuição no conteúdo de triglicerídeos hepático de ~40%, demonstrado por histologia hepática, em que é possível visualizar a redução das gotículas de gordura. Estudos anteriores mostraram que camundongos OVX com reposição de E2 reduziram significativamente os triglicerídeos hepáticos em comparação com os camundongos OVX e SHAM. Consequentemente, os camundongos OVX+E2 exibiram conteúdo DAG hepático e ativação de PKC $\epsilon$  reduzido (CAMPOREZ, et al. 2013). Outro estudo, avaliando o dimorfismo sexual entre camundongos fêmeas e machos de mesma idade, mostrou que as fêmeas são protegidas contra acúmulo de lipídios ectópicos induzidos por HFD, quando comparada aos machos. Mas quando os machos eram tratados com E2, apresentavam uma redução no acúmulo de lipídios ectópicos (CAMPOREZ, et al. 2019). Assim, os nossos achados fornecem mais evidências de que a superexpressão do ER $\alpha$  hepático pode atenuar o conteúdo de triglicerídeos no fígado. Sugerimos que essa melhora pode ser devido a redução do

acúmulo de DAG hepáticos e ativação da PKC $\epsilon$ , demonstrado por outros estudos (PETERSEN, et al. 2016; PETERSEN, SHULMAN. 2018). Além disso, há a possibilidade da redução de TAG através do aumento do consumo de oxigênio, demonstrado nesse estudo com a cultura de hepatócitos primários. Como este resultado foi obtido apenas de animais alimentados com dieta padrão, não podemos evidenciar que a redução de TAG hepático em animais alimentados com dieta hiperlipídica, tenha sido pelo mesmo mecanismo. Assim, são necessários mais estudos, com intuito de definir esses mecanismos.

Para examinar os mecanismos fisiológicos pelos quais a superexpressão do ER $\alpha$  aumenta a sensibilidade à insulina *in vivo*, realizamos *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico para avaliar a ação da insulina no fígado dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Estudos mostraram que durante o *clamp*, a taxa de infusão de glicose necessária para manter a euglicemia foi significativamente reduzida em camundongos OVX em comparação com camundongos tratados com SHAM e E2, demonstrando sensibilidade à insulina de corpo inteiro prejudicada em camundongos OVX (CAMPOREZ, et al. 2013). Dentro deste estudo, mostramos que os animais alimentados com dieta hiperlipídica administrados com o vírus, apresentaram uma maior taxa de infusão de glicose durante o *clamp*. Embora a EGP tenha sido semelhante entre os grupos, em condições hiperinsulinêmicas a medição de EGP revelou supressão acentuada em camundongos tratados em comparação com os controles, indicando aumento da sensibilidade hepática à insulina. Os nossos dados corroboram com os achados de Camporez, et al. (2013) que mostrou animais fêmeas pareados com peso corporal alimentados com HFD foram protegidas contra resistência à insulina de corpo inteiro, induzida por lipídeos em comparação com camundongos machos. É demonstrado que camundongos machos LKO desenvolveram resistência à insulina e prejudicaram a sinalização da insulina no fígado (ZHU, et al. 2014). Dessa forma, evidenciamos que a superexpressão do ER $\alpha$  em fígados de camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica, é eficaz para melhorar a sensibilidade hepática à insulina. Essa sensibilidade está associada à redução no conteúdo de triglicédeos hepático. Nesta perspectiva, esses resultados fornecem fortes evidências de que a sinalização hepática do ER $\alpha$  é responsável por alguns dos efeitos protetores metabólicos do estrogênio em camundongos, e que a superexpressão desse, contribui de maneira significativa para a redução de TAG e melhoria da resistência à insulina.

Conclusão

## 7. Conclusão

Portanto, mostramos que a superexpressão do ER $\alpha$  melhora a função mitocondrial, levando a um balanço energético negativo nos hepatócitos. Isso reduz o acúmulo de lipídios, protegendo os animais da esteatose hepática e resistência hepática à insulina. Além de aumentar a expressão de FGF21, responsável por melhorar a adiposidade dos animais. Assim sendo, acreditamos que o nosso estudo ajudará a ampliar o conhecimento dos mecanismos da sinalização do ER $\alpha$  e seus efeitos, fornecendo evidências que a sinalização hepática do ER $\alpha$  tem impacto benéfico no metabolismo energético do fígado e resistência hepática à insulina.

## Referências

- AGUIRRE, V., et al. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **J. Biol. Chem.** 2000.
- ANDERSON, N., BORLAK, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. **Pharmacol Rev.** 2008.
- BARB, D., et al. Plasma fibroblast growth factor 21 is associated with severity of nonalcoholic steatohepatitis in patients with obesity and type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 2019.
- BEDINGER, D.H., ADAMS, S.H. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: a tissue-specific perspective for insulin receptor activators. **Mol Cell Endocrinol**, 2015.
- BEFROY, D.E., et al. Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients, **Diabetes.** 2007.
- BERGLUND, E.D., et al. growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. **Endocrinology.** 2009.
- BIRD, T.G., et al. TGF $\beta$  inhibition restores a regenerative response in acute liver injury by suppressing paracrine senescence. **Sci. Transl. Med.** 2018.
- BIRKENFELD, A.L., SHULMAN, G.I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology.** 2014.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.** 1959.
- BLUEMEL, S., et al. Tumor necrosis factor alpha receptor 1 deficiency in hepatocytes does not protect from non-alcoholic steatohepatitis, but attenuates insulin resistance in mice. **World J Gastroenterol.** 2020.
- CAI, D., et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B. **Nat. Med.** 2005.
- CAMPOREZ, J.P., et al. Anti-inflammatory effects of oestrogen mediate the sexual dimorphic response to lipid-induced insulin resistance. **J Physiol.** 2019.
- CAMPOREZ, J.P., et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. **Endocrinology.** 2013.
- CAMPOREZ, J.P., et al. Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. **Endocrinology.** 2013.
- CAMPOREZ, J.P., et al. Mechanism by which arylamine *N*-acetyltransferase 1 ablation causes insulin resistance in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2017.
- CAMPOREZ, J.P.G, et al. ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. **J Lipid Res.** 2015.
- CHAN, S.J., STEINER, D.F. Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. **Am Zool**, 2000.

- CHARLES, E.D., et al. Pegbelfermin (BMS-986036), PEGylated FGF21, in patients with obesity and type 2 diabetes: results from a randomized phase 2 study. **Obesity (Silver Spring)**. 2019.
- COHEN, J.C., HORTON, J.D., HOBBS, H.H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**. 2011.
- COSKUN, T., et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. **Endocrinology**. 2008.
- COYOY, A., et al. Metabolism Regulation by Estrogens and Their Receptors in the Central Nervous System Before and After Menopause. **Horm Metab Res**. 2016.
- DAHLMAN-WRIGHT, K., et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. **Pharmacol Rev**. 2006.
- DILLIN, A. Profile of Kazutoshi Mori and Peter Walter, 2014 Lasker Basic Medical Research awardees: The unfolded protein response. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014.
- DUAN, D., et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. **J. Virol**. 1999.
- DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr Rev**, 1997.
- DUPONT, J., et al. Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. **Endocrinology**, 2001.
- FABBRINI, E., et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. **PNAS**. 2009.
- FAURE, P; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. 1995.
- FEINSTEIN, R., et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J. Biol. Chem**. 1993.
- FU, X., et al. Treatment with estrogen protects against ovariectomy-induced hepatic steatosis by increasing AQP7 expression. **Molecular Medicine Reports**. 2016.
- FUKUHARA, A., et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**. 2005.
- GRECO, D., et al. Gene expression in human NAFLD. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2008.
- GREGOR, M.F., HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**. 2011.
- GRUNDY, S.M. Metabolic syndrome pandemic. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2008.
- GUILLAUME, M., et al. Selective Liver Estrogen Receptor  $\alpha$  Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice. **Hepatol Commun**. 2019.



- HABER, E.P., CURI, R. CARVALHO, C.R.O., CARPINELLI, A.R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2001.
- HAMILTON, D.J., et al. Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. **Physiol Rep**. 2016.
- HAN, S.I., et al. Estrogen receptor ligands ameliorate fatty liver through a nonclassical estrogen receptor/Liver X receptor pathway in mice. **Hepatology**. 2013.
- HANDGRAAF, S., et al. Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ER $\alpha$  activation function-2 (ER $\alpha$ AF-2), whereas ER $\alpha$ AF-1 is dispensable. **Diabetes**. 2013.
- HEINE, P.A., et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000.
- HELDRING, N., et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**. 2007.
- HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**. 2010.
- HOTAMISLIGIL, G.S., et al. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. 1993.
- HOTAMISLIGIL, G.S., et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**. 1995.
- HUMMASTI, S., HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. **Circ Res**. 2010.
- JANKAUSKAS, S.S., et al. Heart failure in diabetes, **Metabolism**. 2021.
- JELENIK, T., RODEN, M. Mitochondrial Plasticity in Obesity and Diabetes Mellitus. **Antioxidants & redox signaling**. 2013.
- JENSEN, H.L. Some Introductory Remarks on the Coryneform Bacteria, **Journal of Applied Bacteriology**, 1966.
- JIA, M. et al. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2015.
- JIANG, W., et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. **Sci Rep**. 2015.
- JONES, M.E., et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000.
- JURCZAK, M.J., et al. Dissociation of inositol-requiring enzyme (IRE1 $\alpha$ )-mediated c-Jun N-terminal kinase activation from hepatic insulin resistance in conditional X-box-binding protein-1 (XBP1) knock-out mice. **J Biol Chem**. 2012.
- KAHN, S.E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetology**, 2003.
- KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. **J Clin Invest**, 2006.

KASUGA, M., ZICK, Y., BLITHE, D., et al. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, 1982.

KERN, P.A., et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J Clin Invest**. 1995.

KIM, J.A., et al. WEI, Y., SOWERS, J.R. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. **Circ Res**. 2008.

KIM, J.H., et al. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocr J**. 2014.

KIM, J.H., et al. Tissue-selective estrogen complexes with bazedoxifene prevent metabolic dysfunction in female mice. **Mol Metab**. 2014.

KIOURTIS, C., et al. Specificity and off-target effects of AAV8-TBG viral vectors for the manipulation of hepatocellular gene expression in mice. **Biol Open**. 2021.

KIRPICH, I.A., MARSANO, L.S., MCCLAIN, C.J. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Biochem**. 2015.

KUIPER, G.G., et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996.

KUMASHIRO, N., et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011.

LAPENNA, D; et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. **Free Rad Biol Med**. 2001.

LEBAUPIN, C., et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**. 2018.

LEWIS, G.F., BRUBAKER, P.L. The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. **J Clin Invest**. 2021.

LI, H., et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. **Journal of Hepatology**. 2010.

LILLIOJA, S., et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. **N Engl J Med**, 1993.

LIVAK, K. J., SCHMITTIGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C</sup> (T) method. **Methods**, 2001.

LONARDO, A., et al. Endocrine NAFLD a hormonocentric perspective of nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. **J Hepatol**. 2006.

LOUET, J.F., et al. Antidiabetic actions of estrogen: Insight from human and genetic mouse models. **Curr Atheroscler Rep**, 2004.

LOVEJOY, J.C; et al. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes (Lond)**. 2008.

- MARCHESINI, G., et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **Am J Med**, 1999.
- MARCHESINI, G., et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**. 2001.
- MARGOLIS, K.L., et al. Women's Health Initiative Investigators. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. **Diabetology**. 2004.
- MARTIN, S.D., MCGEE, S.L. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**. 2014.
- MAZZOCCANTE, R.P., DE MORAES, J.F.V.N., CAMPBELL, C.S.G. Direct public spending on obesity and associated diseases in Brazil. **Rev. Ciênc. Méd.** 2012.
- MENKE, A., CASAGRANDE, S., GEISS, L., COWIE, C.C. Relevance of and trends in diabetes among adults in the United States, 1988–2012. **JAMA**, 2015.
- MILLER, D.G., et al. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. **Nat. Genet**. 2004.
- MISU, H., et al. Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. **Diabetology**. 2007.
- MITCHELL, T., et al. Convergent mechanisms for dysregulation of mitochondrial quality control in metabolic disease: implications for mitochondrial therapeutics. **Biochem Soc Trans**. 2013.
- NUUTILA, P., et al. Gender and insulin sensitivity in the heart and in skeletal muscles. Studies using positron emission tomography. **Diabetes**. 1995.
- OYADOMARI, S., et al. Dephosphorylation of translation initiation factor 2 $\alpha$  enhances glucose tolerance and attenuates hepatic steatosis in mice. **Cell Metab**. 2008.
- OZCAN, U., et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**. 2004.
- PERSEGHIN, G., et al. Insulin resistance/hyperinsulinemia and cancer mortality: the Cremona study at the 15th year of follow-up. **Acta Diabetol**, 2012.
- PETERSEN, K.F., et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. **J Clin Invest**, 2002.
- PETERSEN, K.F., et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. **Science**. 2003.
- PETERSEN, M.C., et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. **J Clin Invest**. 2016.
- PETERSEN, M.C., SHULMAN, G.I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**. 2018.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, 2001.
- RABINOWITZ, J., et al. Adeno-associated Virus (AAV) versus immune response. **Viruses**. 2019.

- RIBAS, V. et al. Skeletal muscle action of estrogen receptor  $\alpha$  is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. **Science Translational Medicine**. 2016.
- ROGERS, G.L., et al. Innate immune responses to AAV vectors. **Front. Microbiol**. 2011.
- ROMEO, S., et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Genet**. 2008.
- ROPERO, A.B., et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**. 2008.
- SAMUEL, V.T., PETERSEN, K.F., SHULMAN, G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **Lancet**. 2010.
- SAMUEL, V.T., SHULMAN, G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**. 2012.
- SAMUEL, V.T., SHULMAN, G.I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**. 2016.
- SCHERER, P.E., et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J. Biol. Chem**. 1995.
- SCHWARTZ, S.S., et al. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. **Trends Endocrinol Metab**, 2017.
- SHOELSON, S.E., et al. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**. 2006.
- SIDDLE, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. **JMol Endocrinol**, 2011.
- SIVITZ, W.I., YOREK, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities, **AntioXidants RedoX Signal**. 2010.
- STEPPAN, C.M., et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**. 2001.
- STUMP, C.S., et al. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**. 2003.
- SUZUKI, A., ABDELMALEK, M.F. Nonalcoholic fatty liver disease in women. **Womens Health (Lond Engl)**. 2009.
- TADDEO, E.P., et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle. **Mol Metab**. 2013.
- TAKAMURA, T., et al. Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. **Obesity (Silver Spring)**. 2008.
- TALUKDAR, S., et al. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. **Cell Metab**. 2016.
- TOBARI, M., HASHIMOTO, E. Characteristic Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Japan with a Focus on the Roles of Age, Sex and Body Mass Index. **Gut Liver**. 2020.

- UYSAL, K.T., et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. **Nature**. 1997.
- WALTER, P., RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**. 2011.
- WARRAM, J.H., et al. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. **Ann Intern Med**, 1990.
- WINN, N.C., et al. Estrogen receptor- $\alpha$  signaling maintains immunometabolic function in males and is obligatory for exercise-induced amelioration of nonalcoholic fatty liver. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2019.
- WU, Q., BROWN, M.R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. **Annu Rev Entomol**, 2006.
- XU, J., et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. **Diabetes**. 2009.
- YUAN, M., et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of *Ikk*  $\beta$ . **Science**. 2001.
- ZHANG, X., et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. **Diabetes**. 2008.
- ZHANG, Y., et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. 1994.
- ZHU, L., et al. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2014.
- ZHU, L., et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. **Diabetes**. 2013.
- ZIMMET, P., ALBERTI, K.G.M.M., SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, 2001.
- ZINCARELLI, C., et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. **Mol. Ther**. 2008.