

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Victória de Souza Gomes da Cunha Ribeiro

**EFEITO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS HEPG2**

Juiz de Fora

2024

Victória de Souza Gomes da Cunha Ribeiro

**EFEITO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS HEPG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde. Área de Concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza

Coorientadora: Profa. Dr. Jacy Gameiro

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Souza Gomes da Cunha Ribeiro , Victória.
EFEITO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS
HEPG2 / Victória de Souza Gomes da Cunha Ribeiro . -- 2024.
43 f.

Orientadora: Claudio Teodoro de Souza
Coorientadora: Jacy Gameiro
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Saúde Brasileira, 2024.

1. HEPG2. 2. Resistência à Insulina. 3. H2O2. I. Teodoro de
Souza, Claudio , orient. II. Gameiro, Jacy, coorient. III. Título.

Victória de Souza Gomes da Cunha Ribeiro

**EFEITO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS HEPG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em ___ de _____ de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr^a. Jacy Gameiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Camila de Oliveira Ramos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr. Alexandre Pastoris Muller
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família,
Valéria de Souza Gomes da Cunha
Ribeiro, Valter Gomes da Cunha Ribeiro,
Izadora Helena de Souza, Miguel Rocha e
Davi de Souza Medeiros Rocha.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão à minha família, Valéria, Valter e Izadora, pelo apoio incansável durante esta fase que considero verdadeiramente desafiadora. Enfrentei inúmeros obstáculos e dificuldades e experimentei várias tentativas no processo de aprendizado. No entanto, graças à minha persistência, consegui dar continuidade ao meu trabalho. Por isso, também agradeço a mim mesma, pois, se fosse gerar um olhar externo, nem eu acreditaria que finalizaria esta etapa. Foram experimentos sozinha no ICB à noite, escrita de madrugada para dar conta do trabalho, pelos quais, aliás, agradeço à minha empresa por me apoiar a concluir esta etapa, até corrida de Uber moto passando pela Favela da Maré para buscar minhas células. Foram muitos acontecimentos...

É imprescindível reconhecer a contribuição crucial da minha coorientadora, Jacy, que me acolheu e incentivou a prosseguir, mesmo quando tudo parecia fora de controle. Meus sinceros agradecimentos também a Ana Gualberto, que, mesmo à distância, sempre esteve presente, me ensinou cultura celular de forma remota e me ajudou no aprendizado sobre escrita científica. Manifesto minha gratidão ao Professor Eugênio pelo auxílio no desenho experimental, na obtenção das células e na colaboração nos ensaios de ELISA, aos quais também expressei minha gratidão a Sara e Paula. Agradeço também à Professora Isacláudia da Fiocruz pela generosidade em ceder as células necessárias.

Agradeço também a Luana, que foi essencial para me ensinar sobre escrita científica e ao Mário com ajuda com os meus dados estatísticos. Expressei minha gratidão a todos no meio acadêmico que desempenharam um papel fundamental na minha trajetória, aos colegas do LAPIM, aos meus colegas do grupo NEFASM e ao professor Cláudio, meu orientador.

Além disso, não posso deixar de agradecer aos meus amigos, com um agradecimento especial a Elin, que, mesmo estando na Coreia, sempre teve ouvidos para me escutar; a Mari, que morou comigo esse tempo e virou uma irmã; minhas amigas e amigos (“Baladeiras de quinta”, “Nada confiáveis”, “grupo de estudos”) com quem tive encontros e longas conversas, sejam presenciais ou no WhatsApp, que foram essenciais.

Sou grata também aos profissionais de saúde mental que estiveram ao meu lado, principalmente ao Igor, mantendo-me em equilíbrio para dar continuidade ao processo.

O mestrado foi, sem dúvida, uma das fases mais desafiadoras que já enfrentei, mas sou grata pelos frutos colhidos.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Em 2022, aproximadamente 2,5 bilhões de adultos apresentavam excesso de peso. Associadas a este quadro, diversas comorbidades surgem, entre elas o diabetes, que está relacionado à hiperglicemia e à resistência à insulina, devido a uma falha na produção de insulina ou à incapacidade de utilizá-la adequadamente. Relacionado a isso, o estresse oxidativo tem sido associado ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2), porém os mecanismos moleculares exatos envolvidos nesse processo ainda não são totalmente compreendidos. Portanto, contribuições são necessárias para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares que ligam o metabolismo glicêmico ao estresse oxidativo. **OBJETIVO:** Avaliar a participação do estresse oxidativo, na presença de peróxido de hidrogênio, induzindo resistência à insulina em células HEPG2. **METODOLOGIA:** Foi realizada cultura de células HEPG2 em meio DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, com n = 4 e duplicata técnica. Após o tratamento com H₂O₂ e insulina, o H₂O₂ foi administrado nas doses de 10, 50, 100 e 500 pmol/L com tempos de exposição de 0, 2, 12 e 24 horas. A insulina foi administrada na dose de 10 mmol/L, com tempos de exposição de 10 minutos e 24 horas, também com n = 2 e duplicata técnica. Foram avaliados o mecanismo de resistência à insulina e a histologia das células, além de serem realizados testes de ELISA. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** As imagens obtidas confirmaram as características morfológicas típicas das células HEPG2. No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos níveis de TNF- α ($F = 0,857$; $p = 0,636$) e IL-10 ($F = 0,486$; $p = 0,899$) entre os grupos tratados e não tratados. **CONCLUSÃO:** Neste estudo observou-se que o tratamento com H₂O₂ não alterou significativamente os níveis de citocinas analisadas. Todavia, a continuidade desse estudo evidenciará se o peróxido de hidrogênio está envolvido na fisiopatologia da resistência a insulina.

Palavras-chave: HEPG2, resistência a insulina, H₂O₂.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In 2022, approximately 2.5 billion adults were overweight. Associated with this condition are various comorbidities, including diabetes, which is related to hyperglycemia and insulin resistance due to a failure in insulin production or an inability to use it properly. Related to this, oxidative stress has been associated with type 2 diabetes; however, the exact molecular mechanisms involved in this process are not yet fully understood. Therefore, contributions are needed to better understand the molecular mechanisms that link glycemic metabolism to oxidative stress. **OBJECTIVE:** To evaluate the role of oxidative stress, in the presence of hydrogen peroxide, in inducing insulin resistance in HEPG2 cells. **METHODOLOGY:** HEPG2 cells were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, with $n = 4$ and technical duplicates. Following treatment with H_2O_2 and insulin, H_2O_2 was administered at doses of 10, 50, 100, and 500 pmol/L with exposure times of 0, 2, 12, and 24 hours. Insulin was administered at a dose of 10 mmol/L, with exposure times of 10 minutes and 24 hours, also with $n = 2$ and technical duplicates. The mechanism of insulin resistance and cell histology were evaluated, and ELISA tests were conducted. **RESULTS AND DISCUSSION:** The images obtained confirmed the typical morphological characteristics of HEPG2 cells. In this study, no statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed in the levels of TNF- α ($F = 0.857$; $p = 0.636$) and IL-10 ($F = 0.486$; $p = 0.899$) between treated and untreated groups. **CONCLUSION:** In this study, it was inferred that treatment with H_2O_2 did not show significant differences in the analyzed cytokine levels. However, it is evident that further studies are necessary to evaluate the insulin signaling pathway.

Keywords: HEPG2, insulin resistance, H_2O_2 .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína Quinase B - <i>Protein Kinase B</i>
AS160	Substrato da Akt 160 - <i>Akt Substrate of 160 kDa</i>
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima – <i>Enzyme Linked Immunosorbent</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-6	Interleucina tipo 6
IR	Receptor de Insulina - <i>Insulin Receptor</i>
IRS	Substrato do Receptor de Insulina - <i>Insulin Receptor Substrate</i>
HEPG2	Linhagem de células derivadas de câncer de fígado humano
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Epidemiologia e fisiopatologia da Obesidade	9
1.2 Epidemiologia e fisiopatologia da Diabetes tipo 2	12
1.3 Sinalização e resistência à insulina	12
1.4 Obesidade, Inflamação e resistência à insulina	14
1.5 Obesidade, estresse oxidativo e resistência à insulina	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Delineamento Experimental	22
3.2 Células HEPG2	22
3.3 Caracterização celular	23
3.4 Grupos de Tratamento	23
3.5 Análise Histológica	24
3.6 Elisa	24
4. Análise Estatística	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Caracterização morfológica das Células HEPG2	25
5.2 Produção de citocinas	25
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO COM COAUTORIA NA INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e fisiopatologia da Obesidade

A Organização Mundial de Saúde aponta a epidemia de obesidade como um complexo problema de saúde pública mundial (Abarca-Gómez et al., 2017). Quando comparados os anos de 1975 a 2016, a prevalência de obesidade demonstra um aumento triplicado. Em 2022, aproximadamente 2,5 bilhões de adultos apresentaram excesso de peso, em que 890 milhões eram classificados como obesos. Ademais, a OMS aponta para preocupante incidência da obesidade infantil. Estudos informam que há mais de 37 milhões de crianças, com idade até cinco anos, acima do peso (WHO, 2024).

No Brasil, o cenário das métricas também não é diferente. De acordo com um importante estudo de base populacional, VIGITEL (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico), realizado em todas as capitais do Brasil, incluindo o Distrito Federal, a população brasileira está acima do peso. Os dados apontam que nas 27 cidades analisadas, 57,2% da população está com excesso de peso, sendo homens (59,9%) e mulheres (55,0%). No total da população, cerca de 22,4% são obesos, sendo que a frequência dessa condição aumenta com a idade até os 54 anos e reduz com o aumento da escolaridade (Vigitel Brasil, 2022). A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS/2019) registrou novos dados cujos percentuais estão ainda mais relacionados aos adultos e mulheres, posto que 60,3% de indivíduos acima de 18 anos apresentam excesso de peso, ou seja, 96 milhões de pessoas, com prevalência no sexo feminino (62,6%).

A obesidade é classificada de acordo com o índice de massa corporal (IMC), ou seja, a razão entre o peso (kg) e a altura elevada ao quadrado (em metros). O IMC é um importante fator para classificação de pessoas com obesidade em estudos populacionais, devido ao seu fácil modo de aplicação e custo. Assim, as categorias são classificadas como: baixo peso ($< 18,5\text{kg/m}^2$), peso normal ($18,5$ a $24,9\text{kg/m}^2$), sobrepeso ($25,0$ a $29,9\text{kg/m}^2$), obesidade grau 1 ($30,0$ a $34,9\text{kg/m}^2$), obesidade grau 2 ($35,0$ a $39,9\text{kg/m}^2$) e obesidade grau 3 ($> 40,0\text{kg/m}^2$) (WHO, 2000).

É válido ressaltar que, além do aumento de outras condições de saúde relacionadas à obesidade, há também consideráveis encargos para os recursos públicos. De acordo com o working paper (Instituto Cordial, 2023) sobre os custos econômicos da obesidade no Brasil, os gastos decorrentes do diabetes, relacionados ao excesso de peso, totalizaram

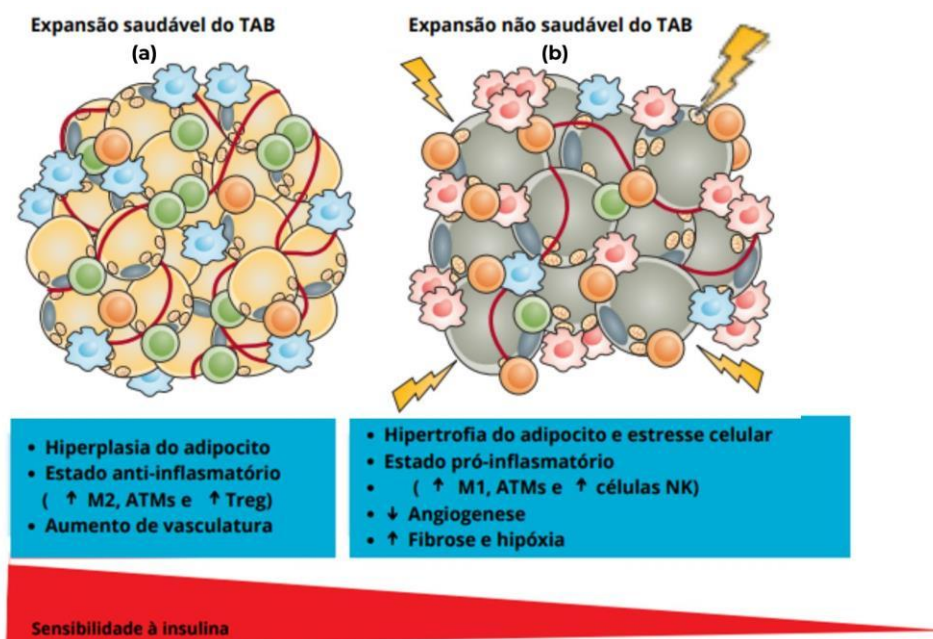
R\$ 1.639.854,28 para mulheres e R\$ 1.400.206,16 para homens. Tais custos podem ser divididos em três categorias: custos diretos, associados à prevenção e ao tratamento da doença; custos indiretos, ligados à redução da produtividade e os aspectos intangíveis, que estão vinculados à redução da qualidade de vida.

Explicar o aumento na incidência e prevalência da obesidade não constitui uma tarefa simples. No entanto, defende-se que o ambiente no qual o indivíduo está inserido é um importante fator e colabora com algumas tomadas de decisões em relação ao consumo alimentar e à prática de atividade física. Este processo também está relacionado à transição nutricional, conseqüentemente, auxilia para que ocorra o desenvolvimento de doenças crônicas (Mendes et al., 2022).

Outro aspecto importante ligado ao ambiente é o sistema alimentar global, que vive uma crescente demanda por alimentos ultraprocessados. Em geral, são alimentos ricos em calorias, gordura e açúcar, e carecem de densidade nutricional. Como resultado, alimentos frescos e naturais como frutas e vegetais muitas vezes tornam-se mais caros, perdendo espaço na mesa do consumidor (Westbury et al., 2023).

Dado que a obesidade é uma doença de etiologia multifatorial, ela é descrita por uma expansão patológica do tecido adiposo localizado ou generalizado, provocado por desequilíbrio nutricional, associado ou não a distúrbios genéticos, ou endócrino-metabólicos (Ruze et al., 2023). Devido ao desequilíbrio nutricional, há hiperplasia e hipertrofia em várias partes do corpo, que estão associadas a uma inflamação de baixo grau (Figura 1) (Kawai; Autieri; Scalia, 2021).

Figura 1. Expansão saudável do tecido adiposo (A) e expansão patológica (B).



Fonte: Extraído e traduzido de Kusminski, Bickel e Scherer (2016).

A representação da expansão do tecido adiposo apresenta-se anormal. Nesse contexto, o tecido adiposo sofre uma transformação disfuncional, pois evidencia um nível mais elevado de hipóxia e fibrose, como discutido por Kawai, Autieri e Scalia (2021). Essa condição é marcada por um estado inflamatório acentuado, com aumento nas células do tipo M1 e células NK, enquanto a vascularização é reduzida. Isso se diferencia do tecido adiposo saudável, no qual há maior formação de vasos sanguíneos e aumento das células do tipo Treg e M₂ (Figura 1). Essa disfuncionalidade culmina na instalação de resistência à insulina (Kawai; Autieri; Scalia, 2021).

Nesse contexto, a deposição de tecido adiposo visceral intra-abdominal é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento do processo de resistência à insulina e de várias doenças crônicas degenerativas, como doenças cardiovasculares (hipertensão, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral), doenças musculoesqueléticas (osteoartrite), doença de Alzheimer, depressão, alguns tipos de câncer (mama, ovário, próstata, fígado, rins e cólon) e doenças metabólicas, como a doença hepática gordurosa não alcoólica e diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) (Blüher, 2019).

1.2 Epidemiologia e fisiopatologia da Diabetes tipo 2

Diabetes tipo 2 é uma doença crônica não transmissível que envolve principalmente problemas na secreção de insulina por meio de disfunções das células beta pancreáticas e a incapacidade dos tecidos sensíveis a insulina responderem a este hormônio, como consequência o processo de resistência à insulina e hiperglicemia persistente (Galicia-Garcia et al. 2020).

A diabetes é classificada principalmente em três diferentes tipos, diabetes tipo 1, que consiste em uma doença autoimune com pouca ou nenhuma produção de insulina, geralmente diagnosticada na infância e adolescência; diabetes do tipo 2, em que o corpo não produz insulina em quantidade suficiente ou não produz; e diabetes gestacional, em que ocorre o aumento dos níveis de glicose no período gestacional devido alterações hormonais (SBD, 2024).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, 1 em cada 10 pessoas vivem com essa comorbidade, refletindo em 537 milhões de adultos no planeta (IDF, 2024). Cerca de 90% dos pacientes com diabetes possuem Diabetes do tipo 2, a qual está diretamente relacionada ao estilo de vida (Ruze et al., 2003; IDF, 2024). No Brasil, cerca de 20 milhões de pessoas vivem com diabetes, de acordo com IBGE (SBD, 2024).

Diabesidade foi o termo criado em 1970 e é comumente empregado para designar a obesidade associada ao diabetes, considerada um grave problema de saúde mundial (Sobrevia; Desoye, 2019). Isso evoluiu para uma epidemia, que tem estreita relação com a resistência à insulina e a disfunção da célula beta pancreáticas, ocasionando redução da sensibilidade à insulina. Além disso, a obesidade associada ao diabetes do tipo 2 reflete em problemas na sinalização de insulina e demonstra a importância de avaliar questões moleculares para que haja melhor compreensão dos mecanismos, o que permitirá futuras aplicações clínicas.

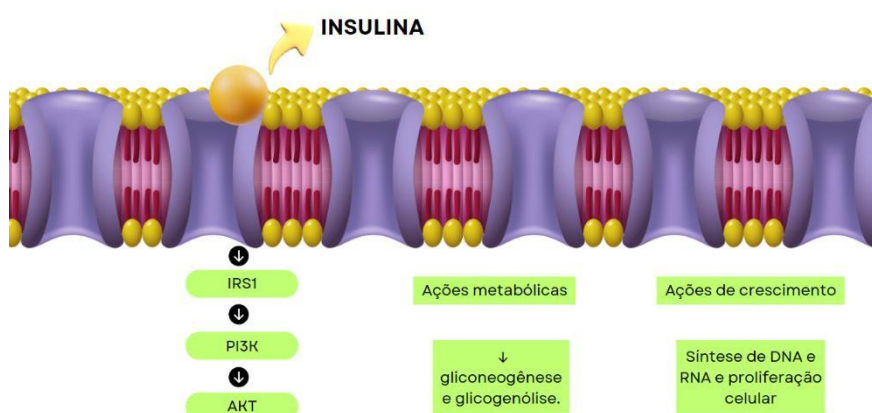
1.3 Sinalização e resistência à insulina

A deposição de tecido adiposo visceral intra-abdominal é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de várias doenças crônicas degenerativas, destacando-se o DM2. O mecanismo melhor aceito para explicar a alta relação entre obesidade e o DM2, é a inflamação crônica de baixo grau. O aumento de citocinas leva ao quadro de inflamação crônica, que resulta no desenvolvimento de resistência à insulina

(Kintscher et al., 2008; Itoh et al., 2011; Tateya et al., 2013). A resistência à insulina é descrita como o principal elo entre a obesidade e o DM2. Trata-se de uma condição na qual o tecido periférico alvo tem uma resposta subnormal aos níveis de insulina, resultando em menor captação da glicose e redução de outros efeitos fisiológicos da insulina. Dessa forma, indivíduos obesos desenvolvem inflamação crônica de baixo grau que causa resistência à insulina e progride para DM2 (Lois et al., 2010).

Para melhor compreensão da resistência à insulina é necessário compreender como ocorre a transdução do sinal insulínico. A ação da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR) (Saltiel; Kahn, 2001). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e 2 (IRS2). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt). As proteínas Akt tem a função de fosforilar vários alvos, entre eles o substrato da Akt 160 (AS160). A fosforilação de AS160 inibe a sua atividade GTPase e, conseqüentemente, mantém a proteína Rab ligada ao GTP (maiores níveis de Rab ativa). Por fim, a proteína Rab ativa a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana citoplasmática, resultando na ação fisiológica da insulina, de captar glicose (Datta; Brunet; Greenberg, 1999, Mfinea et al., 2005).

Figura 2. Via de Sinalização da insulina.



Fonte: Elaborada pela autora com base nas informações de Fujii et al. (2021)

Por outro lado, a via de sinalização da insulina pode ser regulada negativamente através da proteína tirosina fosfatase (PTB1B), da fosfatase homóloga a tensina (PTEN), entre outras. A proteína PTP1B pode desfosforilar os resíduos de fosfotirosina das subunidades β do receptor de insulina, assim como das proteínas IRS. Por sua vez, a PTEN regula negativamente os níveis intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (Di Meo; Iossa; Venditti, 2017). Outra molécula que pode comprometer a transdução do sinal insulínico é a c-jun N-terminal quinase (JNK). Essa molécula, por ser uma serina quinase, pode induzir a fosforilação do receptor de insulina ou de seus substratos em resíduos de serina.

A proteína JNK é ativada pelo fator de necrose tumoral α (TNF α), que se liga ao receptor TNFR1 e, além de ativar JNK, ativa outra proteína inflamatória quinase indutora do kappa B (IKK), que também é ativada por lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos livres (AGL) através da ligação ao receptor Toll Like 4 (TLR4). Essas vias fosforilam e ativam IKK, que promove a dissociação do NF κ B da quinase inibidora do fator kappa (I κ B). Então, o I κ B é ubiquitinado via proteossoma e o NF κ B induz a transcrição de vários mediadores inflamatórios, que poderão atuar sinergicamente na inibição da via de sinalização da insulina. O IKK também é uma enzima serina quinase que pode fosforilar o IR e seus substratos em resíduos de serina, de maneira semelhante à JNK (Möhlig et al., 2006).

1.4 Obesidade, Inflamação e resistência à insulina

Evidências científicas relatam que o excesso de tecido adiposo e o consumo elevado de gorduras são capazes de aumentar proteínas com ações inflamatórias, sendo esse mecanismo indutor de resistência à insulina o mais aceito. O tamanho dos adipócitos aumenta com o ganho de peso, elevando a morte de adipócitos devido a um suprimento inadequado de oxigênio diante da expansão do tecido adiposo (Suganami; Nishida; Ogawa, 2005; Arner et al., 2010).

Os adipócitos aumentados e os tecidos adiposos liberam ácidos graxos livres (AGL), espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias. Os ácidos graxos ativam a sinalização de NF- κ B e P38 MAPK através das vias a jusante mediadas por MyD88 e TRIF após a ativação da expressão de TLR4 (receptor Toll-like 4) em adipócitos e macrófagos residentes. Isso aumenta o estresse de retículo endoplasmático (ER) e produzem ROS, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Li et al.,

2020). Vários tipos de adipocinas pró-inflamatórias são secretadas pelos tecidos adiposos obesos, como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina tipo 1 beta (IL-1 β) e interleucina tipo 6 (IL-6) (Kamei et al., 2006; Weisberg et al., 2006; Neels et al., 2006).

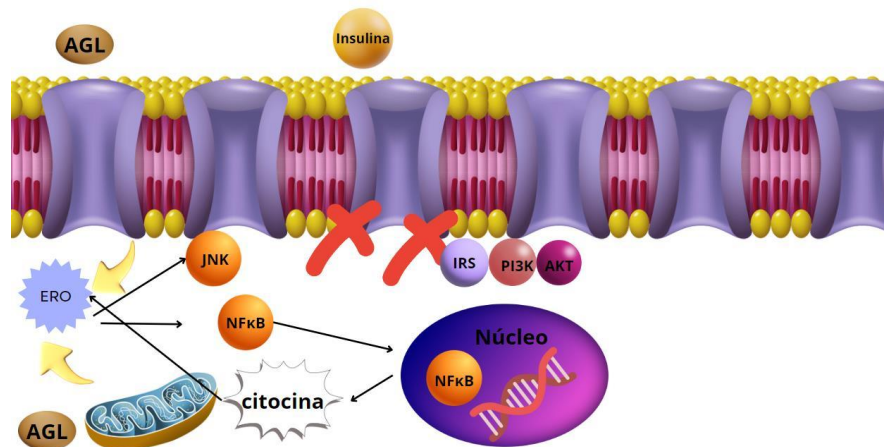
Uma vez que os monócitos se unem aos tecidos adiposos no local da inflamação, eles se diferenciam em macrófagos (Suganami; Nishida; Ogawa, 2005; Scott et al., 2008). Os fenótipos dos macrófagos residentes do tecido adiposo obeso polarizam de um M2 anti-inflamatório para um fenótipo pró-inflamatório M1 (Lumeng et al., 2007). Macrófagos M1 pró-inflamatórios residentes liberam citocinas, incluindo MCP1, IL-1 β e IL6, que podem recrutar mais monócitos, dependendo do tamanho e das condições dos adipócitos (Neels et al., 2006; Nagareddy et al., 2014; Deshmane et al., 2009; Atri et al., 2018). Assim, macrófagos e adipócitos interagem de forma parácrina.

Os macrófagos que cercam as células derivadas de adipócitos mortos formam uma estrutura semelhante a uma coroa para eliminar os adipócitos mortos. Dessa forma, os lipídios dos adipócitos mortos são absorvidos pelos macrófagos, que desregulam a atividade dos macrófagos. A prevalência de coroa está altamente interligada com o distúrbio metabólico e a inflamação (Cinti et al., 2005; Aouadi et al., 2013; Kratz et al., 2014). Eventualmente, tecidos adiposos disfuncionais na supernutrição crônica e na obesidade, pode induzir AGLs, ROS e pró-inflamação no ambiente sistêmico, provocando a etapa inicial da inflamação sistêmica de baixo grau e consequente resistência à insulina.

O aumento do TNF- α sistêmico na obesidade promove a atividade das proteínas IKK, p38 MAPK, JNK e PKC. Essas proteínas têm como alvo direto os resíduos de serina da proteína substrato do receptor de insulina (IRS) e prejudicam a fosforilação da tirosina, levando à resistência à insulina nos tecidos adiposos, músculos e fígado (Nieto-Vasquez et al., 2008; Qing et al., 2018). O TNF- α também promove o PTP1B, que prejudica a sinalização da insulina pela desfosforilação dos resíduos de fosfotirosina no receptor de insulina e na proteína IRS (Nieto-Vasquez et al., 2008), conforme já relatado. O aumento da IL-6 pode induzir as vias de sinalização JAK-STAT e aumentar a expressão das proteínas SOCS1 (supressor da sinalização da citocina 1) e SOCS3, que podem regular negativamente a função do receptor de insulina, bloqueando sua interação com as proteínas IRS ou modificando a atividade da quinase (Senn et al., 2003; Taniguchi et al., 2006; Ueki et al., 2004; Emanuelli et al., 2001). A IL-6 também pode induzir a expressão

do gene TLR-4 através da ativação de STAT3; e juntamente com IL-1 β aumentam STAT3 e NF- κ B nos hepatócitos, causando inflamação (Chen et al., 2015; Young et al., 2008).

Figura 3. Via de Sinalização da insulina, inflamação e estresse oxidativo

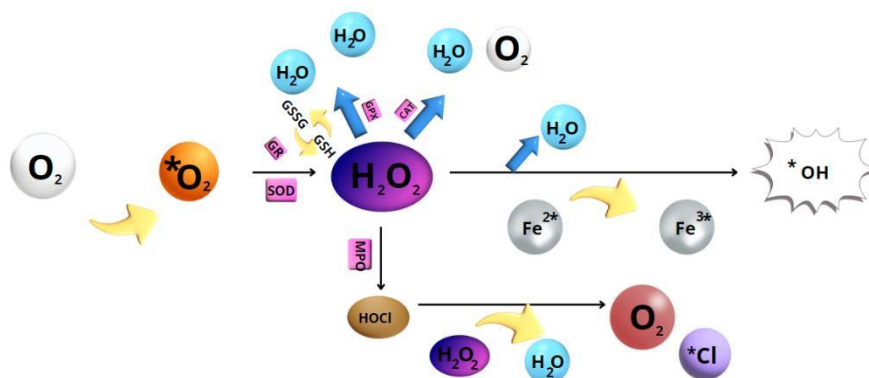


Fonte: Adaptado de de Souza (2019); Hurre e Hsu, (2017).

1.5 Obesidade, estresse oxidativo e resistência à insulina

O armazenamento do excesso de gordura gera lipotoxicidade, que produz diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO) letais, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e NO. A obesidade aumenta a produção de ERO e induz a peroxidação lipídica em adipócitos, fígado e músculos esqueléticos de humanos (Russell et al., 2003; Seki et al., 2002; Basu et al., 2000). Alguns mecanismos têm sido sugeridos para explicar o processo de resistência à insulina relacionada com o estresse oxidativo.

Figura 4. Formação de espécies reativas de oxigênio



Fonte: Adaptado de (Adaptado de Pieri (2017) ; Castello et al., (2010)

Um deles é que as NADPH oxidases (NOX) presentes na membrana plasmática podem potencialmente gerar excesso de ERO. Existem várias isoformas de NOX, como NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4. Os NOX mantêm um corpo saudável defendendo o ataque microbiano; NOX gera radicais superóxido em fagossomas que ajudam a destruir organismos microbianos (Slauch, 2011). Em adipócitos saudáveis, o NOX4 estimulado pela insulina medeia a produção de H_2O_2 , que promove a sinalização da insulina através da inibição da PTP1B e impulsiona a diferenciação dos adipócitos (Mahadev et al., 2004; Schroder et al., 2009). No entanto, a formação excessiva de superóxido pelo NOX gera excesso de ERO, que inativa importantes enzimas metabólicas, degrada moléculas celulares e inicia a peroxidação lipídica na obesidade (DeVallance et al., 2019).

Altos níveis de glicose e AGL aumentam a geração intracelular de ERO a partir de NOX4, e a inibição de NOX4 reduz a produção de ERO e a expressão de MCP-1 em adipócitos diferenciados (Han et al., 2012; Furukawa et al., 2004). Foi demonstrado que a deficiência específica de NOX4 nos adipócitos atrasa o início da inflamação adiposa e da resistência à insulina (Den Hartigh et al., 2017). A super expressão de NOX4 em excesso de nutrição reverteu significativamente a inibição de PTP1B, contribuindo para a resistência à insulina nos adipócitos (Mahadev et al., 2004). Em contraste, a expressão e ativação de enzimas antioxidantes como catalase, SOD1 e GPX diminuíram nos tecidos adiposos de indivíduos obesos (Matsuda; Shimomura, 2013).

Curiosamente, um estudo afirmou que em ratos obesos, o mRNA a expressão das subunidades NOX só aumenta nos tecidos adiposos, não no fígado ou nos músculos, e

prejudica o sistema de defesa antioxidante (Furukawa et al., 2004). DeVallance et al. (2019) mencionaram que a hiperglicemia e a hiperlipidemia aumentam a produção de ERO através do NOX na obesidade, contribuindo para a resistência à insulina do músculo esquelético, reduzindo potencialmente a Akt. O acúmulo lipídico e o excesso de lipídios que promovem ERO através das disfunções do NOX e das mitocôndrias nos tecidos adiposos obesos podem ser o estímulo à disfunção metabólica, além da secreção de proteínas pró-inflamatórias.

O excesso de ROS causa estresse oxidativo e ativa vários fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, que eleva as citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, promovendo um ambiente resistente à insulina (Muñoz; Costa, 2013). As ERO desregulam múltiplos mecanismos bioquímicos, como fosforilação oxidativa, geração de superóxido a partir de NOX, auto-oxidação de gliceraldeído, inflamação crônica, ativação de PKC e hiperleptinemia (Manna; Jain, 2015).

De forma diferente, NF-Kb e o NRF2 - que também é fator de transcrição, apresenta uma atividade antioxidante e tem importante papel na regulação de glutathione (GSH), NADPH quinona oxidoreductase 1 e UDP licosiltransferase. Este fator tem papel em doenças crônicas hepáticas e no metabolismo da glicose, por induzir a ativação de enzimas e a desintoxicação de fase 2. O excesso de espécies reativas de oxigênio pode estimular a fosforilação de IRS e inibir PI3K/Akt, uma importante via de sinalização que favorece a absorção de glicose (Zhang et al., 2022). Segundo o artigo de Cheng e colaboradores (2017), a glutathione peroxidase atua como uma enzima antioxidante essencial. O fígado, sendo o principal órgão produtor de glutathione peroxidase, reduz os danos causados pela produção de H₂O₂. Assim, o fator de transcrição pode atuar na via de sinalização da insulina.

As ERO ativam potenciais cascatas de serina/treonina quinase, que interagem com diversos alvos nas vias de sinalização da insulina. Um dos alvos mais importantes das ERO é o receptor de insulina e a família de proteínas IRS. As ERO ativam serina quinases, resultando em hiperfosforilação de serina/treonina, que inibe a fosforilação da tirosina de IRS-1 e IRS-2 e diminui a atividade catalítica da proteína AS160. Elas também ativam a cascata de serina/treonina das quinases IKK β , JNK e P38 MAPK. O IKK β também é um importante mediador da pró-inflamação na via do NF- κ B (Qatanani; Lazar, 2007), levando à resistência à insulina.

O estresse oxidativo e a inflamação subclínica são problemas fundamentais em doenças metabólicas, como o DM2. A principal questão é o envolvimento desses dois

fatores na instalação da resistência à insulina. As ERO causam resistência à insulina em tecidos periféricos e/ou podem induzir a inflamação subclínica (e vice-versa). Tanto a inflamação subclínica quanto o estresse oxidativo são positivamente correlacionados com a adiposidade do indivíduo e com a instalação de resistência à insulina. No entanto, os dados da literatura são inconclusivos e até mesmo contraditórios. Certificar que o EO realmente é um mecanismo fisiopatológico da resistência insulina é de grande valia científica e de saúde pública, pois abre novas perspectivas de intervenção/tratamentos.

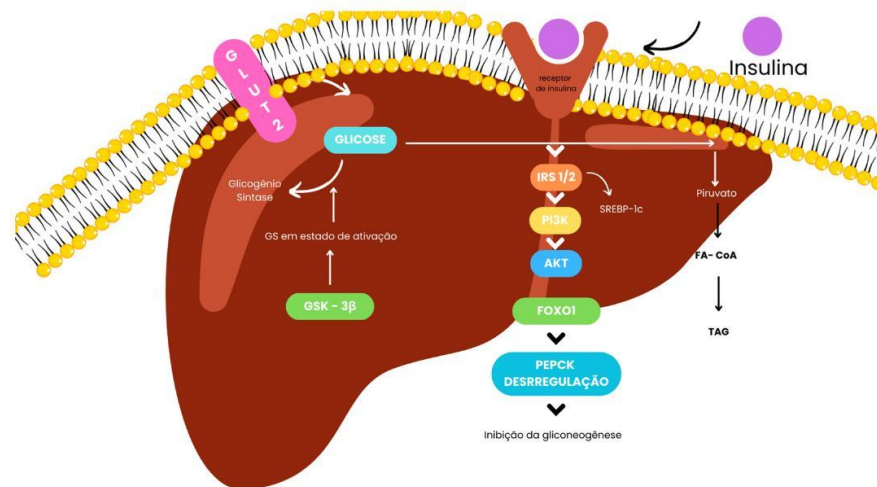
. 1.6 Células HEPG2 como modelo in vitro

O fígado tem importante papel no metabolismo da glicose com ação nas vias metabólicas como glicólise, glicogênese e gliconeogênese, relacionando-se a resistência à insulina. Uma das linhagens celulares mais comumente utilizadas para estudos in vitro para pesquisar resistência a insulina, são as células HEPG2.

A revisão de Yudhani e colaboradores (2023) apresentam dados consistentes e atuais sobre estes modelos, utilizando principalmente as células HEPG2 (fígado), 3T3 (tecido adiposo) e C2C12 (músculo). As células HEPG2 são derivadas de hepatocarcinoma celular primário maligno, e são células aderentes. São vantajosas de utilizar em estudos científicos sobre metabolismo, pois apresentam baixo custo e são fáceis de manejar na cultura celular (Alaaeldin et al., 2021). No entanto, apesar da similaridade com hepatócitos primários não cancerígenos, as células HEPG2 apresentam desvantagem nos estudos sobre metabolismo devido a pouca expressão enzimática. Por exemplo, as enzimas do citocromo p450, envolvidas no metabolismo de fase 1 do fígado, estão ausentes ou pouco detectáveis, mas presentes em estudos sobre sinalização de insulina (Donato; Tolosa; Gómez-Lechón, 2015).

Na homeostase da glicose, a cascata de sinalização nas células HEPG2 ocorre da seguinte forma: a insulina entra na célula através do receptor de insulina e ativa as moléculas IRS 1 e IRS 2, PI3-K e Akt. Quando ativada, a Akt inibe GSK-3 β e ocorre a síntese de glicogênio. Ademais, inibe a atividade de FOXO1 e ocorre um feedback negativo PEPK, reduzindo a produção hepática de glicose e aumentando a insulina, Isso desencadeia a lipogênese de novo por meio de SREBP-1c, a fim de produzir triacilglicerol (TAG) (Yudhani et al., 2023), conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Via de Sinalização da insulina nos hepatócitos.



Fonte: Elaborada pela autora com base nas informações de (Yudhani et al., 2023).

Dessa forma, as células HEPG2 são modelos *in vitro* comumente utilizados para estudos sobre o processo de resistência à insulina, que possuem similaridade aos hepatócitos não cancerígenos e diversas vantagens de utilização para o manejo e cultivo celular. Destaca-se, principalmente, seu papel nas vias metabólicas da glicose e na sinalização celular de insulina, sendo um modelo de fácil replicação e custo econômico baixo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação do estresse oxidativo na indução da resistência à insulina em células HEPG2.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar células HEPG2 com diferentes concentrações de H_2O_2 e insulina;
- Avaliar a característica morfológica das células HEPG2;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em situação de estresse oxidativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

A fim de avaliar se as espécies reativas de oxigênio impactam na instalação da resistência à insulina foi utilizada a linhagem celular HEPG2, sabidamente estabelecida como modelo *in vitro* para avaliar resistência à insulina.

O primeiro experimento foi realizado para avaliar o tratamento das células com H₂O₂ e insulina, analisando diferentes tempos de insulina e de peróxido de hidrogênio, além disso, verificou-se a morfologia celular das células HEPG2.

Com a finalidade de avaliar se o estresse oxidativo induz a produção de citocinas e assim, avaliar as citocinas de caráter inflamatório e anti-inflamatório, foram realizados os testes de ELISA.

3.2 Células HEPG2

As células de HEPG2, derivadas de hepatocarcinoma celular primário maligno, trata-se de células aderentes, foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Isaclaudia da FIOCRUZ, por intermédio do Professor Dr. Eugênio Hottz, do laboratório de imunotrombose da UFJF.

Congeladas em nitrogênio líquido até o dia de uso, quando foram descongeladas à temperatura ambiente, as quais para o cultivo celular foram mantidas em temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, com meio de cultura meio *Dulbecco's Eagle* modificado (DMEM) com 25mM de glicose, 1,0 mM de piruvato, 4,02 de mM L-alanil-glutamina e 15% de soro fetal bovino (BSA - Sigma-Aldrich), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) (Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até a confluência das células. Após, as células foram plaqueadas em meio contendo 15% de soro fetal bovino e depois de 24 horas foi realizada a dose e o tempo de exposição ao H₂O₂ foram determinados a partir de curvas dose-resposta e tempo-dependente partindo da metodologia descrita no estudo de Argæev-Frenkel e Rosenzweig (2022). Os autores utilizaram diferentes concentrações de H₂O₂ (0, 10, 50, 100 e 500 pmol/L) para os seguintes tempos: 0, 12 horas e 24 horas.

3.3 Caracterização celular

O processo de caracterização celular ocorreu da seguinte forma: (i) O crescimento das células foi feito em garrafas de cultura até obter 90% de confluência; (ii) Foi realizada a contagem das células com utilização do corante azul de tripan na proporção 90 microlitros de azul de tripan e 10 microlitros de meio com células; (iii) Desses, 100 microlitros foram retirados 10 microlitros que, por sua vez, foram adicionados na câmara de newbawer; (iv) As células foram analisadas ao microscópio invertido Olympus CKX53 e obtidas imagens das garrafas de 75 cm² em que foram cultivadas as células HEPG2, a fim de confirmar as características morfológicas nos respectivos aumentos (4x, 10x, 20x, 40x). Por fim, para o plaqueamento foram utilizadas duas placas com 24 poços, contendo 10⁵ células por poço. A partir disso, foram realizados os tratamentos com H₂O₂ e insulina a 100 nmol (Argaev-Frenkel; Rosenzweig, 2022; Smith et al., 2023).

3.4 Grupos de Tratamento

Os grupos de tratamento foram separados da seguinte forma: (i) Grupo não tratado: Células HEPG2 sem tratamento; (ii) Grupo insulina: Células HEPG2 com tratamento apenas de insulina a 100 nmol; (iii): Grupo H₂O₂/insulina 10 minutos: Células HEPG2, tratadas com H₂O₂ por 2 horas e 10 minutos de insulina; (iv) Grupo H₂O₂ 0 horas/insulina 24 horas: Células HEPG2 tratadas com H₂O₂ por 0 horas e 24 horas de insulina; (v) Grupo H₂O₂ 12 horas/ insulina 24 horas: Células HEPG2 tratadas com H₂O₂ por 12 horas e 24 horas de insulina; (vi) Grupo H₂O₂ 24 horas/ insulina 24 horas: Células HEPG2 tratadas com H₂O₂ por 24 horas e 24 horas de insulina (Figura 2).

Figura 3. Delineamento experimental.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

3.5 Análise Histológica

Por meio do microscópio invertido Olympus CKX53, foram obtidas imagens das garrafas de 75 cm², as quais foram cultivadas as células HEPG2, a fim de confirmar a característica morfológica das células. Com imagens nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x.

3.6 Elisa

As amostras das células tratadas foram congeladas a -80°C e, em seguida, a placa foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas TNF- α e IL-10, foi utilizado o método enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA), com os KITS da Invitrogen Brasil LTDA. Ao final, por meio do espectrofotômetro (leitor de microplaca), as placas foram lidas nos comprimentos de onda de 450 nm para TNF- α e IL-10, seguindo as instruções do fabricante.

4. Análise Estatística

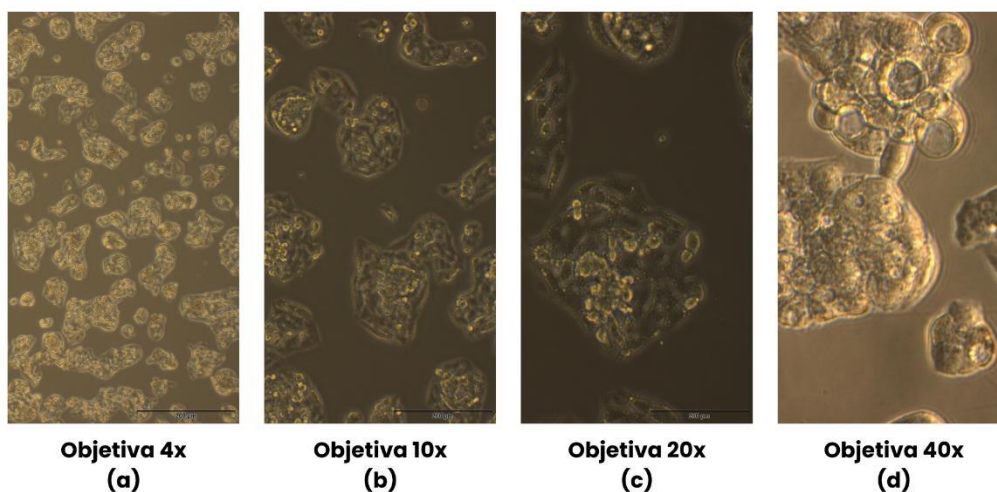
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos (2 passagens) no tempo de 0 horas, 12 horas e 24 horas, em duplicata. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk no qual verificou-se que as variáveis em estudo possuíam distribuição não paramétrica. Posteriormente para comparação nos níveis de TNF- α e IL-10 entre os diferentes tratamentos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com um nível de significância de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o software SPSS, e os gráficos foram gerados no GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica das Células HEPG2

As imagens obtidas confirmaram as características morfológicas típicas das células HEPG2 (Figura 3). As células apresentaram uma morfologia semelhante a epitelial (média 48 a 54 cromossomos por célula) e, além disso, foram aderentes a garrafa e se mantiveram viáveis durante o tratamento. Nesta pesquisa, as células HEPG2 apresentaram de 3 a 7 núcleos. O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Wilkening, Stahl e Bader (2003).

Figura 4. Microscopia das células HEPG2.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

5.2 Produção de citocinas

Os níveis de TNF- α e IL-10 foram medidos nos grupos tratados e não tratados com diferentes concentrações de H₂O₂ e insulina. A escolha das citocinas se baseou em dados retratados na literatura, conforme na citado na introdução, em que ROS podem levar a RI diretamente ou por induzir inflamação. Para explorar isso, optamos por dosar citocinas inflamatórias. ROS não aumentou marcadores inflamatórios e pode ser que ROS participa do processo de RI diretamente, ou seja, sem alterar citocinas, mas sem dúvida

precisamos analisar o nível de fosforilação de importantes moléculas da via insulínica, tais como IR, IRS e Akt. Isso será performado ainda neste projeto em sua continuidade.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e foi a primeira a ser descrita por estar envolvida na fisiopatologia da diabetes, sendo um importante marcador. TNF- α ativa a cascata de sinalização de importantes vias, relacionadas ao estresse oxidativo e modifica a transcrição de importantes fatores, como o NF κ -B. Este fator de transcrição quando ativado induz a produção de ROS e NRF2. NRF2 apresentam papel na homeostase metabólica (Akash; Rehman; Liaqat, 2018; Li et al., 2020). A IL-10, que também foi escolhida para ser dosada nesse estudo, possui um importante papel antioxidante, com ação na regulação do metabolismo da glicose, reduzindo a produção de TNF- α através da inibição da transcrição de NF κ B. Assim, é um importante regulador da relação imunometabólica em situações como o processo de resistência à insulina (Docherty et al., 2022).

No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas médias dos níveis de TNF- α ($F = 0,857$; $p = 0,636$) e IL-10 ($F = 0,486$; $p = 0,899$) entre os grupos tratados e não tratados (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão de citocinas avaliadas em cada grupo.

Citocina	Variável de agrupamento	Média \pm Desvio Padrão
TNF- α	Grupo não tratado	0,0028 \pm 0,0041
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (0 μ M) 0 horas/insulina 10 minutos	0,0144 \pm 0,0175
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (0 μ M) 2 horas/insulina 10 minutos	0,0141 \pm 0,0132
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (10 μ M) 2 horas/insulina 10 minutos	0,0039 \pm 0,0078

TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (100 μ M) 2 horas/insulina 10 minutos	0,0008 \pm 0,0009
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (50 μ M) 2 horas/insulina 10 minutos	0,0023 \pm 0,0026
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (500 μ M) 2 horas/insulina 10 minutos	0,0035 \pm 0,007
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (0 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	0,018 \pm 0,0233
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (10 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	0,0015 \pm 0,0007
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (100 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	0,0005 \pm 0,0007
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (50 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	0,0058 \pm 0,0046
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (500 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	0,017 \pm 0,024

TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (10 μ M) 12 horas/insulina 24 horas	0,004 \pm 0,0021
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (100 μ M) 12 horas/insulina 24 horas	0,0125 \pm 0,0099
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (50 μ M) 12 horas/insulina 24 horas	0,0168 \pm 0,0237
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (500 μ M) 12 horas/insulina 24 horas	0,016 \pm 0,0184
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (10 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	0,002 \pm 0,0028
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (50 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	0,0185 \pm 0,0262
TNF- α	Grupo H ₂ O ₂ (500 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	0,0285 \pm 0,0389
IL-10	Grupo não tratado	5,016 \pm 7,0937
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (0 μ M) 0 horas/insulina 24 horas	5,413 \pm 7,6551

IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (10 μM) 0 horas/insulina 24 horas	0,4448±0,629
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (100 μM) 0 horas/insulina 24 horas	1,2985±1,8364
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (50 μM) 0 horas/insulina 24 horas	1,9998±2,8281
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (500 μM) 0 horas/insulina 24 horaS	1,7868±2,5268
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (10 μM) 12 horas/insulina 24 horas	0,703±0,9942
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (100 μM) 12 horas/insulina 24 horas	1,7858±2,5254
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (50 μM) 12 horas/insulina 24 horas	0,4283±0,6056
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (500 μM) 12 horas/insulina 24 horas	0,6103±0,863

IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (10 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	1,0763 \pm 1,522
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (100 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	2,1648 \pm 3,0614
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (50 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	0,3968 \pm 0,5611
IL-10	Grupo H ₂ O ₂ (500 μ M) 24 horas/insulina 24 horas	0,7725 \pm 1,0925

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatória secretada pelo tecido adiposo durante o processo obesogênico. A ativação clássica mediada por TNF α é capaz de converter macrófagos M2 em M1, com fenótipo pró-inflamatório, por produzirem mediadores como TNF α , IL1 β , IL6, leptina e resistina (Li, Spallanzani and Mathis 2020, Chait and den Hartigh 2020). A perpetuação na secreção de TNF α e IL1 β torna o processo inflamatório crônico pois, uma vez ativadas, podem se ligar aos seus respectivos receptores e intensificar a sinalização pró-inflamatória. Durante esse processo, múltiplas vias de sinalização, incluindo I κ B quinase, NF κ B e a via da c-Jun N-terminal quinase (JNK), são ativadas. Esse fenômeno além de ocorrer no tecido adiposo pode também estar presente no fígado gerando a resistência à insulina induzida por inflamação Além de contribuir no desenvolvimento da resistência à insulina, TNF α e outras citocinas podem também atuar no aumento da produção de ROS e do estresse oxidativo (Li et al., 2020).

A interleucina 10, é uma citocina do tipo 2 e tem papel crucial inibindo ou reduzindo processo inflamatórios. Barry e colaboradores demonstraram que IL10 pode

atuar com fator protetor ao induzir a ativação da via STAT3 no diabetes tipo 2 (Barry et al, 2016). Além disso, em outro estudo foi demonstrado que a inibição da IL10 leva ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias e piora na sinalização da insulina hepática (Cintra, et al, 2008).

Neste estudo, o tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂ e insulina não resultou em alterações significativas nos níveis de TNF- α e IL-10 nas células HEPG2 como mencionado anteriormente. Esse resultado sugere que, nas condições experimentais estabelecidas, o estresse oxidativo induzido não foi suficiente para modular a resposta inflamatória dessas células. Em 2020, Xu e colaboradores utilizaram células HepG2 tratadas com 750 μ M de H₂O₂ por 1 hora. Segundo os autores, a dosagem de 500 μ M de H₂O₂ estimula a produção de ROS, entretanto, esse estímulo não poderia atender um ambiente de estresse oxidativo estável (Xu et al.,2020). Em outro estudo, que buscou investigar os efeitos do estresse de retículo endoplasmático e da autofagia no estresse oxidativo, foi utilizado uma concentração de 600 μ mol de H₂O₂ nas células HepG2. Nos testes realizados nesse estudo, foi demonstrado que a viabilidade da célula foi alterada de maneira dose e tempo dependente. Ou seja, as células tratadas com alta concentração (400, 800 E 1000 μ mol) de H₂O₂ apresentaram piora na viabilidade em 12h de exposição, o que sugere que o crescimento celular ou apoptose foram afetadas pela produção de ROS (Wu et al, 2018).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo observou-se que o tratamento com H_2O_2 não alterou significativamente os níveis de citocinas analisadas. Todavia, a continuidade desse estudo evidenciará se o peróxido de hidrogênio está envolvido na fisiopatologia da resistência à insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA-GÓMEZ, L. *et al.* Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, 2017.

AKASH, M. S.; REHMAN, K.; LIAQAT, A. Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 105-110, 2018.

ALAAELDIN, R. *et al.* Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells via modulating IR/IRS1/PI3k/Akt/GSK3/FoxO1 pathway. **Molecules**, v. 26, n. 24, 2021.

AOUADI, M. *et al.* Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8278-8283, 2013.

ARGAEV-FRENKEL, L.I; ROSENZWEIG, T.. Complexity of NAC action as an antidiabetic agent: opposing effects of oxidative and reductive stress on insulin secretion and insulin signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, 2022.

ARNER, E. *et al.* Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105-109, 2010.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.

BARRY, J. C.; SHAKIBAKHO, S.; DURRER, C.; SIMTCHOUK, S.; JAWANDA, K. K.; CHEUNG, S. T.; MUI, A. L.; LITTLE, J. P. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Scientific Reports*, [S.l.], v. 6, p. 21244, 17 feb. 2016. DOI: 10.1038/srep21244. PMID: 26883847. PMCID: PMC4756700.

BASU, S. *et al.* Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. **Clinical Science**, v. 99, n. 6, p. 511-516, 2000.

BLÜHER, M. Obesity: Global Epidemiology and Pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–98, 2019.

CARVALHO-FILHO, M. A. *et al.* Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 195-203, 2007.

CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. J. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, p. 22, 2020.

CHEN, L. *et al.* Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **International Journal of Endocrinology**, v. 1, p. 508409, 2015.

CHENG, S. B. *et al.* Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. **PloS one**, v. 12, p. e0170016, 2017.

CINTI, S. *et al.* Adipocyte death defines the location and function of macrophages in the adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.

CINTRA, D. E.; PAULI, J. R.; ARAÚJO, E. P.; MORAES, J. C.; DE SOUZA, C. T.; MILANSKI, M.; MORARI, J.; GAMBERO, A.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology*, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 628-637, abr. 2008. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.12.017. Epub 31 jan. 2008. PMID: 18267346.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Development**, v. 13, n. 22, p. 2905-2927, 1999.

DEN HARTIGH, L. J. *et al.* Adipocyte-specific deficiency of NADPH oxidase 4 delays the onset of insulin resistance and attenuates adipose tissue inflammation in obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 3, p. 466-475, 2017.

DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

DEVALLANCE, E. *et al.* The role of NADPH oxidases in the etiology of obesity and metabolic syndrome: contribution of individual isoforms and cell biology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 31, n. 10, p. 687-709, 2019.

DI MEO, S.; IOSSA, S.; VENDITTI, P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. **Journal of Endocrinology**, v. 233, n. 1, p. R15-R42, 2017.

DOCHERTY, S. *et al.* The effect of exercise on cytokines: implications for musculoskeletal health: a narrative review. **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 14, 2022.

DONATO, M. T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. **Methods in Molecular Biology**, p. 77-93, 2015.

EMANUELLI, B. *et al.* SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47944–47949, 2001.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GALICIA-GARCIA, U.; BENITO-VICENTE, A.; JEBARI, S.; LARREA-SEBAL, A.; SIDDIQI, H.; URIBE, K. B.; OSTOLAZA, H.; MARTÍN, C. Pathophysiology of Type

2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.l.], v. 21, n. 17, p. 6275, 2020.

GOLDSTEIN, B. J.; MAHADEV, K.; WU, X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. **Diabetes**, v. 54, n. 2, 2005.

HAN, C. Y. et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 10379-10393, 2012.

HENRIKSEN, E. J. Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. **Methods in Enzymology**, v. 528, p. 269-278, 2013.

HURRLE, S.; HSU, W.H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomedical Journal*, v. 40, n. 5, p. 257- 262, oct. 2017.

IDF. Type 2 diabetes. **International Diabetes Federation**, 2024. Disponível em: <https://idf.org/about-diabetes/type-2-diabetes/>. Acesso em: 23 mai. 2024.

INSTITUTO CORDIAL. Custos econômicos da obesidade no Brasil: aspectos metodológicos. **Painel Brasileiro da Obesidade: Working Paper**. São Paulo, 2023. Disponível em: <https://lp2.institutocordial.com.br/pbo-185-wp-custos>. Acesso em: 22 fev. 2024.

ITOH, M. *et al.* Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 720926, 2011.

KAMEI, N. *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26602-26614, 2006.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. 375-391, 2021.

KINTSCHER, U. *et al.* T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p. 1304-1310, 2008.

KRATZ, M. *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 614–625, 2014.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 15, n. 9: p. 639-660, 2016.

LANASPA, M. A. *et al.* Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and-independent fatty liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40732-40744, 2012.

LI, B. et al. A global perspective on the crosstalk between saturated fatty acids and Toll-like receptor 4 in the etiology of inflammation and insulin resistance. **Progress in Lipid Research**, v. 77, p. 101020, 2020.

Li, C., R. G. Spallanzani & D. Mathis (2020) Visceral adipose tissue Tregs and the cells that nurture them. *Immunological Reviews*.

LI, S., *et al.* The role of the Nrf2 signaling in obesity and insulin resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, 2020.

LOIS, K. *et al.* The impact of insulin resistance on woman's health and potential treatment options. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1205, p. 156-165, 2010.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MAHADEV, K. *et al.* The NAD (P) H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 5, p. 1844-1854, 2004.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423-444, 2015.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.

MENDES, L. L.; PESSOA, M. C.; COSTA, B. V. L. **Ambiente Alimentar: Saúde e Nutrição**. Rio de Janeiro: Rubio, 2022.

MÎINEA, C. P. *et al.* AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 87-93, 2005.

MÖHLIG, M. *et al.* Acetylsalicylic acid improves lipid-induced insulin resistance in healthy men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 3, p. 964-967, 2006.

MUÑOZ, A.; COSTA, M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.

NAGAREDDY, P. R. *et al.* Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytoysis in obesity. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 821–835, 2014.

NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. Inflamed fat: what starts the fire?. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 33–35, 2006.

NIETO-VAZQUEZ, I. *et al.* Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 183–194, 2008.

- PIERI, B. L. S. *Participação Das Espécies Reativas Na Resistência Muscular à Insulina Em Camundongos Com Obesidade Induzida Por Dieta Hiperlipídica*. 2017.57 f. Tese (Doutorado em ciências da saúde) – UESC, Criciúma, 2017.
- PIERI, B. L. S. *et al.* Role of Oxidative Stress on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12088, 2023.
- QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes & Development**, v. 21, n. 12, p. 1443-1455, 2007.
- QING, Z. *et al.* Vitamin C deficiency aggravates tumor necrosis factor α -induced insulin resistance. **European Journal of Pharmacology**, v. 829, p. 1–11, 2018.
- RUSSELL, A. P. *et al.* Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids?. **FEBS Letters**, v. 551, n. 1–3, p. 104–106, 2003.
- RUZE, R. *et al.* Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1161521, 2023.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. Ronald. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.
- SBD. Brasil já tem cerca de 20 milhões de pessoas com diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 26. abr. 2024. Disponível em: <https://diabetes.org.br/brasil-ja-tem-cerca-de-20-milhoes-de-pessoas-com-diabetes/#:~:text=S%C3%A3o%20Paulo%2C%2026%20de%20abril,formada%20por%20203.080.756%20pessoas>. Acesso em: 14 abr. 2024.
- SCHRODER, K. *et al.* Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 2, p. 239-245, 2009.
- SCOTT, T.; OWENS, M. D. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF- κ B pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 4, p. 1001–1008, 2008.
- SEGERITZ, C. P.; VALLIER, L. **Cell culture: Growing cells as model systems in vitro**. In: Basic science methods for clinical researchers. Academic Press, 2017.
- SEKI, S. *et al.* In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2002.
- SENN, J. J. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 13740–13746, 2003.
- SLAUCH, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 580-583, 2011.
- SOBREVIA, L.; DESOYE, G. Molecular aspects of signalling in diabetes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 66, p. 1-2, 2019.

- SOUZA, C. T. Envolvimento da inflamação subclínica e do estresse oxidativo na resistência à insulina associada à obesidade. *Revista HU*, p. 211-220, 2018.
- SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 25, n. 10, p. 2062-2068, 2005.
- TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. T. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 2, p. 85–96, 2006.
- TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, v. 4, p. 1-14, 2013.
- TURNBULL, P. C. *et al.* Synergistic activation of mitochondrial metabolism and the glutathione redox couple protects HepG2 hepatocarcinoma cells from palmitoylcarnitine-induced stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 317, n. 6, p. C1324-C1329, 2019.
- UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 12, p. 5434–5446, 2004.
- VIGITEL BRASIL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2021. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.
- WEISBERG, S. P. *et al.* CCR2 modulates the inflammatory and metabolic effects of a high-fat diet. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 1, p. 115–124, 2006.
- WESTBURY, S. *et al.* Obesity stigma: causes, consequences, and potential solutions. *Current Obesity Reports*, v. 12, n. 1, p. 10-23, 2023.
- WHO. Obesity and overweight. **World Health Organization**. Newsroom, 01 mar. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 19 mai. 2024.
- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic, a report of a WHO consultation. **World Health Organization**, 2000. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/42330>. Acesso em: 20 mai. 2024.
- WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A.. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.
- WU, Z. *et al.* Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 18, n. 5, p. 4163-4174, 2018.

YOUNG, D. P.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. Binding of C/EBPbeta to the C-reactive protein (CRP) promoter in Hep3B cells is associated with transcription of CRP mRNA. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2420–2427, 2008.

YUDHANI, R. D. *et al.* In vitro insulin resistance model: a recent update. **Journal of Obesity**.v. 1, 2023.

XU, J.; ZHANG, Y.; REN, G.; YANG, R.; CHEN, J.; XIANG, X.; QIN, H.; CHEN, J. Inhibitory effect of delphinidin on oxidative stress induced by H₂O₂ in HepG2 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [S.l.], 20 nov. 2020, p. 4694760. DOI: 10.1155/2020/4694760. PMID: 33274001; PMCID: PMC7700032.

ZHANG, Y. *et al.* Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 152, n. 113273, 2022.

ZHAO, L. *et al.* Fructose and glucose combined with free fatty acids induce metabolic disorders in HepG2 cell: A new model to study the impacts of high-fructose/sucrose and high-fat diets in vitro. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 4, p. 909-921, 2016.

APÊNDICE A – Artigo publicado com coautoria na International Journal of Molecular Sciences



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Role of Oxidative Stress on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice

Bruno Luiz da Silva Pieri¹, Matheus Scarpato Rodrigues^{1,2}, Hemelin Resende Farias^{1,2}, Gustavo de Bem Silveira¹, Victória de Souza Gomes da Cunha Ribeiro³, Paulo Cesar Lock Silveira¹ and Claudio Teodoro De Souza^{3,*}

- ¹ Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma 88806-000, Brazil
² Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre 90010-150, Brazil
³ Post Graduate Program in Health, Department of Internal Medicine, Medicine School, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36038-330, Brazil; victoriasgribeiro@gmail.com
 * Correspondence: claudio.teodoro@ufjf.br; Fax: +55-32-2102-3829

Abstract: Insulin resistance is the link between obesity and type 2 diabetes mellitus. The molecular mechanism by which obese individuals develop insulin resistance has not yet been fully elucidated; however, inconclusive and contradictory studies have shown that oxidative stress may be involved in the process. Thus, this study aimed to evaluate the effect of reactive species on the mechanism of insulin resistance in diet-induced obese mice. Obese insulin-resistant mice were treated with N-acetylcysteine (NAC; 50 mg/kg per day, for 15 days) by means of oral gavage. Twenty-four hours after the last NAC administration, the animals were euthanized and their tissues were extracted for biochemical and molecular analyses. NAC supplementation induced improved insulin resistance and fasting glycemia, without modifications in food intake, body weight, and adiposity. Obese mice showed increased dichlorofluorescein (DCF) oxidation, reduced catalase (CAT) activity, and reduced glutathione levels (GSH). However, treatment with NAC increased GSH and CAT activity and reduced DCF oxidation. The gastrocnemius muscle of obese mice showed an increase in nuclear factor κ B (NF κ B) and protein tyrosine phosphatase (PTP1B) levels, as well as c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation compared to the control group; however, NAC treatment reversed these changes. Considering the molecules involved in insulin signaling, there was a reduction in insulin receptor substrate (IRS) and protein kinase B (Akt) phosphorylation. However, NAC administration increased IRS and Akt phosphorylation and IRS/PI3k (phosphoinositide 3-kinase) association. The results demonstrated that oxidative stress-associated obesity could be a mechanism involved in insulin resistance, at least in this animal model.

Keywords: insulin resistance; obesity; oxidative stress; skeletal muscle



Citation: Pieri, B.L.d.S.; Rodrigues, M.S.; Farias, H.R.; Silveira, G.d.B.; Ribeiro, V.d.S.G.d.C.; Silveira, P.C.L.; De Souza, C.T. Role of Oxidative Stress on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12088. <https://doi.org/10.3390/ijms241512088>

Academic Editor:
Dionysios Chartoumpakis

Received: 5 June 2023
 Revised: 19 July 2023
 Accepted: 23 July 2023
 Published: 28 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The epidemic of obesity is a major public health problem globally. Excess adiposity is a major risk factor in the progression of various metabolic conditions, including type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease, etc. [1]. These pathological states are strongly associated with insulin resistance. Described as the major link between obesity and T2DM, insulin resistance is a condition in which target peripheral tissues, such as the skeletal muscle, liver, and adipose tissue, have a subnormal response to the levels of circulating insulin, resulting in a decrease in the physiological effects of this hormone and, thus, lower glucose uptake. The precise molecular mechanisms that are involved in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and its consequences are complex. Based on the efforts over the last decades, there have been remarkable developments in the investigation of obesity-induced insulin resistance, especially in the