

**BRUNA LEÔNCIO BARBOSA**

**Redução da produção de H<sub>2</sub>S no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.**

São Paulo  
2019

## RESUMO

Barbosa, BL. Redução da produção de H<sub>2</sub>S no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. 2019. 85 p. Dissertação de mestrado em Ciências – Fisiologia Humana – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é uma molécula gasosa sinalizadora que atua sobre processos fisiológicos e fisiopatológicos, promovendo a sulfidração de moléculas celulares como a Keap 1. É sintetizado principalmente pelas enzimas cistationina-gama-liase (CSE) e cistationina beta-sintase (CBS), ambas dependentes do co-fator 5'-fosfato de pirodoxal, e que utilizam o L-cisteína como substrato. Essas enzimas estão presentes em vários tecidos incluindo o fígado. O camundongo CBSKO apresenta fenótipo de homocistinúria, ou seja, além da homocisteinemia apresenta estresse oxidativo, fibrose e esteatose hepática. Ademais, há estudos *in vitro* sugerindo um papel desse gás reduzindo a captação de glicose hepática. A hipótese dessa dissertação é que a ingestão de dieta hiperlipídica (DHL) modifica a produção de H<sub>2</sub>S no fígado de camundongos e que isso seja um evento precoce a instalação do fígado gorduroso ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Para isso, foram usados camundongos C57Bl6 alimentados com dieta hiperlipídica por 5 períodos diferentes (10, 20, 40, 60 e 80 dias de dieta) e avaliados a evolução ponderal, os consumos alimentar e calórico diários, a tolerância à glicose e à insulina (GTT, ITT e Kitt), nos animais vivos. Nos fragmentos hepáticos retirados após a eutanásia foram avaliados a produção de H<sub>2</sub>S, a morfohistologia com corantes HE e *picrocirius red*, as expressões proteica e gênica das enzimas CBS e CSE, a quantificação do conteúdo de triglicérides, a detecção de F4/80 e as atividades de enzimas antioxidantes (catalase, GPx e arginase). A massa corporal foi aumentada a partir de 20 dias de DHL acompanhada de intolerância/resistência à insulina, no entanto, aos 10 dias da dieta já havia intolerância à glicose. Aos 40 dias de DHL foi detectado redução da produção de H<sub>2</sub>S e início da presença de vesículas intracelulares

nos hepatócitos, correspondendo a cerca de 5% dos hepatócitos com esteatose. No entanto, não houve relação clara entre expressão proteica ou gênica das enzimas CBS e CSE com a produção do gás. Aos 60 dias de DHL houve esteatose em 20% dos hepatócitos. Aos 80 dias da dieta, além da esteatose em cerca de 25% dos hepatócitos, foram detectados sinais de inflamação através da detecção do marcador inflamatório F4/80 por imunohistoquímica, aumento de deposição de colágeno nos espaços vasculares e aumento da atividade da ALT sanguínea, caracterizando um quadro de transição inicial de esteatose para esteato-hepatite induzida pela DHL. Assim, concluímos que a produção hepática de H<sub>2</sub>S foi reduzida antes da instalação do fígado gorduroso induzido pela DHL a despeito da ausência de modificação na expressão proteica das enzimas CBS e CSE.

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

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

## ABSTRACT

Barbosa, BL. Reduction in H<sub>2</sub>S production in the livers of mice fed a hyperlipidic diet. 2019. 75 p. Master of Science Dissertation – Human Physiology – Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

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

F4/80 detection indicating the presence of inflammatory infiltrates, increased collagen fiber detection in the vascular spaces, and increased serum ALT activity. There was a ~50% reduction in H<sub>2</sub>S production in the liver samples from animals fed a HFD for 40 days; however, there was no clear relationship with the alterations detected in CBS and CSE gene or protein expression. Based on the results, the development of fatty liver occurs later in the DIO mice. Additionally, the spectrum of the developed NAFLD presented incipient steatohepatitis characteristics. The reduction in H<sub>2</sub>S gas production appeared after the installation of insulin resistance, but prior to the establishment of NAFLD. Therefore, we conclude that alterations in hepatic H<sub>2</sub>S production is an early event associated with the onset of NAFLD, and it may play a role in the progression from simple steatosis to NASH, considering its described effect upon the antioxidant system mediated by the Keap-1/Nrf2 pathway.

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



## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

*clamp* os autores demonstraram aumento da corrente iônica do canal  $K_{ATP}$  com a presença do gás.

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

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

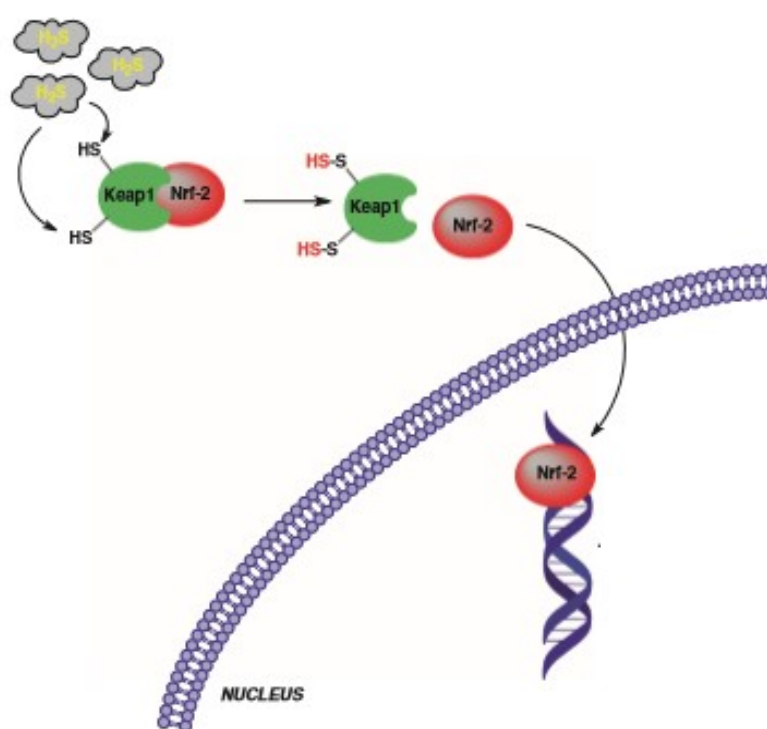
O  $H_2S$  atua induzindo a sulfidração de moléculas. Sulfidração é um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) de cisteína para persulfetos (-SSH) (FILIPOVIC, 2015; MUSTAFA et al., 2009). Um alvo bem estabelecido cuja ação é regulada por sulfidração é o fator de transcrição chamado Keap1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

A sulfidração da proteína Keap 1 interfere com sua interação com outra proteína, o Nrf-2 (fator nuclear 2 relacionado ao eritroide). Quando não sulfidrado o Keap 1 se associa ao Nrf2 e o direciona para a via de degradação



do complexo ubiquitina/ligases. Assim, quando há sulfidração da Keap 1 há dissociação do complexo Keap 1/Nrf2 permitindo que o Nrf2 transfira do citoplasma para o núcleo celular. No núcleo, o Nrf2 se associa ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ativando a transcrição de vários genes de defesa antioxidante (CALVERT et al., 2009; FILIPOVIC, 2015) (Figura 1).

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



A sulfidração de cisteínas da proteína Keap1 não permite sua interação com Nrf2 provocando a dissociação e translocação desse para o núcleo. No núcleo, ele se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) causando a transcrição de vários genes de defesa antioxidante (FILIPOVIC MILOS, 2015).

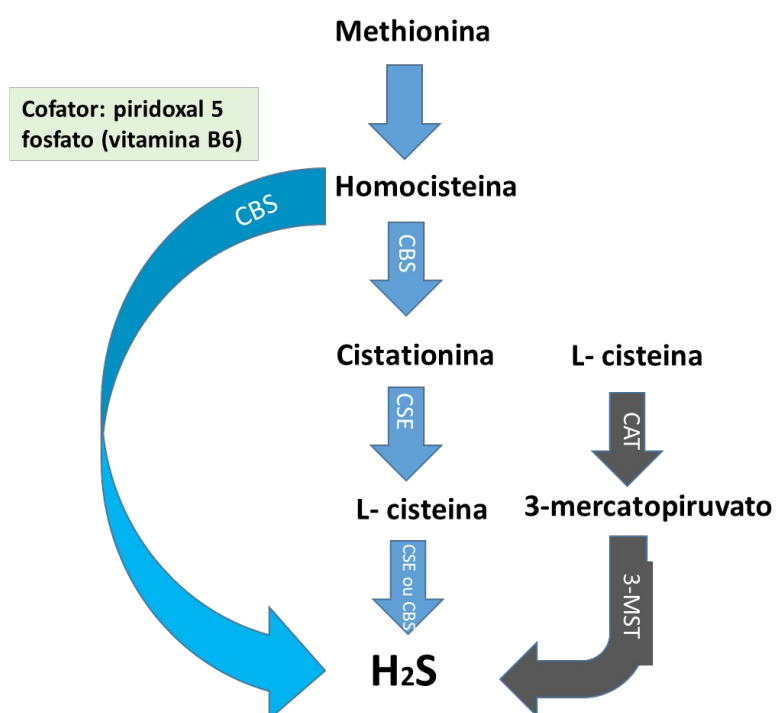
Os precursores do  $H_2S$  são L-cisteína e homocisteína. O primeiro é um aminoácido não essencial que pode ser obtido pela dieta ou sintetizado a partir de metionina. O segundo é um aminoácido sulfidrílico produzido como intermediário durante a metabolização da metionina. A L-cisteína também pode ser resultante da metabolização de homocisteína. Tanto metionina quanto L-

cisteína estão presentes em ovos, carnes, produtos lácteos e cereais integrais (HINE; MITCHELL, 2014).

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

A via não enzimática acontece nos eritrócitos. A quantidade gerada por essa via corresponde uma parcela muito pequena do total de H<sub>2</sub>S produzido (SEARCY et al., 1998).

**Figura 2: Biossíntese de H<sub>2</sub>S em células de mamíferos.**



Principais vias para síntese de H<sub>2</sub>S. L-cisteína é o principal substrato para geração de sulfeto de hidrogênio a partir da ação das enzimas CBS, CSE e a via CAT/3MST neste processo.

A metabolização desse gás acontece de várias maneiras, sendo as mais importantes as que ocorrem na mitocôndria e no citosol. Na mitocôndria a via de oxidação do tiosulfato a sulfito e posteriormente a sulfato por ação da enzima sulfito oxidase (KIMURA, 2012) e no citosol o H<sub>2</sub>S pode sofrer metilação pela tiol-S-metiltransferase, originando metanotiol e dimetilsulfeto. Em seguida, os metabólitos do H<sub>2</sub>S são excretados principalmente pelos rins (FURNE et al., 2001). Assim, a manutenção de H<sub>2</sub>S dentro de valores fisiológicos envolve vários processos. Além da oxidação e metilação há *scavenging* pela meta-hemoglobina e pela expiração (revisado por MANI et al., 2014).

O excesso de H<sub>2</sub>S causa toxicidade e esse efeito envolve sua capacidade em bloquear a enzima citocromo C oxidase, inibindo a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e conseqüentemente, prejudicando o metabolismo energético (DORMAN et al., 2002; KHAN et al., 1990).

O fígado é um órgão importante tanto para a síntese quanto para a remoção do H<sub>2</sub>S. Ambas as enzimas, CBS e CSE, estão presentes nesse órgão. Pessoas com deficiência de CBS apresentam a homocistinúria. Doença de base genética relacionada ao metabolismo de aminoácidos. O camundongo *knockout* para CBS (CBSKO) apresenta fenótipo semelhante às pessoas com homocistinúria, ou seja, além da homocisteinemia, estresse oxidativo, fibrose e esteatose hepática (ROBERT et al., 2005; WATANABE et al., 1995).

Ademais, há estudos *in vitro* sugerindo um papel desse gás reduzindo a captação de glicose hepática via inativação de AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) e glicoquinase, bem como interferindo com a produção hepática de glicose através de inibição da AKT e ativação da PEPCK (revisado por MANI et al., 2014). Por outro lado, há basicamente um estudo mostrando o papel do H<sub>2</sub>S sobre o metabolismo hepático lipídico. Os autores

demonstraram em camundongos CBSKO reduzida beta-oxidação e secreção de VLDL-colesterol e presença de esteatose (ENOKIDO et al., 2004).

A esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) é a manifestação hepática da síndrome metabólica, caracterizada pelo acúmulo de triglicérides em mais de 5% de hepatócitos na ausência de uso excessivo de álcool (JIN; VOS, 2015). Essa doença tem um espectro que varia de simples acúmulo de gordura intracelular, denominada esteatose, até condição inflamatória, denominada esteato-hepatite (EHNA ou NASH) podendo evoluir para presença de fibrose a cirrose, que por fim levará a disfunção grave do fígado.

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

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

Uma consequência importante da ativação da via pro-inflamatória é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS) que

levam ao estresse oxidativo e nitrosativo, respectivamente, causando danos celulares (LEFRANC et al., 2018; RAHAL et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produtos normais do metabolismo oxidativo, da bioenergética mitocondrial e da função do sistema imunológico. Isso é um processo fisiológico que ocorre após as refeições pelo aumento da glicose sanguínea, porém é equilibrado pela defesa antioxidante. No entanto, pacientes diabéticos e pré-diabéticos são mais susceptíveis a estresse oxidativo pós-prandial devido ao prolongado período de exposição a hiperglicemia (TUCKER; FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2008). As formas de ROS mais frequentes são ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de lipídios, que estão envolvidos no desenvolvimento, morte e diferenciação celular. As RNS são óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). Ambas as espécies reativas podem se ligar a ácidos nucleicos, enzimas, lipídios de membrana e proteínas, promovendo alterações nos processos fisiológicos celulares (GRAVES, 2012; RAJENDRAN et al., 2014; ROLEIRA et al., 2015).

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

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

A resistência à insulina é um componente central da síndrome metabólica, que por sua vez, é um importante mecanismo fisiopatológico do DM2

(GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HARCOURT; PENFOLD; FORBES, 2013).

Ocorre nos principais tecidos alvos da ação metabólica da insulina como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. No fígado, tem um papel importante na hiperglicemia de jejum. A elevada concentração de glicose sanguínea estimula as células  $\beta$  pancreáticas a uma secreção aumentada de insulina, resultando em hiperinsulinemia associada a concomitante intolerância à glicose e/ou hiperglicemia. A manutenção desse estado pode levar a uma insuficiência relativa na produção e secreção de insulina e, conseqüentemente a instalação do DM tipo 2. Assim, pode-se dizer que a resistência à insulina (RI) hepática é um estado pré-diabético (SAH et al., 2016).

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

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas associadas ou não a doenças cardiovasculares. Define-se obesidade como aumento da massa corporal às custas de aumento da massa gorda. Em humanos adultos são utilizados o índice de massa corporal, IMC, e a circunferências da cintura para avaliação do estado nutricional. O IMC é analisado conforme a classificação definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS): < 18,5 corresponde a baixo peso; valores entre 18,5 e menor do que 25 correspondem a peso adequado; valores entre 25 e menor do que 30 correspondem a sobrepeso e valores iguais ou maiores do que 30 kg/m<sup>2</sup> correspondem à obesidade.(LEFRANC et al., 2018).

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

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

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

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

humanos, inicialmente com hiperinsulinemia e com o decorrer do tempo com hipoinsulinemia relativa (TURNER et al., 2013).

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

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

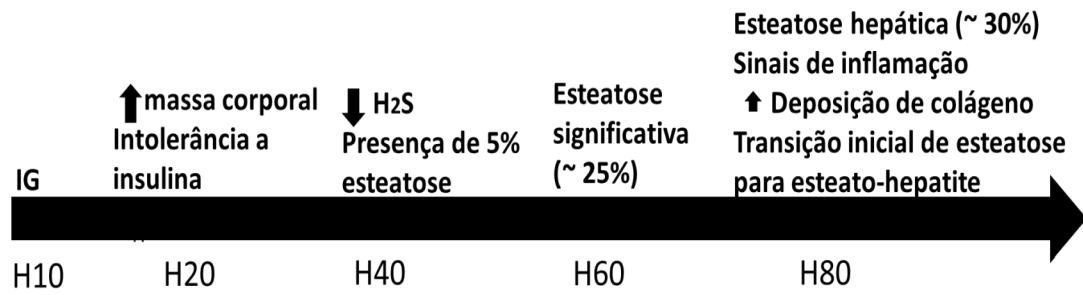


## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo confirmaram nossa hipótese, ou seja, há redução da produção hepática de H<sub>2</sub>S prévia a instalação da DGHNA induzida pela DHL. Além disso, confirmaram que a DHL induz aumento da massa corporal, aumento da glicemia basal e intolerância à glicose (IG) precoce, seguida da instalação da intolerância ou resistência à insulina e constitui um modelo de transição inicial de esteatose para esteato-hepatite com presença do marcador de ativação dos macrófagos, F4-80, e início do aumento da deposição de fibras colágenas nos espaços portais.

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

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





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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FILIPOVIC, M. R. Persulfidation (S-sulfhydration) and H<sub>2</sub>S. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 230, p. 29–59, 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KOWLURU, A.; KOWLURU, R. A. **RACKing up ceramide-induced islet  $\beta$ -cell dysfunction** **Biochemical Pharmacology**, 2018.

LEFRANC, C. et al. Mitochondrial oxidative stress in obesity: Role of the mineralocorticoid receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 238,

n. 3, p. R143–R159, 2018.

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

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

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

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

MUSTAFA, A. K. et al. H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration. **SCIENCE SIGNALING**, v. 2, n. 96, p. 1–9, 2009.

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

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

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

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

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

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



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

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

RODRIGUES, L. et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 255–266, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

TAMANNA, N.; MAYENGBAM, S.; HOUSE, J.D.; TREBERG, J.R. Methionine restriction leads to hyperhomocysteinemia and alters hepatic H<sub>2</sub>S production capacity in Fischer-344 rats. **Mech Ageing Dev.**, v. 176, p. 9-18, 2018.

TENG, H.; WU, B.; ZHAO, K.; YANG, G.; WU, L.; WANG, R. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine - synthase mediated by Lon protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31, p. 12679–12684, 2013.

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

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

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

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

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

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

WATANABE, M. et al. **Mice deficient in cystathionine (8-**

**synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia** *Medical Sciences*. [s.l.: s.n.].

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

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

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

YANG, G. et al. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 587–590, 2008.

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

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

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