

Como citar este artigo:

Rodrigues MS, Pieri BL, Silveira GB, Zaccaron RP, Venturini LM, Comin VH, et al. Redução do estresse oxidativo melhora a sinalização da insulina em tecido cardíaco de camundongos obesos. *einstein* (São Paulo). 2020;18:eAO5022. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO5022

Autor correspondente:

Matheus Scarpato Rodrigues
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Laboratório de
Fisiopatologia Experimental,
Universidade do Extremo Sul Catarinense
Avenida Universitária, 1.105 –
Bairro Universitário
CEP: 88806-000 – Criciúma, SC, Brasil
Tel.: (48) 3431-2578
E-mail: matheus_cdsc@unesc.net.

Data de submissão:

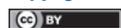
22/2/2019

Data de aceite:

23/10/2019

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2020

Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

ARTIGO ORIGINAL

Redução do estresse oxidativo melhora a sinalização da insulina em tecido cardíaco de camundongos obesos

Reduction of oxidative stress improves insulin signaling in cardiac tissue of obese mice

Matheus Scarpato Rodrigues¹, Bruno Luiz da Silva Pieri¹, Gustavo de Bem Silveira¹, Rubya Pereira Zaccaron¹, Lígia Milanez Venturini¹, Vitor Hugo Comin¹, Karine Damian Luiz¹, Paulo Cesar Lock Silveira¹

¹ Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

DOI: [10.31744/einstein_journal/2020AO5022](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO5022)

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos do estresse oxidativo sobre a sinalização da insulina em tecido cardíaco de camundongos obesos. **Métodos:** Utilizaram-se 30 camundongos *Swiss* subdivididos igualmente (n=10) em três grupos: Grupo Controle, Grupo Obeso e Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína. Após estabelecidas a obesidade e a resistência à insulina, os camundongos obesos foram tratados diariamente, durante 15 dias, via gavagem oral, com N-acetilcisteína na dose de 50mg/kg. **Resultados:** Observaram-se maiores níveis de glicose sanguínea, conteúdos de nitrito e carbonil, e menores níveis proteicos de glutathione peroxidase e proteína quinase B fosforilada no Grupo Obeso quando comparado a seu respectivo controle. Por outro lado, o tratamento com N-acetilcisteína se mostrou eficiente em diminuir os níveis glicêmicos, os conteúdos de nitrito e carbonil, e aumentar significativamente os níveis proteicos de glutathione peroxidase e proteína quinase B fosforilada, quando comparados ao Grupo Obeso. **Conclusão:** Obesidade e/ou dieta hiperlipídica levam a estresse oxidativo e à resistência à insulina no tecido cardíaco de camundongos obesos, e o uso da N-acetilcisteína como estratégia metodológica e terapêutica sugeriu haver relação entre ambos.

Descritores: Obesidade; Resistência à insulina; Estresse oxidativo; Miocárdio; Camundongos

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of oxidative stress on insulin signaling in cardiac tissue of obese mice. **Methods:** Thirty Swiss mice were equally divided (n=10) into three groups: Control Group, Obese Group, and Obese Group Treated with N-acetylcysteine. After obesity and insulin resistance were established, the obese mice were treated with N-acetylcysteine at a dose of 50mg/kg daily for 15 days via oral gavage. **Results:** Higher blood glucose levels and nitrite and carbonyl contents, and lower protein levels of glutathione peroxidase and phosphorylated protein kinase B were observed in the obese group when compared with their respective control. On the other hand, treatment with N-acetylcysteine was effective in reducing blood glucose levels and nitrite and carbonyl contents, and significantly increased protein levels of glutathione peroxidase and phosphorylated protein kinase B compared to the Obese Group. **Conclusion:** Obesity and/or a high-lipid diet may result in oxidative stress and insulin resistance in the heart tissue of obese mice, and the use of N-acetylcysteine as a methodological and therapeutic strategy suggested there is a relation between them.

Keywords: Obesity; Insulin resistance; Oxidative stress; Myocardium; Mice

I INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial e multiétnico, que acomete homens e mulheres de todas as faixas etárias e classes sociais.^(1,2) Dados epidemiológicos reforçam a prevalência desta patologia na população mundial. Segundo levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS), realizado em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos sofriam com o sobrepeso, sendo obesos 650 milhões destes.⁽³⁾ Com a obesidade, surgem alterações fisiopatológicas importantes, como o *diabetes mellitus* do tipo 2, a resistência à insulina,⁽⁴⁾ além de doenças cardiovasculares e complicações clínicas associadas.⁽⁵⁾

Várias estratégias têm sido utilizadas para se estudar experimentalmente a obesidade, com destaque para o modelo de indução por dieta rica em gordura (dieta hiperlipídica).^(6,7) Camundongos alimentados com tal dieta apresentaram problemas cardíacos significativos, como fibrose do miocárdio, hipertrofia de cardiomiócitos e diminuição da capacidade contrátil do coração.⁽⁸⁾ Camundongos obesos apresentam prejuízos nas captações de glicose e redução da sensibilidade à insulina no miocárdio.⁽⁹⁾

Vários mecanismos podem estar envolvidos na instalação da resistência à insulina neste órgão, e o elevado estresse oxidativo pode ser um deles. Animais tratados com dieta hiperlipídica apresentam superprodução de espécies reativas do oxigênio (ERO) no fígado e no tecido adiposo.⁽¹⁰⁾ O miocárdio de camundongos obesos por dieta rica em gordura apresenta aumento de estresse oxidativo.⁽¹¹⁾ No entanto, os estudos não são conclusivos e merecem maiores investigações.

Estrategicamente, o uso de um clássico antioxidante poderia melhor demonstrar a relação estresse oxidativo e ação da insulina, e ser de grande valia. Sendo assim, o N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante não enzimático derivado do aminoácido cisteína, de fórmula química $C_5H_9NO_3S$ e peso molecular 163,2kDa,⁽¹²⁾ é uma substância que, devido a sua ação antioxidante, pode ser utilizada experimentalmente para melhor demonstrar esta relação.

O NAC é um composto muito empregado na prática clínica como agente mucolítico, para o tratamento de overdoses de paracetamol e prevenção de geração de radicais livres por substâncias tóxicas.⁽¹³⁾ Sua atividade antioxidante está relacionada principalmente à redução do aminoácido extracelular cistina ao aminoácido intracelular cisteína, e à doação de grupamentos tiol para a glutatona reduzida.⁽¹⁴⁾ Além disso, o NAC pode promover a neutralização direta de ERO como o radical hidroxila e o ácido hipocloroso, prevenindo a instalação do estresse oxidativo e suas possíveis consequências sobre resistência à insulina.⁽¹⁵⁾

I OBJETIVO

Analisar o aumento de estresse oxidativo e resistência à insulina em miocárdio de camundongos obesos por dieta rica em gordura. Em caso de resposta positiva, analisar se o uso do N-acetilcisteína mostra alguma relação causal entre tais mecanismos.

I MÉTODOS

Aspectos étnicos e caracterização dos animais

Foram utilizados, neste estudo, 30 camundongos *Swiss* machos com 45 dias de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da UNESC, divididos inicialmente em dois grupos: 10 animais alimentados com dieta padrão para roedores (Grupo Controle) e os demais 20 animais alimentados com dieta hiperlipídica, após comprovada a obesidade e a resistência a insulina, foram subdivididos em dois outros grupos experimentais: Grupo Obeso (n=10) e Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína (n=10). Todos os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas claro/escuro, ambiente com 70% de umidade e temperatura entre 20°C e 22°C, alojados em gaiolas de poliuretano com cobertura metálica (um animal por caixa), e alimentados por 12 semanas com ração padrão (carboidrato: 70%; proteína: 20%; gordura: 10%; totalizando 3,8kcal/g) ou ração hiperlipídica (carboidrato: 38,5%; proteína: 15%; gordura: 46,5%; totalizando 5,4kcal/g) para roedores e água *ad libitum*.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), protocolo 042/2016-2. Todos os experimentos respeitaram estritamente os princípios éticos da experimentação animal.

Tratamento dos animais com antioxidante N-acetilcisteína

Após a instalação da obesidade e da resistência à insulina, os animais que receberam previamente a dieta hiperlipídica foram subdivididos em dois grupos: Grupo OB, grupo de obesos alimentados com dieta hiperlipídica (n=10), e Grupo OB + NAC, grupo de obeso tratado durante 15 dias com N-acetilcisteína (n=10). Vale ressaltar que os animais deste último grupo só receberam a terapia antioxidante após a devida comprovação da obesidade e da resistência à insulina, cujas avaliações foram devidamente realizadas após três meses de exposição dos animais à dieta rica em gordura. A NAC foi administrada uma vez ao dia, via gavagem oral (50mg/kg), durante 15 dias. O estudo foi realizado nos meses de fevereiro e março de 2017. Ao todo, a duração do protocolo experimental (período experimental) foi

de 14 semanas e 1 dia. Depois de 24 horas da última administração da NAC, os animais foram eutanasiados, e o coração foi extraído, para posterior realização das técnicas bioquímicas.

Glicemia em jejum

O teste foi realizado ao final do período experimental. A alimentação foi retirada 6 horas antes do teste. A dosagem da glicose sanguínea foi feita por meio de glicosímetro, e os resultados foram expressos em mg/dL.

Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi realizado antes do início da administração de antioxidante e ao final do período experimental. O alimento foi retirado 6 horas antes do teste, e a primeira coleta sanguínea equivale ao tempo zero. Após isso, a insulina (2U/kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente, e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, sendo a determinação da glicemia realizada com um glicosímetro. A velocidade constante do decaimento da glicose (K_{RI}) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica, durante a fase de decaimento linear. Esse teste foi realizado para comprovação da instalação da resistência à insulina nos camundongos obesos e verificar possível melhora nos animais tratados.

Western blotting

Após 24 horas da última administração de NAC, os animais sofreram eutanásia, e o ápice cardíaco foi extraído e imediatamente homogeneizado em tampão específico, contendo inibidores de proteases e fosfatases. A concentração de proteínas totais fora determinada segundo método de Bradford et al.⁽¹⁶⁾ As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão Laemmli, contendo 100mmol/L de ditioneitol (DTT),⁽¹⁷⁾ e realizou-se a determinação do *immunoblotting* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250 μ g de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, posteriormente, foram transferidas para membranas de nitrocelulose via eletroforese. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos anti-pAKT, glutatona peroxidase (GPx) e beta-actina adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA), sob agitação constante, durante a noite, a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas, à temperatura ambiente.

Após, as membranas foram incubadas por 2 minutos em substrato enzimático e expostas ao filme de raios X em cassete de revelação radiográfica. A intensidade das bandas foi determinada por meio da leitura das radiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um scanner (HP G2710) e o programa ImageJ.

Diclorohidrofluoresceína

A oxidação do 2'7'diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA) pelas células causa a fluorescência da difluoresceína (DCF), que pode facilmente ser lida em espectrofotômetro. Neste ensaio, 100 μ L de água e 75 μ L de DCFH-DA foram adicionados a 25 μ L de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria a 37°C ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração, onde se utilizou como padrão o DCFH-DA 0,1 μ M diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos 30 minutos, foram feitas as leituras no espectrofotômetro (525nm excitação e 488nm de emissão), sendo os resultados expressos em nmol de DCF por mg de proteínas.⁽¹⁸⁾

Indicador de formação de óxido nítrico

Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naftil) etilenodiamina) em temperatura ambiente, por 10 minutos, e a absorbância foi medida a 540nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base em uma curva padrão de 0 a 100nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em μ mol nitrito/mg proteína.⁽¹⁹⁾

Carbonilação de proteínas

O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al.⁽²⁰⁾ Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000M⁻¹cm⁻¹.

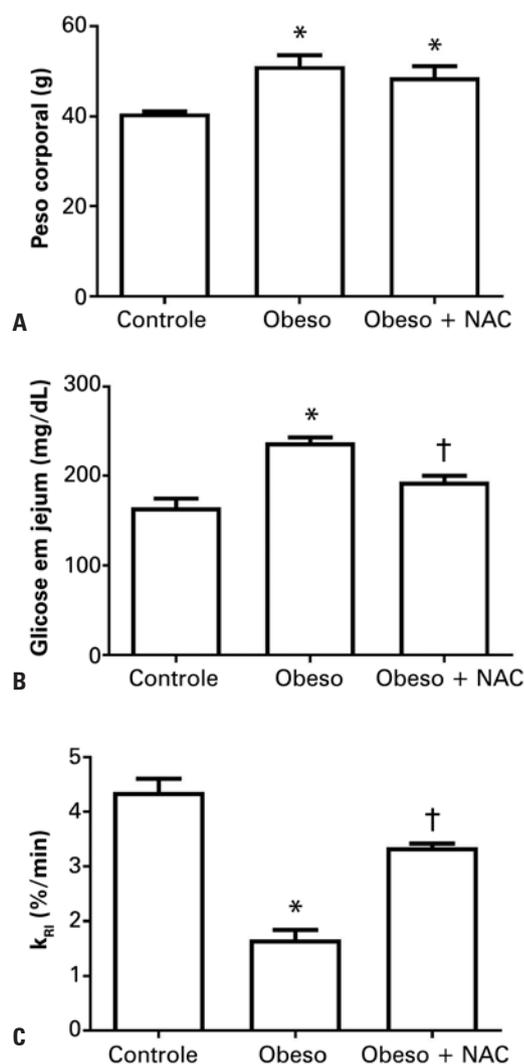
Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* Bonferroni. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism® (versão 5.00) para Microsoft Windows®.

RESULTADOS

Peso corporal e glicemia em jejum

A avaliação dos efeitos da suplementação de NAC sobre o peso corporal, da glicemia em jejum e da tolerância à insulina em camundongos obesos está ilustrada na figura 1. Como esperado, a alimentação dos camundongos com dieta hiperlipídica foi eficiente em aumentar o peso corporal dos camundongos; a administração do antioxidante NAC não alterou tal parâmetro nos camundongos, o qual permaneceu elevado de modo significativo em relação ao Grupo Controle (Figura 1A). Os níveis glicêmicos em jejum dos camundongos obesos foram maiores quando comparados ao Controle. A administração de NAC reduziu os níveis glicêmicos de jejum no Grupo Tratado com NAC, em relação ao Grupo Obeso (Figura 1B).



* $p < 0,05$ versus Grupo Controle; † $p < 0,05$ versus Grupo Obeso.

NAC: Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína; k_{RI} : velocidade constante de decaimento da glicose.

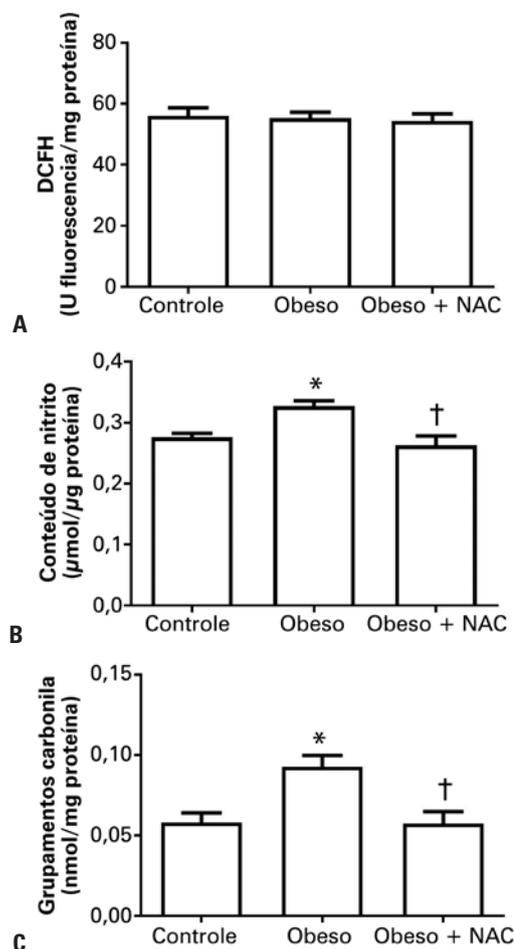
Figura 1. Efeitos da suplementação de N-acetilcisteína sobre o peso corporal, glicemia em jejum e tolerância à insulina em camundongos obesos

Teste de tolerância à insulina

Para avaliar-se a sensibilidade à insulina entre os grupos estudados, utilizou-se a constante de decaimento da glicemia (k_{RI}). A obesidade reduziu significativamente os valores de k_{RI} quando comparado ao Grupo Controle. Por outro lado, o tratamento com antioxidante NAC reverteu esse efeito significativamente (Figura 1C).

Produção de espécies reativas no tecido cardíaco

Os efeitos do antioxidante NAC sobre a produção de espécies reativas pelas técnicas de DCF e óxido nítrico (NO), e sob o dano oxidativo no tecido cardíaco de camundongos obesos, estão mais bem ilustrados na figura 2. Nenhuma diferença entre os três grupos foi encontrada quanto aos níveis de DCF (Figura 2A). No entanto, observaram-se aumento da concentração de nitrito no Grupo Obeso e redução desta concentração quando o Grupo Obeso recebeu a NAC (Figura 2B).



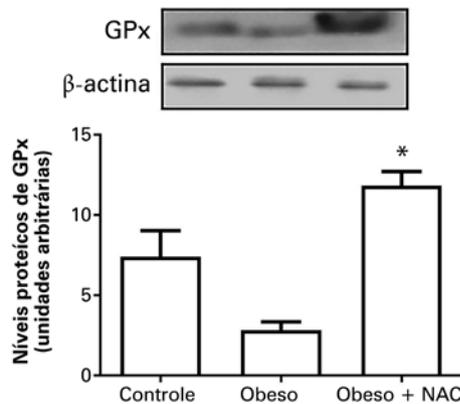
* $p < 0,05$ versus Grupo Controle; † $p < 0,05$ versus Grupo Obeso.

DCFH: Diclorofluoresceína; NAC: Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína.

Figura 2. Efeitos da administração de N-acetilcisteína sobre os níveis de diclorofluoresceína, nitrito e carbonil no tecido cardíaco de camundongos obesos

Defesa antioxidante e dano oxidativo

Avaliou-se carbonil como marcador de dano oxidativo. Observou-se aumento na carbonilação de proteínas no Grupo Obeso quando comparado ao Controle. O uso de NAC reduziu significativamente este parâmetro (Figura 2C). Resultados similares foram observados quando se analisou a expressão da GPx. Os níveis proteicos de GPx não se alteraram significativamente no Grupo Obeso. No entanto, a administração do antioxidante NAC elevou marcadamente os níveis proteicos dessa enzima (Figura 3).



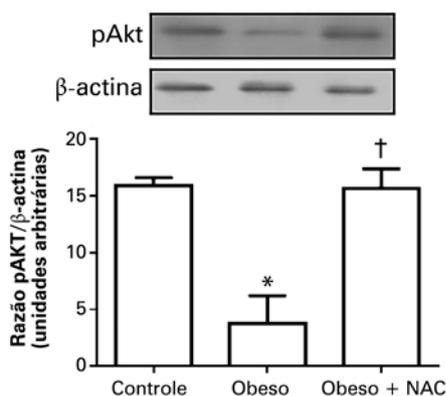
* $p < 0,05$ versus Grupo Obeso.

GPx: glutatona peroxidase; NAC: Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína.

Figura 3. Efeitos da administração de N-acetilcisteína sobre os níveis proteicos de glutatona peroxidase no tecido cardíaco de camundongos obesos

Efeitos do N-acetilcisteína sob a sinalização da insulina

Avaliaram-se os níveis proteicos de Akt fosforilada, como marcador da via de transdução da insulina. Os resultados mostraram que a obesidade reduziu significativamente os níveis proteicos da fosforilação da Akt, quando comparado ao Grupo Controle. Por outro lado, o tratamento com NAC mostrou-se eficaz em elevar os níveis da Akt fosforilada no tecido cardíaco a valores similares ao Grupo Controle (Figura 4).



* $p < 0,05$ versus Grupo Controle; † $p < 0,05$ versus Grupo Obeso.

pAKT: proteína quinase B fosforilada; NAC: Grupo Obeso Tratado com N-acetilcisteína.

Figura 4. Efeitos da administração de N-acetilcisteína sobre os níveis proteicos da proteína quinase B fosforilada no tecido cardíaco de camundongos obesos

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o estresse oxidativo e sua influência sobre a sinalização da insulina em miocárdio de camundongos obesos. Metodologicamente, optou-se, para isso, tratar os animais com o antioxidante NAC.

Nossos resultados mostram que o tratamento com NAC foi capaz de atenuar a produção de espécies reativas, diminuir danos oxidativos às proteínas, elevar os níveis proteicos de GPx e ainda alterar a fosforilação da proteína Akt (proteína crucial envolvida na sinalização da insulina). Tais resultados permitem sugerir que, na obesidade, ocorre aumento do estresse oxidativo, o que pode influenciar e afetar a sinalização celular insulínica, ao menos no miocárdio de camundongos obesos.

Utilizamos a dieta hiperlipídica como modelo para indução da obesidade.⁽²¹⁾ No presente estudo, a dieta rica em gordura foi eficiente em elevar o peso corporal nos animais do Grupo Obeso. A administração do antioxidante NAC não alterou significativamente o peso corporal desses animais. Por outro lado, quando NAC foi administrada de forma concomitante à oferta da dieta rica em gordura, Ma et al.,⁽²²⁾ observaram redução do peso corporal do Grupo Tratado com NAC, comparado com o Grupo Obeso não tratado.

Animais obesos apresentaram maiores níveis sanguíneos de glicose em jejum quando comparado ao Grupo Controle. O aumento da glicemia em jejum nos animais obesos sugeriu instalação da resistência corporal à insulina. Ao realizar o teste de tolerância à insulina, verificou-se que a sensibilidade à insulina foi, de fato, significativamente diminuída no Grupo Obeso. Interessantemente, quando suplementado com NAC, houve redução da glicemia em jejum, bem como aumento da sensibilidade à insulina. Estudo desenvolvido por Zheng et al.,⁽²³⁾ administrando o NAC por 5 meses via oral diluído na água de beber mostrou resultados similares. Camundongos obesos que receberam NAC por 5 meses tiveram melhora no quadro glicêmico de jejum, bem como melhor tolerância à glicose, evidência que reforça a participação do estresse oxidativo sob a fisiopatologia da resistência à insulina.

Zafirovic et al.,⁽²⁴⁾ mostraram que a obesidade, além de prejudicar a captação de glicose e a sinalização da insulina no coração, eleva, via aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a produção de NO neste órgão.⁽²⁴⁾ O NO é um importante vasodilatador e influencia diretamente na contratilidade cardíaca.⁽²⁵⁾ Porém, no ponto de vista bioquímico, o NO pode reagir com o ânion superóxido impedindo de ser dismutado pela superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 . No presente estudo, embora não tenham sido observadas alterações significativas no nível de DCFH, houve au-

mento de espécies reativas no Grupo Obeso (ao menos de nitrogênio), e a administração de NAC reduziu tais parâmetros.

Devido à capacidade de reação do NO com o ânion superóxido, ocorre desvio na reação, que favorece a produção de peróxido nítrico via NO e diminui a formação de H₂O₂ (principal reagente na técnica do dicloro-hidrofluoresceína). Assim, é possível que a manutenção dos níveis de DCFH seja justamente devida ao fato de haver este desvio na reação provocado pelo aumento de NO. Em adição, embora a atividade de neutralização direta de espécies reativas (*scavenger*) do NAC seja significativamente menor do que a ação das enzimas antioxidantes como SOD, catalase e GPx, o NAC também pode exercer esta função e prevenir o desenvolvimento de estresse oxidativo.⁽¹⁵⁾

O aumento de espécies reativas relaciona-se com o dano oxidativo a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Para saber se a obesidade está relacionada ao aumento de dano proteico, avaliou-se o conteúdo de carbonil no tecido cardíaco, o qual estava elevado no Grupo Obeso. De fato, analisando o tecido cardíaco de camundongos obesos, Li et al.,⁽²⁶⁾ demonstraram que, na obesidade, ocorre aumento de dano oxidativo em proteínas.⁽²⁶⁾ Segundo Guo et al.,⁽²⁷⁾ a obesidade é capaz de elevar significativamente a expressão de subunidades do complexo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH oxidase), principal gerador de ERO no tecido cardíaco.⁽²⁷⁾ Utilizando o NAC, estes autores observaram menor translocação da subunidade p67 para a membrana e concluíram que a administração de NAC reduz danos à proteína por meio da redução da atividade da NADPH oxidase em tecido cardíaco de ratos obesos.

No presente estudo, avaliaram-se os níveis proteicos da GPx como indicativo de atividade antioxidante. A obesidade reduziu os níveis proteicos de GPx, embora não de maneira significativa. O tratamento com NAC foi capaz de elevar os níveis proteicos desta enzima. Segundo Lavoie et al.,⁽²⁸⁾ a administração oral de NAC aumenta os níveis de cisteína e, conseqüentemente, eleva os níveis de glutathiona reduzida, a GSH, um tripeptídeo composto por glicina, glutamyl e grupamento cisteína.^(14,15) Estudando o sistema de defesa antioxidante em animais obesos, Whiting et al.,⁽²⁹⁾ observaram aumento na produção de radicais livres em ratos obesos hiperglicêmicos, o que foi relacionado com menores níveis de GPx plasmática e eritrocitária.⁽²⁹⁾ Em adição, estudo realizado por Ballal et al.,⁽³⁰⁾ mostrou reduzidos níveis de GPx em tecido cardíaco de ratos obesos.⁽³⁰⁾ Alguns estudos têm demonstrado que o aumento do estresse oxidativo pode prejudicar a sinalização da insulina.⁽³¹⁻³³⁾ No

entanto, há, também, estudo demonstrando que o aumento de ERO pode elevar a sensibilidade à insulina.⁽³⁴⁾ Esses achados contraditórios na literatura sugerem que a relação entre estresse oxidativo e sensibilidade à insulina ainda não está elucidada e merece maiores investigações.

No presente estudo, utilizando a fosforilação da Akt como marcador da sinalização da insulina, observou-se que a obesidade reduziu significativamente a expressão da Akt no tecido cardíaco de camundongos obesos. Estudando a Akt no miocárdio de roedores, DeBosch et al.,⁽³⁵⁾ e Shiojima et al.,⁽³⁶⁾ relataram que a atividade desta proteína pode ser regulada pela insulina, pelo estado nutricional e pelo estado redox. Usando a fosforilação de Akt como marcador miocárdico de RI, Whaley-Connell et al.,⁽³⁷⁾ reportaram que a produção de oxidantes está inversamente associada à sensibilidade à insulina.⁽³⁷⁾ Com o intuito de verificar esta informação, administrou-se, nos camundongos obesos, o antioxidante NAC, elevando-se, assim, a expressão da proteína pAKT de modo significativo em relação ao Grupo Obeso. Embora o exato mecanismo de como isso ocorra não esteja claro na literatura, acredita-se que o aumento do processo inflamatório, muito presente na obesidade, possa elevar o estresse oxidativo e prejudicar a sinalização da insulina neste órgão – correlação esta reforçada neste estudo por meio da administração do antioxidante NAC.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a obesidade e/ou a dieta hiperlipídica levam ao estresse oxidativo e à resistência à ação da insulina no tecido cardíaco de camundongos obesos. O uso de N-acetilcisteína como estratégia metodológica e terapêutica sugere relação entre ambos. No entanto, futuros estudos são necessários para avaliar-se a relação causa-efeito entre estresse oxidativo e resistência à insulina, bem como as possíveis alterações fisiológicas resultantes.

AGRADECIMENTOS

Este estudo obteve apoio financeiro da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), através de seu fundo de incentivo e auxílio a pesquisa. Agradecemos também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela manutenção dos recursos humanos, através do fornecimento de bolsas de iniciação científica, mestrado e doutorado, envolvidos com a realização deste estudo.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Rodrigues MS: <http://orcid.org/0000-0002-7794-6588>

Pieri BL: <http://orcid.org/0000-0001-6600-0378>

Silveira GB: <http://orcid.org/0000-0001-8860-7912>

Zaccaron RP: <http://orcid.org/0000-0002-7849-0615>

Venturini LM: <http://orcid.org/0000-0002-7429-6479>

Comin VH: <http://orcid.org/0000-0002-3756-2379>

Luiz KD: <http://orcid.org/0000-0002-4951-9677>

Silveira PC: <http://orcid.org/0000-0003-4908-2257>

REFERÊNCIAS

- Wang Y, Lim H. The global childhood obesity epidemic and the association between socio-economic status and childhood obesity. *Int Rev Psychiatry*. 2012;24(3):176-88. Review.
- Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673-89. Review.
- World Health Organization (WHO). Obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO [cited 2018 May 30]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(4):649-63. Review.
- Authors/Task Force Members, Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J, Patrono C, Seferovic P, Uva MS, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S; Document Reviewers, De Backer G, Sirnes PA, Ezquerra EA, Avogaro A, Badimon L, Baranova E, Baumgartner H, Betteridge J, Ceriello A, Fagard R, Funck-Brentano C, Gulba DC, Hasdai D, Hoes AW, Kjekshus JK, Knuuti J, Kolh P, Lev E, Mueller C, Neyses L, Nilsson PM, Perk J, Ponikowski P, Reiner Z, Sattar N, Schächinger V, Scheen A, Schirmer H, Strömberg A, Sudzhaeva S, Tamargo JL, Viigimaa M, Vlachopoulos C, Xuereb RG. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013;34(39):3035-87. Erratum in: *Eur Heart J*. 2014;35(27):1824.
- Johnson PR, Greenwood MR, Horwitz BA, Stern JS. Animal models of obesity: genetic aspects. *Annu Rev Nutr*. 1991;11:325-53. Review.
- Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421-33.
- Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(4):e60931.
- Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, Lee MK, et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes*. 2005;54(12):3530-40.
- Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Mitsu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008;57(8):1071-7.
- Raza H, John A, Howarth F. Alterations in glutathione redox metabolism, oxidative stress, and mitochondrial function in the left ventricle of elderly Zucker diabetic fatty rat heart. *In J Mol Sci*. 2012;13(12):16241-54.
- Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother*. 1988;42(8):513-9. Review.
- Salamon Š, Kramar B, Marolt TP, Poljsak B, Milisav I. Medical and Dietary Uses of N-Acetylcysteine. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(5).pii:E111. Review.
- Pinho RA, Silveira PC, Silva LA, Luiz Streck E, Dal-Pizzol F, F Moreira JC. N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res*. 2005;99(3):355-60.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(4):355-9. Review.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(5-6): 612-6.
- Chaea SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004;25(5):843-50.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climet I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.
- De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia*. 2005;48(9):1860-71.
- Ma Y, Gao M, Liu D. N-acetylcysteine Protects Mice from High Fat Diet-induced Metabolic Disorders. *Pharm Res*. 2016;33(8):2033-42.
- Zheng J, Yuan X, Zhang C, Jia P, Jiao S, Zhao X, et al. N-Acetylcysteine alleviates gut dysbiosis and glucose metabolic disorder in high-fat diet-induced mice. *J Diabetes*. 2019;11(1):32-45.
- Zafirovic S, Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Jovanovic A, Stanimirovic J, Stewart AJ, et al. 17β-Estradiol protects against the effects of a high fat diet on cardiac glucose, lipid and nitric oxide metabolism in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;446:12-20.
- Kypreos KE, Zafirovic S, Petropoulou PI, Bjelogrić P, Resanovic I, Traish A, et al. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase and High-Density Lipoprotein Quality by Estradiol in Cardiovascular Pathology. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014;19(3):256-68. Review.
- Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*. 2006;49(6):1434-46.
- Guo Z, Xia Z, Jiang J, McNeill JH. Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes, and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats by N-acetyl-L-cysteine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(4):H1728-36.
- Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, et al. Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(9):2187-99.
- Whiting PH, Kalansooriya A, Holbrook I, Haddad F, Jennings PE. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci*. 2008;65(2):71-4.
- Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeier H. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2010;344(1-2):221-30.
- Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008;102(4):401-14. Review.
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007;583(Pt 1):9-24. Review.

33. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 2007;26(1):1-14. Review.
34. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *J Endocrinol*. 2017;233(1):R15-R42. Review.
35. DeBosch, B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113(17):2097-104.
36. Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, et al. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37670-7.
37. Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(1):E355-63.