TAYNÃ CRISTINA TIBURCIO

Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos

São Paulo
2016

TAYNÃ CRISTINA TIBURCIO

**Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática
gordurosa não alcoólica em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Cogliati

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3291
FMVZ

Tiburcio, Taynã Cristina
Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em
camundongos / Taynã Cristina Tiburcio. -- 2016.
123 p. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Fígado. 2. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 3. Esteatohepatite não alcoólica.
4. Comunicação intercelular. 5. Conexina 32. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos", protocolado sob o CEUA nº 3140301115, sob a responsabilidade de **Bruno Cogliati e equipe; Taynã Cristina Tiburcio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 09/12/2015.

We certify that the proposal "Role of connexin 32 in physiopatogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in mice", utilizing 31 Isogenics mice (31 males), 31 Knockout mice (31 males), protocol number CEUA 3140301115, under the responsibility of **Bruno Cogliati and team; Taynã Cristina Tiburcio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 12/09/2015.

Vigência da Proposta: de 02/2014 a 12/2015

Área: Patologia

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia/FMZV - USP

Espécie: Camundongo isogênico

Gênero: Machos

Idade: 8 semanas N: 31

Linhagem: C57BL/6

Peso: 20g

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia/FMZV - USP

Espécie: Camundongo Knockout

Gênero: Machos

Idade: 8 semanas N: 31

Linhagem: Cx32

Peso: 20g

São Paulo, 17 de dezembro de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TIBURCIO, Taynã Cristina

Título: Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Mayra H. Rossini e Ronaldo P. P. Tiburcio Jr***

*Aos meus irmãos **Ariane, Leonardo e Vitor***

*À minha avó **Zelma Scarfone** e meus familiares queridos*

*Ao meu noivo **Eduardo José Giasiano Jr** e enteada **Gabriella Cruz Giasiano***

*Em memória de meus amados avós **Julieta Cardoso Henriques e Ronaldo P. P. Tiburcio**. Gostaria
que estivessem aqui, mas sei que de onde estiverem estão comemorando.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, pois sem a permissão Dele nada seria possível.

*À minha mãe **Mayra** por me ensinar o que é garra, força e dedicação. Por nunca medir esforços por mim.*

*Ao meu pai **Ronaldo** por sempre me apoiar, me ajudar e me aplaudir em todos os momentos de minha vida.*

*Ao meu noivo **Eduardo** e enteada **Gabriella** pelo amor, apoio e compreensão nos períodos em que estive ausente buscando a realização desse sonho.*

*À minha madrastra **Luciana** e padrasto **Hélio** por me ajudarem sempre, me ensinarem que todo amor é bem-vindo e que não é preciso ter o mesmo sangue para estar no coração e nos planos de alguém.*

*Aos meus irmãos **Ariane**, **Leonardo** e **Vitor** e primos por se espelharem em mim e me fazerem sempre querer ser uma pessoa melhor.*

Aos meus tios, padrinhos e familiares meus e de meu noivo por compartilharem comigo os momentos de toda a jornada.

Aos meus amigos por entenderem minha ausência durante esse período e torcerem por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Profº Dr. Bruno Cogliati primeiramente pela confiança e oportunidade e em seguida pelos ensinamentos, disponibilidade e auxílio.

Às pos-doutorandas do LAPMOL Isabel e Tereza pela ajuda, apoio, ensinamentos e paciência em todos os momentos.

À minha querida companheira de mestrado Cíntia pelos pacientes ensinamentos, pela companhia durante esse trajeto e pelas conversas científicas, ou bobas, que tornaram esse período muito divertido.

Às alunas de iniciação científica Bianca, Bruna e Daniele pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

Às companheiras de laboratório Isis, Jenifer, Verônica, Elizangela, Juliana e Shirlei por todos os momentos, científicos ou não.

*Aos colegas e parceiros do Departamento de Toxicologia *in vitro* e dermatocosmetologia da Faculdade de Medicina e Farmácia da Universidade de Bruxelas (Belgica) Mathieu Vinken, Michael Maes, Joost Willebrords e Sara Crespo.*

Ao meu professor da graduação Dr. André Fukushima por me abrir as portas para a pós-graduação.

Ao Pró-Reitor da Universidade São Judas Tadeu Luís Antonio Baffile Leoní e a Coordenadora Elizabeth Egashira pelo apoio e incentivo no início dessa jornada.

Às queridas colegas de departamento Marguíti e Luciana pelos conselhos, amizade e doçura.

À Prof^a Dr^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli por disponibilizar seu laboratório para realização de partes desse trabalho.

À Prof^a Inar Alves de Castro e às colegas Marina Nogueira e Fernanda Santana pelo auxílio prestado a esse estudo.

Ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada e seus funcionários.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais, que participaram desse experimento em benefício da ciência.

Meus profundos e sinceros agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente participaram dessa jornada em busca de um sonho.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

Galileu Galilei

RESUMO

TIBURCIO, T.C. **Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos.**[Role of connexin 32 in physiopatogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in mice]2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) abrange alterações desde esteatose até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A DHGNA é considerada a doença hepática mais comum na atualidade e com prevalência mundial alarmante. Esta doença caracteriza-se, basicamente, pela deposição de triglicérides nos hepatócitos, podendo evoluir com inflamação e fibrose, e está intimamente associada com resistência à insulina (RI), diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade. Os hepatócitos representam as principais células hepáticas e se comunicam através de junções do tipo *gap*, formadas principalmente por conexina 32 (Cx32). Esta proteína apresenta importante função no controle da homeostase tecidual, regulando processos fisiológicos e tem sido associada como agente protetor na hepatocarcinogênese e outros processos patológicos, porém pouco se sabe sobre sua participação na DHGNA. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da Cx32 na fisiopatogênese da DHGNA, utilizando camundongos *knockout* para Cx32 (Cx32-KO) submetidos a uma dieta hiperlipídica deficiente em colina. Foram analisados dados biométricos, histopatológicos, função hepática, RI, citocinas inflamatórias, adipocinas, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e a expressão de genes envolvidos na DHGNA. Os animais Cx32-KO apresentaram maior acúmulo de triglicérides hepáticos em relação aos animais selvagens e, conseqüentemente, maior peso absoluto e relativo do fígado. Adicionalmente, apresentaram maior inflamação hepática demonstrado pela exacerbação da citocina TNF- α e supressão da IL-10, maior dano hepatocelular indicado pelo aumento das enzimas AST e ALT, aumento da peroxidação lipídica e alterações na expressão de genes chaves na fisiopatogênese da DHGNA, como SREBP1c. No entanto, não houve diferença nos marcadores histopatológicos, RI e estresse oxidativo hepático. Por fim, os animais Cx32-KO apresentaram maior produção de leptina e adiponectina no tecido adiposo. Todos esses resultados revelam que a Cx32 pode atuar como um agente protetor ao desenvolvimento da DHGNA, sugerindo seu potencial como novo alvo terapêutico.

Palavras-chave: Fígado. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Esteato-hepatite não alcoólica. Comunicação intercelular. Conexina 32.

ABSTRACT

TIBURCIO, T.C. **Role of connexin 32 in physiopatogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in mice.** [Participação da conexina 32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos].2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) covers a spectrum of liver diseases ranging from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. NAFLD is currently the most common liver disease in the world with an alarming prevalence worldwide. This disease is characterized by the deposition of triglycerides in hepatocytes and can develop inflammation and fibrosis. NAFLD is closely associated with insulin resistance (IR), type 2 diabetes mellitus and obesity. The *gap* junctions mediate intercellular communication and are critical for maintaining integral cellular processes. In hepatocytes, the major type of liver cells, the gap junctions are formed mainly by connexin 32 (Cx32). This protein is important for the control of tissue homeostasis and for physiological processes regulation. It has been linked as a protective agent in hepatocarcinogenesis and other pathological processes. However, little is known about its role on NAFLD. Thus, the aim of this study was to evaluate the participation of Cx32 in the pathogenesis of NAFLD using WT and Cx32-knockout mice (Cx32-KO) subjected to a high-fat diet deficient in choline. NAFLD was evaluated based on a battery of clinically relevant read-outs, including histopathological examination, inflammatory cytokines, liver damage markers, in-depth lipid analysis, assessment of oxidative stress, insulin and glucose tolerance and lipid-related biomarkers. The Cx32-KO animals showed higher accumulation of hepatic triglycerides, increased inflammation and lipid peroxidation and increased production of leptin and adiponectin in the adipose tissue when compared with WT. Moreover, there was no difference in histopathological markers, RI and hepatic oxidative stress. Taken together, all these results show that Cx32 is a protective agent to the development of the disease, suggesting its potential as a novel therapeutic target in NAFLD.

Keywords: Liver. Nonalcoholic fatty liver disease. Nonalcoholic steatohepatitis. Intercellular communication. Connexin32.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de organização das junções comunicantes	21
Figura 2 - Estágios da progressão da DHGNA.....	25
Figura 3 - Aspectos histológicos da DHGNA	25
Figura 4 - Consumo calórico mundial nos anos de 1991 e 2001	26
Figura 5 - Metabolismo lipídico nos hepatócitos	30
Figura 6 - Efeitos da resistência insulínica no metabolismo lipídico nos hepatócitos	32
Figura 7 - Mecanismos do estresse oxidativo no fígado na DHGNA	35
Figura 8 - Representação esquemática das possibilidades de arranjos entre as conexinas para formação de <i>conexons</i> e destes para formação de canais intercelulares	40
Figura 9 - Representação da estrutura transmembranar das conexinas	41
Figura 10 - Expressão das principais conexinas nos tipos celulares hepáticos de roedores e humanos	45
Figura 11 - Imunofluorescência para Cx32 em tecido humano e animal	46
Figura 12 - Testes de tolerância à glicose e à insulina	69
Figura 13 - Níveis plasmáticos de insulina.....	70
Figura 14- Aspectos macroscópicos e biométricos do fígado	71
Figura 15 - Peso relativo das gorduras retroperitoniais e epididimais	72
Figura 16 - Classificação histopatológica da DHGNA	73
Figura 17 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos.....	74
Figura 18 - Ácidos graxos totais.....	75
Figura 19 - Imunohistoquímica e <i>Western blot</i> para PCNA.....	77
Figura 20 - Dosagem das adipocinas leptina e adiponectina no tecido adiposo.....	78
Figura 21 - Dosagem de citocinas inflamatórias no tecido hepático	79
Figura 22 - Dosagem de IFN- γ plasmático.....	80
Figura 23 - Dosagem de citocinas inflamatórias no tecido adiposo	81
Figura 24 - Dosagem de moléculas associadas ao estresse oxidativo hepático.....	82
Figura 25 - Genes diferentemente expressos no tecido hepático	83
 Apêndice A - Lista de genes investigados.....	 122
 Quadro 1 - Principais conexinas descritas e sua distribuição nos diferentes tipos celulares e tecidos humanos	 42
Quadro 2 - Alterações genéticas relacionadas a mutações em genes que codificam conexinas em seres humanos, e o fenótipo destas mutações em camundongos <i>knockouts</i>	44
Quadro 3- Parâmetros para classificação histopatológica e cálculo do índice de atividade histológica (NAS) na doença hepática gordurosa não alcoólica experimental	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Níveis nutricionais da dieta por quilo de ração oferecida para os camundongos durante 8 semanas para indução de DHGNA	52
Tabela 2 - Diluições utilizadas das amostras para cada citocina analisada	62
Tabela 3 - Diluição utilizada para cada adipocinas analisada	62
Tabela 4 - Peso corpóreo inicial e final dos animais WT e Cx32-KO	70
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos no tecido hepático	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AASLD	Associação americana para o estudo das doenças do fígado
ACC	Acetil-coa carboxilase
Acil-CoA	Colesterol aciltransferase
ACS	Acetil-coa sintetase
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Alanina aminotransferase
ApoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
cDNA	DNA complementar
CG	Cromatografia gasosa
CHC	Carcinoma hepatocelular
ChREBP	Proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato
CIBio	Comissão interna de biossegurança
CPD	Complexo da piruvato desidrogenase
CTP	Carnitina palmitoiltransferase 1
Cx	Conexinas
Cx32-KO	<i>Knockout</i> para cx32
Cx32-Tg	Cx32 transgênicos dominante negativo

DEN	Dietilnitrosamina
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENA	Esteatose não alcoólica simples
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídio
FAS	Ácido graxo sintetase
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FXR	Fanesoid x receptor
GJ	<i>Gap junction</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GTT	Testes de tolerância à glicose
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HE	Hematoxilina/eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
i.p.	Intraperitoneal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

IFN- γ	Interferon γ
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteína ligante de fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
ITT	Testes de tolerância à insulina
JNK	C-jun quinase
LAPMOL	Laboratório de Patologia Morfologia e Molecular
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIPC	Lipase hepática
MDA	Malondialdeído
MTP	Triglicérides microssomal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NAS	<i>Nafla activity score</i>
NF κ B	Fator nuclear kappa β
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase 4

PKC-3	Proteína quinase c
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PXP	Pregnane x receptor
RI	Resistência insulínica
SOD	Superoxido dismutase
SREBP	Proteína de ligação a elemento regulador de esterol
TG	Triglicérides
TNF- α	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
VPT	Departamento de Patologia Experimental e Comparada
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Camundongos selvagens

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA).....	24
2.1.1	Contextualização e Epidemiologia	24
2.1.2	Fisiopatogênese	27
2.1.2.1	Metabolismo lipídico.....	28
2.1.2.2	Resistência Insulínica.....	31
2.1.2.3	Estresse Oxidativo e Peroxidação Lipídica.....	33
2.1.3	Diagnóstico e Terapêutica da DHGNA	35
2.1.4	Modelos Experimentais.....	37
2.2	COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES GAP E CONEXINAS	39
2.2.2	Conexinas no fígado	44
2.2.3	Conexinas nas doenças hepáticas	46
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVOS GERAIS	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1	ANIMAIS	50
4.2	GENOTIPAGEM	50
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
4.4	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	52
4.5	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT).....	53
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	53
4.7	DOSAGEM DE INSULINA PLASMÁTICA	54
4.8	BIOMETRIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	54
4.9	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	55
4.10	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	55
4.10.1	Classificação histopatológica da DHGNA.....	55
4.10.2	Avaliação histológica da gordura hepática	56
4.10.3	Imunohistoquímica para PCNA	57
4.11	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	57

4.12	WESTERN BLOT PARA PCNA	58
4.13	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES HEPÁTICOS.....	59
4.14	QUANTIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS HEPÁTICOS ...	59
4.15	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA	61
4.15.1	Citocinas IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-1β, TNF-α	61
4.15.2	Leptina e adiponectina.....	62
4.15.3	Análise de dados dos ELISA.....	63
4.16	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO.....	63
4.16.1	Enzimas do metabolismo oxidativo	63
4.16.2	Concentração de Malondialdeído (MDA)	65
4.17	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA (PCR ARRAY)	66
4.17.1	Extração de RNA.....	66
4.17.2	Quantificação e determinação da integridade do RNA total	66
4.17.3	Transcrição reversa (cDNA).....	67
4.17.4	PCR-Array.....	67
4.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5	RESULTADOS.....	69
5.1	DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO INTERFERE NA RESISTÊNCIA À INSULINA	69
5.2	DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA O PESO CORPORAL, MAS AUMENTA OS PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DO FÍGADO	70
5.3	DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA OS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA DHGNA	72
5.4	DEFICIÊNCIA DE CX32 AUMENTA LESÃO HEPATOCELULAR E COLESTEROL TOTAL CIRCULANTE.....	74
5.5	DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES NO FÍGADO	75
5.6	DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO FÍGADO APÓS INDUÇÃO DA DHGNA	76
5.7	DEFICIÊNCIA DE CX32 REDUZ NÍVEIS DE LEPTINA E ADIPONECTINA NO TECIDO ADIPOSEO	77
5.8	DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA A LIBERAÇÃO DE CITOCINA INFLAMATÓRIAS NO PLASMA E TECIDOS HEPÁTICO E ADIPOSEO.	78
5.9	DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO, PORÉM EXACERBA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	81
5.10	DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES CHAVES ENVOLVIDOS NA DHGNA	83

6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão central que realiza múltiplas funções especializadas, possui grande capacidade de reparação tecidual e suas atividades metabólicas são reguladas de acordo com as necessidades do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Diversos tipos celulares trabalham em perfeita harmonia para que as atividades metabólicas e fisiológicas hepáticas sejam cumpridas, por isso, é imprescindível que as células possuam mecanismos eficientes para se comunicarem. A comunicação celular pode ocorrer pelas vias extra, inter ou intracelulares (VINKEN et al., 2008). Para que ocorra a comunicação intercelular, são necessários canais que permitam a passagem de mensageiros secundários entre as células, tais como íons, cAMP, etc. Esses canais intercelulares, quando conectados, são chamados de junções comunicantes do tipo *gap* e estão presente na maioria dos tecidos de vertebrado, com exceção de hemácias, fibras musculares esqueléticas maduras, plaquetas, espermatozoides e alguns neurônios (MESNIL et al., 2005).

As junções comunicantes do tipo *gap* são regiões especializadas da membrana plasmática que formam canais justapostos entre duas células adjacentes e permitem o transito de pequenas moléculas e íons (Figura 1).

Figura 1 – Modelo de organização das junções comunicantes

Legenda: Modelo de organização da placa juncional a partir de estudos de microscopia eletrônica e de estudos de difração de raios X de junções *gap* no fígado de camundongos. Os conexons (círculo vermelho) são formados por seis subunidades proteicas chamadas conexinas (representadas em amarelo e azul) que formam um poro central (rosa) e está estritamente associado a outro *conexon* na membrana adjacente. Adaptado de (MAKOWSKI et al., 1977).

Os canais comunicantes do tipo *gap* são compostos por uma estrutura básica denominada *conexons* ou hemicanais, os quais, por sua vez, são compostos por 6 subunidades proteicas, denominadas *conexinas* (Cx). A nomenclatura das *conexinas* é baseada em seu peso molecular em kDa, precedida do termo Cx (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996). No tecido hepático, a comunicação intercelular é mediada por Cx26 e Cx32 nos hepatócitos, principalmente por Cx43 nas células não parenquimatosas e por Cx40 e Cx37 nas células endoteliais dos vasos hepáticos (VINKEN et al., 2008).

A Cx32 é a mais expressa no fígado e suas junções tem grande importância em vários processos fisiológicos, como na glicogenólise (STÜMPEL et al., 1998), secreção de albumina (YANG; ICHIKAWA; TSUCHIYA, 2003) e secreção biliar (TEMME et al., 2001). Da mesma forma, estudos demonstraram capacidade protetora da Cx32 na hepatocarcinogênese, assim como a diminuição de sua expressão de acordo com a progressão neoplásica (MA et al., 2002). Em hepatites crônicas também se observa a diminuição da expressão da Cx32 (YAMAOKA et al., 2000; NAKASHIMA et al., 2004), comprovando que as comunicações celulares mediadas por junções *gap* também apresentam participação fundamental na fisiopatologia das doenças hepáticas. Sabe-se que os níveis de Cx32 e a atividade das junções *gap* são drasticamente reduzidas em situações de hepatotoxicidade aguda induzida por drogas, colestase, hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (NAKASHIMA et al., 2004; VINKEN, 2012). Recentemente, um estudo demonstrou aumento de esteatose em ratos transgênicos negativos dominantes para Cx32, indicando um papel protetor dessa proteína na progressão da doença (SAGAWA et al., 2015). No entanto, a participação da Cx32 na esteatose hepática e doenças relacionadas ainda precisa ser melhor compreendido.

Por muitos anos, as hepatites virais, causadas pelos vírus da hepatite B ou C, e o etilismo foram as maiores causas de mortalidade por doenças hepáticas crônicas em todo o mundo. Nas últimas décadas, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem sido reconhecida como a forma mais prevalente de doença hepática crônica no mundo moderno, a qual está diretamente relacionada ao aumento progressivo da obesidade (ARAB et al., 2014). Assim, atualmente a DHGNA é considerada uma epidemia mundial, com mais de um bilhão de pacientes no mundo, tornando-se um grave problema de saúde pública (LOOMBA; SANYAL, 2013). A DHGNA refere-se a um amplo conjunto de danos no fígado, sendo inicialmente caracterizada pelo acúmulo de lipídeos em $\geq 5\%$ dos hepatócitos (esteatose simples) em pacientes que não possuem histórico de consumo de álcool. No entanto, esta forma pode evoluir para estágios mais agressivos da doença, como a esteato-hepatite não

alcoólica (EHNA), associada com inflamação, fibrose, cirrose e até carcinoma hepatocelular.(ARAB et al., 2014).

Na população ocidental, a prevalência da DHGNA é de 20-30% e de EHNA é de aproximadamente 3%, porém se algum dos fatores de risco como diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, resistência insulínica e hipertensão arterial estiverem presentes, a prevalência de DHGNA e EHNA sobe para 75% e 15-50%, respectivamente. Cerca de 5% a 20% dos pacientes com DHGNA podem desenvolver EHNA, dos quais 10 a 20% desenvolvem fibrose. A cirrose ocorre em menos de 5% dos pacientes com fibrose e, por sua vez, o CHC ocorre em cerca de 2% destes pacientes(WEIB; RAU; GEIER, 2014).No Brasil, a prevalência da DHGNA não é conhecida, devido ao pequeno número de estudos no país,porém alguns estudos avaliaram a presença da esteatose hepática através de ultrassonografia abdominal. Parise et al.(2003) relataram a prevalência de 19,2% de esteatose hepática em 1804 pacientes da cidade de São Paulo. Em um estudo multicêntrico, Boente et al.(2007) apresentaram a prevalência de 18% de esteatose hepática em 3156 ultrassons de abdômen superior avaliados.

Como a maioria dos pacientes com DHGNA estão com sobrepeso ou são obesos, a perda gradual de peso é defendida como a primeira intervenção terapêutica. Apesar da crescente prevalência e incidência mundial da DHGNA, ainda são necessários mais estudos para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos (HARDY; ANSTEE; DAY, 2015).Tendo em vista a importância da DHGNA e a função da Cx32 na manutenção da homeostase hepática, o presente estudo pretende elucidar a participação desta proteína no desenvolvimento da DHGNA em um modelo experimental murino, avaliando sua participação no metabolismo lipídico, estresse oxidativo, inflamação, resistência insulínica e expressão de genes relacionados a essa doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença hepática gordurosa não alcoólica é considerada a doença crônica mais comum do fígado, sendo um grande problema de saúde pública com prevalência alarmante na população mundial (LOOMBA; SANYAL, 2013). Essa doença traz prejuízos econômicos e sociais, estima-se um aumento considerável nos custos relacionados a ela nos próximos anos (COREY; KAPLAN, 2014). As conexinas, unidades proteicas responsáveis pela comunicação intercelular do tipo *gap*, possuem importância reconhecida em processos fisiológicos e patológicos hepáticos, principalmente a conexina 32. Neste contexto, esta revisão de literatura abordará os principais aspectos da doença hepática gordurosa não alcoólica, assim como a participação das conexinas em processos fisiológicos e patológicos.

2.1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA)

2.1.1 Contextualização e Epidemiologia

Pode-se definir a DHGNA como o acúmulo de gordura no fígado em mais de 5% dos hepatócitos, na ausência de consumo crônico de álcool (YILMAZ, 2012). Essa doença engloba várias alterações histológicas hepáticas, que vão desde uma esteatose simples (ENA) até formas mais agressivas da doença (DAM-LARSEN et al., 2004). A esteatose simples pode evoluir para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose, e até mesmo originar o carcinoma hepatocelular (CHC) (POWELL et al., 1990; FALCK-YTTER et al., 2001) (Figura 2). Histologicamente, além da esteatose, a EHNA é caracterizada por balonização hepatocelular e infiltrado inflamatório lobular, podendo apresentar também corpúsculos de Mallory e fibrose pericelular (BRUNT, 2005) (Figura 3).

Figura 2 - Estágios da progressão da DHGNA

Fonte: <http://galmedpharma.com/>

A EHNA apresenta significativa importância clínica, principalmente por representar uma doença hepática crônica relativamente agressiva e com capacidade de levar o indivíduo a falência hepática pelo desenvolvimento de cirrose e do CHC (MARRA, 2004). A cirrose hepática associada à infecção pelo vírus da hepatite C ainda é considerada a maior causa dos transplantes hepáticos nos Estados Unidos. No entanto, com o aumento da prevalência da DHGNA, prevê-se que a indicação de transplantes associados às formas mais graves desta doença também aumente nos próximos anos (AHMED, 2015). Entre 5% e 20% dos pacientes com esteatose simples progridem para EHNA e, aproximadamente 10 a 20% desenvolvem fibrose. A cirrose ocorre em menos de 5% dos pacientes com fibrose, e dentre eles 2% desenvolvem CHC (WEIß; RAU; GEIER, 2014).

Figura 3- Aspectos histológicos da DHGNA

Fonte: (FARRELL et al., 2005)

Legenda: Fotomicrografia da progressão da DHGNA no tecido hepático. (A) Esteatose hepatocelular, predominantemente macrogoticular. Hematoxilina-eosina. (B) Infiltrado inflamatório lobular e balonização de hepatócitos. Hematoxilina-eosina. (C) Fibrose pericelular, demonstrando as fibras colágenas coradas em vermelho ao redor de pequenos grupos de hepatócitos. Picrossírius.

A DHGNA está intimamente relacionada ao crescimento progressivo da obesidade na população em geral, transformando-a em uma epidemia com grande impacto em saúde pública

(TESSARI et al., 2009). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 1,9 bilhões de indivíduos estejam acima do peso ideal ($IMC > 25$), sendo 600 milhões considerados obesos ($IMC > 30$). Neste contexto, é evidente a grande mudança de hábitos da população nas últimas décadas, principalmente em países desenvolvidos e/ou em desenvolvimento (Figura 4). O aumento do sedentarismo e os maus hábitos alimentares contribuem para o aparecimento de diversas doenças crônicas, entre elas a DHGNA. Além da obesidade, outros fatores de risco contribuem diretamente na patogênese desta doença, tais como diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência insulínica e hiperglicemia, os quais caracterizam a síndrome metabólica (MARCHESINI et al., 2003).

Figura 4– Consumo calórico mundial nos anos de 1991 e 2001

Fonte: World Health Organization (WHO), 2015

Legenda: Estimativa de consumo calórico mundial em (A) 1991 (B) 2001. Em apenas 10 anos, nota-se aumento no fornecimento energético pela dieta da população de países como Brasil, China e países africanos.

Em relação aos dados epidemiológicos, estima-se que 6 a 17% da população dos Estados Unidos possua DHGNA, principalmente devido aos altos índices de obesidade e sobrepeso nesta população. Em países europeus, a prevalência de DHGNA varia de 20% a 30% (BLACHIER et al., 2013), em países orientais ainda não existem estudos epidemiológicos conclusivos sobre a DHGNA, porém estima-se uma prevalência de 11% (HASSAN et al., 2014). No Brasil, não há dados oficiais sobre a prevalência desta doença na população geral. No entanto, alguns estudos determinaram a frequência de esteatose hepática pela ultrassonografia abdominal. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, a prevalência da esteatose hepática foi de 19,2% (PARISE et al., 2003). Um estudo multicêntrico semelhante relatou prevalência de 18,1%, dos quais 56,2% eram indivíduos do sexo masculino. Ainda, foi observado obesidade ou sobrepeso e diabetes *mellitus*, respectivamente, em 45,5% e 15,7% dos pacientes diagnosticados com DHGNA (COTRIM et al., 2011).

Outro estudo avaliou as principais características de 1280 pacientes com DHGNA, distribuídos pelas cinco regiões brasileiras. Este estudo demonstrou que a doença é mais frequente em pessoas com idade média de 50 ± 13 anos, homens (53,3%), geralmente é assintomática (85%) e seus principais fatores de risco são a obesidade (44,7%) e a dislipidemia (66,8%) (COTRIM et al., 2011). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, Chaves et al. (2009) relataram que entre os pacientes com obesidade grau III submetidos à cirurgia bariátrica, a prevalência de DHGNA foi de 100%, sendo que 40% apresentava esteatose simples, 17,5% esteatose moderada, 37,5% EHNA e 5% cirrose hepática.

2.1.2 Fisiopatogênese

Os fatores responsáveis pela evolução da esteatose para esteato-hepatite não alcoólica são motivo de grande investigação e especulação. O modelo de dois golpes (“*two hits*”) foi proposto por Day e James (1998) para tentar fornecer uma base fisiopatológica para a progressão do dano hepático na DHGNA. Segundo esse modelo, o primeiro *hit* refere-se ao acúmulo de ácidos graxos (AG) nos hepatócitos causado pelo desequilíbrio entre o influxo e síntese de lipídeos e a beta oxidação e exportação dos mesmos. O fígado, então, se torna vulnerável ao chamado segundo *hit*, que está relacionado ao aumento do estresse oxidativo que desencadeia os processos de inflamação e fibrose, finalmente estimulando a progressão da esteatose para EHNA. No entanto, a teoria mais debatida atualmente na literatura é o modelo

de múltiplos *hits*. Neste modelo, a condição inicial para o acúmulo de AG nos hepatócitos é a resistência insulínica, que favorece a lipogênese e inibe a lipólise, aumentando o influxo de triglicérides da gordura para o tecido hepático e caracterizando a esteatose na etapa inicial da DHGNA (FESTA et al., 2000; CHITTURI et al., 2002b). Com isso o fígado se torna vulnerável a diversos fatores, como estresse oxidativo, peroxidação lipídica, estresse do retículo endoplasmático, ativação de citocinas inflamatórias e liberação de adipocinas que favorecem a progressão da esteatose simples para EHNA e fibrose (MARCHESINI et al., 2003; FARRELL, 2005; MCCULLOUGH, 2006).

Os principais componentes envolvidos na fisiopatogênese da DHGNA serão abordados nos itens seguintes:

2.1.2.1 Metabolismo lipídico

O excesso de triglicérides (TG) no interior dos hepatócitos pode ocorrer devido ao aumento de disponibilidade e mobilização dos AG livres (AGL) do tecido adiposo, aumento da síntese *de novo* de AGL, diminuição da beta-oxidação mitocondrial, aumento de gordura na dieta, diminuição da exportação de partículas de TG na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ou pela combinação destes fatores (Figura 5) (BYRNE et al., 2009; NAGLE; KLETT; COLEMAN, 2009). Estima-se que, em pacientes com DHGNA, cerca de 60% dos TG acumulados no fígado são provenientes de ácidos graxos do tecido adiposo, 30% da lipogênese *de novo* e 10% da dieta (DONNELLY et al., 2005). Após entrar nos hepatócitos, os AGL podem ser oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP) ou podem ser convertidos novamente em TG, que juntamente com o colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas, formarão as VLDL que serão exportados do fígado para a corrente sanguínea.

O mecanismo da síntese *de novo* de AG converte o excesso de carboidratos em AG, que são esterificados com glicerol-3-fosfato para formar TG pelo processo da lipogênese. As condições nutricionais interferem diretamente neste processo. Quando a dieta é rica em carboidratos e pobre em gorduras, há uma mudança no metabolismo celular de oxidação dos lipídios para esterificação de TG (POSTIC; GIRARD, 2008). A síntese *de novo* em indivíduos saudáveis só ocorre no período pós-prandial, no entanto, pode ocorrer também no período de jejum em indivíduos com DHGNA (BYRNE et al., 2009; LAMBERT et al.,

2014). A glicose obtida pela alimentação é convertida em Acetil-CoA, em seguida em Malonil-CoA e, por fim, em AG pela atividade da Acetil-CoA carboxilase (ACC) e do ácido graxo sintetase (FAS). As enzimas envolvidas no processo que regulam a lipogênese hepática são controladas por uma complexa rede de fatores nucleares, entre eles podemos destacar a proteína de ligação a elemento regulador de esterol (SREBP), a proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP), os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), receptor pregnano X (PXR) e o receptor nuclear ativado pelo ácido xeno (FXR).

O SREBP1c é um dos principais genes ativados, causador do aumento na expressão de genes importantes para a síntese de ácidos graxos e colesterol, como Acetil-CoA sintetase (ACS), ACC e FAS (HORTON, 2002). Esse fator de transcrição trabalha em conjunto com o gene PPAR γ , exercendo um papel importante na homeostase de AG, na adipogênese e na sensibilidade à insulina (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2000; KALAANY et al., 2005; WHITE; STEPHENS, 2010). Durante os estágios avançados da diferenciação de adipócitos ocorre expressão de PPAR γ , permanecendo amplamente expresso em adipócitos diferenciados (ROSEN; MACDOUGALD, 2006). Estudos indicaram uma provável participação dos genes das famílias SREBP e PPAR na patogênese da DHGNA/EHNA. Em modelos animais, roedores que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão de SREBP1c e PPAR γ e sua redução atenuaria o quadro da DHGNA (TU et al., 2012). Em cultura primária de hepatócitos provenientes de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com ácido betulínico, observou-se a redução da esteatose após inibição da expressão de SREBP1c (QUAN et al., 2013).

Um estudo em ratos que receberam dieta hiperlipídica relatou a superexpressão do gene SREBP1c na DHGNA. Os autores ainda relacionaram o aumento desse gene com o aumento da atividade FAS, aumentando os níveis de TG hepáticos (AI et al., 2011). O gene PPAR γ apresentou aumento na expressão em diferentes modelos animais com DHGNA (VIDAL-PUIG et al., 1996; BURANT et al., 1997; CHAO et al., 2000), porém estudos com humanos tem mostrado que a expressão do gene SREBP1c reduz com a progressão da doença.

Falhas na eliminação ou no transporte de lipídeos também podem desencadear a DHGNA. Os AG são exportados através de VLDL, sua formação depende da apolipoproteína B (ApoB) e é mediada pela proteína de transferência de triglicérides microsomal (MTP). Uma pequena porção de TG é transferida para ApoB no retículo endoplasmático pela MTP, essa vesícula é secretada e fundida com outras gotículas de TG para formar grandes e pequenas partículas de VLDL (HUSSAIN et al., 2008). Alterações genéticas na ApoB ou na

MTP, em humanos, levam ao acúmulo de gordura hepática. A MTP também exerce função na associação de VLDL, uma vez que trabalhos sugerem que a depleção de MTP é suficiente para causar esteatose (IBDAH et al., 2001). Shindo et al.(2010) avaliaram o desenvolvimento da DHGNA/EHNA em camundongos isogênicos que desenvolvem esteato-hepatite espontaneamente. Eles relataram a diminuição na expressão de MTP, que quando normalizada, apresentou níveis reduzidos de TG hepáticos e melhorou a exportação de VLDL.

Figura 5 – Metabolismo lipídico nos hepatócitos

Fonte: (Adaptado de GALIZZI et al., 2011).

Legenda: A quantidade de lipídeos no fígado é controlada por diversos mecanismos: importação de ácidos graxos, síntese *de novo* de ácidos graxos, beta-oxidação de ácidos graxos livres, esterificação de ácidos graxos livres em triglicérides e exportação de triglicérides na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade. O desequilíbrio entre esses mecanismos favorecendo o acúmulo de triglicérides é a principal causa da esteatose. AGL: ácidos graxos livres; ApoB: apolipoproteínas; VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade.

A oxidação de ácidos graxos também é um mecanismo que pode desencadear a DHGNA. Os hepatócitos são ricos em mitocôndrias que desempenham papel fundamental na produção de energia através da oxidação de nutrientes. Os açúcares sofrem glicólise e os ácidos graxos sofrem beta-oxidação nas mitocôndrias para produzir Acil-CoA (colesterol aciltransferase) (BEGRICHE et al., 2013). Para entrar nas mitocôndrias, o Acil-CoA depende da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), que está presente nas membranas externas da

mitocôndria. A CPT1 catalisa a formação de acil-carnitina e carnitina livre. Longas cadeias de acil-carnitina sofrem beta-oxidação e liberam Acetil-CoA, que será utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico, liberando NADH (nicotinamida adenina dinucleotídio) e FADH₂ (flavina adenina dinucleotídio) para formação de ATPs (EATON; QIAN, 2002).

A lipólise do tecido adiposo está aumentada na DHGNA (NASSIR; IBDAH, 2014). Nesse processo, há conversão dos TG armazenados em AGL. A lipase hepática (LIPC) realiza importante papel no metabolismo e remodelamento de HDL (lipoproteínas de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade), modulando a formação de LDL pequenas e densas e os níveis de HDL-colesterol (JANSEN; VERHOEVEN; SIJBRANDS, 2002).

2.1.2.2 Resistência insulínica (RI)

Para a manutenção da homeostase da glicose três processos são importantes: a secreção de insulina pelo pâncreas; a captação de glicose pelos tecidos; e a supressão da produção de glicose pelo fígado (BUGIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005). A resistência insulínica ocorre quando as concentrações fisiológicas de insulina causam uma reação menor do que a normal na captação de glicose pelas células, principalmente as células adiposas e musculares. Com a menor captação de glicose, é preciso que o pâncreas produza mais insulina para manter os níveis normais de glicemia, o que acaba aumentando a quantidade de insulina circulante, causando também a hiperinsulinemia como consequência. A RI pode ser genética ou adquirida (PARISE; OLIVEIRA, 2007).

A insulina é secretada pelas células beta das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose. Esse hormônio também influencia o metabolismo lipídico, aumentando a síntese de lipídeos em células hepáticas e adiposas e diminuindo a liberação de AG a partir de TG da gordura ou dos músculos. A RI periférica caracteriza-se pela redução da captação de glicose do sangue pelo tecido muscular esquelético e pela diminuição da lipólise no tecido adiposo, resultando na maior deposição de AGL no fígado e no aumento da síntese de TG (REAVEN, 2004; BUGIANESI et al., 2005). Já a RI hepática está associada ao aumento da glicogenólise e ao comprometimento da glicogênese. Há uma grande correlação entre a RI com a excessiva deposição de TG nos hepatócitos (PESSIN; SALTIEL, 2000; ABDELMALEK; DIEHL, 2007).

Nos hepatócitos, a hiperinsulinemia promove o aumento da lipogênese *de novo* e inibe a beta-oxidação dos AGL. A RI ocasiona diversas alterações no metabolismo lipídico que favorecem a esteatose hepática, como por exemplo, a RI inibe a lipase lipoproteica sensível a insulina, o que aumenta o influxo de AG para a circulação sanguínea e, posteriormente, para o fígado (Figura 6). O acúmulo de AGL nos hepatócitos guia a síntese hepática de TG, a qual também é favorecida pela super expressão dos fatores nucleares SREBP1 e PPAR γ (DUVNJAK et al., 2007). O excesso de AGL contribui para a RI por mecanismos envolvidos na ativação da 3 β proteína quinase C (PKC-3), c-jun quinase (JNK), IKK- β quinase e fator nuclear kappa β (NF κ B) e por menor regulação do receptor de insulina IRS-1. A ativação do fator de transcrição NF κ B aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que podem causar RI sistêmica e hepática (ARKAN et al., 2005; CORTEZ-PINTO; DE MOURA; DAY, 2006).

Figura 6 – Efeitos da resistência insulínica no metabolismo lipídico nos hepatócitos

Fonte: (Adaptado de GALIZZI et al., 2011).

Legenda: A resistência insulínica e a hiperinsulinemia levam o hepatócito a acumular lipídios no fígado por alguns mecanismos. No tecido adiposo, a resistência insulínica aumenta a lipólise e inibe a esterificação dos ácidos graxos livres (AGL). O aumento dos AGL circulante ocasiona a maior captação pelo fígado. Nos hepatócitos, a hiperinsulinemia aumenta a síntese de novo de AG e inibe sua beta-oxidação ocasionando o acúmulo de AGL nos hepatócitos. TG: triglicérides; ApoB: apolipoproteína B; VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade.

A RI causa o bloqueio da secreção de TG dos hepatócitos pelo aumento da degradação intracelular de VLDL, além de bloquear a exocitose de vesículas contendo VLDL (BODEN, 2002; NEUSCHWANDER-TETRI, 2002). A diminuição da ApoB ou a ligação reduzida do TG na ApoB pela MTP podem comprometer a exportação de TG (RECTOR et al., 2008). A entrada e a síntese *de novo* de AGL no fígado são maiores que a oxidação e secreção de TG, causando o acúmulo de gordura hepática. Isso pode explicar o papel chave da RI no desenvolvimento da DHGNA.

2.1.2.3 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema antioxidante. Esse processo conduz a oxidação de biomoléculas, ocasionando a perda de suas funções biológicas e/ou o desequilíbrio homeostático, resultando no dano oxidativo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O sistema antioxidante é subdividido em enzimático e não enzimático. No segundo, destacam-se os compostos antioxidantes presentes na dieta, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Já o enzimático inclui enzimas que agem impedindo e controlando a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), entre elas a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx) (BARBOSA, 2010).

O desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante pode fazer com que as EROs iniciem a peroxidação lipídica, resultando na formação de moléculas de grande duração, que podem atingir outros locais (BROWNING; HORTON, 2004; MERRIMAN; AOUIZERAT; BASS, 2006).

A formação de produtos bioativos da peroxidação lipídica e o estresse oxidativo são indicados como os mecanismos-chave responsáveis pela lesão hepatocelular e a evolução da esteatose simples para esteato-hepatite e fibrose (FELDSTEIN, 2010). Estudos experimentais em diversos modelos animais, assim como dados observacionais em pacientes humanos, vêm demonstrando aumento do estresse oxidativo e de produtos da peroxidação lipídica no fígado e na circulação na EHNA (GAO et al., 2004; HOROZ et al., 2005; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2006; MANTENA et al., 2008).

No metabolismo basal, o oxigênio é reduzido à água e os produtos intermediários nesse processo são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical

hidroxila (OH), que em conjunto formam as EROs. O estresse oxidativo ocorre quando a ação das defesas antioxidantes da célula não é suficiente para detoxicação das EROs ou quando há produção excessiva de EROs (DIESEN; KUO, 2010).

Acredita-se que o aumento de TG no fígado aumenta o estresse oxidativo em hepatócitos animais (HENSLEY et al., 2000) e humanos (BROWNING; HORTON, 2004). Os AGL hepáticos são oxidados nas mitocôndrias, peroxissomos e microsossomos. Sabe-se que a oxidação mitocondrial é o mecanismo dominante de disposição de AG em indivíduos saudáveis e com condições fisiológicas normais. Na DHGNA, a função mitocondrial está diminuída devido a alterações ultraestruturais que causam uma disfunção na cadeia respiratória e uma oxidação-fosforilação defeituosa, aumentando o número de EROs (RINELLA et al., 2008). Por outro lado, o aumento excessivo da carga de AGL no fígado pode sobrecarregar o mecanismo de beta-oxidação e aumentar a produção de EROs, assim como, ativar outras vias de oxidação lipídica como a peroxissomal e microsossomal, gerando mais EROs e aumentando o estresse oxidativo hepático (PETTA; MURATORE; CRAXÌ, 2009; DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2010). Esse aumento pode exacerbar ainda mais a peroxidação lipídica, sendo que os seus subprodutos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios que parecem ativar as células estreladas hepáticas, favorecendo a fibrogênese (Figura 7) (LEE et al., 1995).

O malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal são os produtos finais da peroxidação de lipídeos e ativam a produção de colágeno favorecendo a fibrose (LEE et al., 1995), além de aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, ocasionando inflamação e fibrose hepática, que são as características de progressão da esteatose simples para a esteato-hepatite e cirrose. Nos pacientes obesos, as EROs e o estresse oxidativo podem se originar no tecido adiposo, além do tecido hepático (WEISBERG et al., 2003; FURUKAWA et al., 2004). Heeba et al.(2015) relataram a melhora do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica em ratos com DHGNA induzida por dieta após tratamento com fucoidan, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. Em humanos, a vitamina E, conhecido antioxidante, demonstrou a diminuição da esteatose e da inflamação em pacientes com DHGNA (SANYAL et al., 2010).

Figura 7 - Mecanismos do estresse oxidativo no fígado na DHGNA

Fonte: (TIBURCIO, 2016).

Legenda: Durante a doença hepática gordurosa não alcoólica a função mitocondrial está diminuída devido a alterações estruturais que aumentam o número de espécies reativas de oxigênio (EROS). O aumento de ácidos graxos livres (AGL) no fígado ocasiona uma sobrecarga na beta-oxidação levando também ao aumento de EROs e assim do estresse oxidativo. O aumento no estresse oxidativo exacerba a peroxidação lipídica levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que causam a inflamação e a fibrose hepática favorecendo a progressão da esteatose simples para a esteato-hepatite e cirrose.

2.1.3 Diagnóstico e Terapêutica da DHGNA

As últimas diretrizes estabelecidas pela Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado (AASLD) relatam que, para se diagnosticar DHGNA, precisam estar reunidos quatro critérios: (1) presença de gordura no fígado observado por exame de imagem ou histologicamente; (2) ausência de hábito de consumo acentuado de álcool (ingestão de etanol de < 210 g/semana para homens e < 140 g/semana para mulheres); (3) ausência de outros fatores indutores de esteatose hepatocelular; e (4) ausência de fatores concomitantes causadores de doença hepática crônica (CHALASANI et al., 2012). Como a DHGNA é

normalmente assintomática, a suspeita geralmente inicia-se através da hepatomegalia detectada por exame clínico, aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST ou alterações sugestivas em exames de imagem como ultrassonografia. A partir daí é necessário excluir a presença de outras doenças hepáticas, como doenças alcoólicas, hepatites virais crônicas, doenças hepáticas autoimunes, entre outras (HASHIMOTO; TANIAI; TOKUSHIGE, 2013).

A biópsia hepática ainda é considerada o “padrão ouro” no diagnóstico da DHGNA e permite a diferenciação histológica entre a esteatose simples e a EHNA (PULZI et al., 2011). Por ser mais invasiva, deve ser realizada naqueles que realmente irão se beneficiar ao máximo do diagnóstico, orientação terapêutica, assim como as perspectivas de prognóstico. É o teste diagnóstico de maior especificidade, porém requer a interpretação de um patologista experiente (CHALASANI et al., 2012).

Com relação a tratamentos, a perda gradual de peso é defendida como a primeira linha de intervenção, levando em conta que a maioria dos pacientes com DHGNA estão com sobrepeso ou já são considerados obesos. Dessa maneira, dieta e atividade física moderada são métodos indicados por médicos para os pacientes com DHGNA (HARRISON; DAY, 2007). Em relação à farmacoterapia para tratamento de esteatose hepática, estão inclusos os antioxidantes, os agentes sensibilizadores de insulina e os hepatoprotetores (AHMED, 2015).

Como o estresse oxidativo é considerado o principal mecanismo para progressão da esteatose para esteato-hepatite, antioxidantes como a vitamina E, vêm sendo estudados de diferentes formas, e pode ser indicado como primeira linha de tratamento apenas para pacientes não diabéticos com EHNA (MORANTE et al., 2005). A metformina, sensibilizador insulínico, inicialmente causou entusiasmo sobre seu efeito terapêutico para DHGNA, porém estudos posteriores não demonstraram efeitos histológicos satisfatórios desse medicamento na melhora da doença, e por isso, atualmente, ele não é um medicamento indicado para tratamento específico de DHGNA (ISMAIL-BEIGI, 2012). A pioglitazona pode ser utilizada para tratar pacientes com EHNA diagnosticada por biópsia hepática, contudo deve-se considerar que a maioria dos pacientes que participaram dos estudos clínicos que investigaram a pioglitazona na EHNA eram não diabéticos e que, a longo prazo, a segurança e eficácia da pioglitazona não foi estabelecida (CHALASANI et al., 2012). O Orlistat é um reversível inibidor da lipase entérica e pancreática que promove a má absorção de gordura, e diminui influxo de AGL para o fígado, levando à perda de peso e melhoria da sensibilidade à insulina. Em um estudo clínico controlado, o Orlistat reduziu as transaminases séricas e a esteatose hepática (ZELBER-SAGI et al., 2006), porém, atualmente, ele é recomendado para

a perda de peso em pacientes obesos, mas não para o tratamento apenas da DHGNA (AHMED, 2015).

Do ponto de vista cirúrgico, a cirurgia bariátrica promove a rápida perda de peso e pode melhorar potencialmente a histologia hepática de pacientes com DHGNA, porém não é recomendada como um tratamento primário da doença (AHMED, 2015).

Apesar das diversas opções de terapias farmacológicas e da opção da cirurgia bariátrica, nenhuma delas tem se mostrado eficaz para todos os pacientes com EHNA (MALHOTRA; BEATON, 2015), indicando a necessidade de maiores estudos e descoberta de novos alvos terapêuticos.

2.1.4 Modelos Experimentais

Diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados para estudar os mecanismos fisiopatogênicos da DHGNA, assim como novas propostas diagnósticas e terapêuticas (WILLEBRORDS et al., 2015). Os roedores são os animais mais utilizados para experimentos relacionados com esteatose hepática, porém nos últimos anos, estudos feitos com *zebrafish* têm sido bastante utilizados por ser de baixo custo, de fácil manipulação genética e por desenvolver rapidamente doenças hepáticas (KIM et al., 2015; WILLEBRORDS et al., 2015).

Os modelos experimentais utilizados para essa doença podem ser separados em dois grupos: genéticos e nutricionais. Nos genéticos, os animais desenvolveram mutações espontâneas durante sua evolução, causando a doença, ou são animais geneticamente modificados, nos quais se elimina ou se agregam fragmentos específicos de DNA ao seu genoma (FARRELL, 2005; QUAN et al., 2013). Já os modelos nutricionais induzem o acúmulo de gordura hepática pela supressão ou limitação de nutrientes e aminoácidos essenciais, ou ainda, pela superalimentação de nutrientes.

Em relação aos modelos genéticos, destacam-se os camundongos ob/ob, que são deficientes em leptina, obesos e desenvolvem espontaneamente RI, hiperinsulinemia, hiperglicemia e esteatose hepática (LINDSTRÖM, 2007). Os camundongos dB/dB carregam uma mutação no gene receptor da leptina que os torna obesos e diabéticos, além de desenvolverem esteatose. Ambos modelos necessitam de um segundo golpe para desenvolver a EHNA, por isso recebem doses de lipopolissacarídeos (YANG, et al., 1997) ou dietas hipercalóricas ou deficientes em colina e metionina (WORTHAM et al., 2008).

Sobre os modelos nutricionais, algumas dietas são utilizadas. A dieta hiperlipídica é geralmente utilizada para instaurar a DHGNA em roedores com as características mais parecidas com a doença em humanos por causar resistência insulínica, obesidade e pelos aspectos histológicos hepáticos. Consiste em uma dieta com 30 a 60% de gordura, porém a composição da dieta, quantidade de gordura, duração da dieta e a espécie escolhida influenciam nas consequências no organismo, como obesidade, dislipidemia, aumento da lipogênese, produção de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e tolerância à glicose comprometida (TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012; KANURI; BERGHEIM, 2013). Essa dieta possui grandes quantidades de gordura insaturada, o que causa uma maior peroxidação lipídica e maior expressão de citocinas, se comparada com dietas com gorduras saturadas (NANJI, 2004).

A dieta deficiente em metionina e colina possui 40% de sucrose e apenas 10% de gordura, além de não possuir os aminoácidos supracitados que são essenciais para a beta oxidação e a produção de VLDL (ANSTEE; GOLDIN, 2006). Camundongos alimentados com essa dieta desenvolvem esteatose hepática entre 1 e 2 semanas, causada pelo aumento de AG e alterações na secreção de VLDL, e posterior desenvolvimento de EHNA pelo aumento do estresse oxidativo e da liberação de citocinas e adipocinas (LECLERCQ et al., 2000; LARTER et al., 2008). A DHGNA desenvolve-se rapidamente com essa dieta, conjuntamente com inflamação, estresse oxidativo e fibrose, porém não desenvolve RI nem obesidade em camundongos, diferente do que ocorre em humanos (RINELLA et al., 2008).

A dieta rica em frutose também é utilizada para instaurar a DHGNA. A frutose é um importante açúcar da dieta humana e causa esteatose hepática em roedores. Esta dieta promove RI, estresse oxidativo, obesidade e aumento de citocinas e adipocinas (ACKERMAN et al., 2005). Ratos alimentados com uma dieta rica em frutose durante cinco semanas apresentaram inflamação, esteatose macrovesicular e altos níveis de TG hepáticos (KAWASAKI et al., 2009), já com 16 semanas de alimentação, os animais apresentaram aumento das enzimas transaminases, esteatose macro e microvesicular e RI (SCHULTZ et al., 2013).

Estudos *in vitro* utilizam os ácidos oleicos e palmíticos para induzir o acúmulo de TG em hepatócitos humanos e animais (DE GOTTARDI et al., 2007; ANDERSON; BORLAK, 2008). O ácido oleico é um dos AG mais presentes na dieta humana, é indispensável para a formação da membrana plasmática e serve como fonte de energia. Apesar da sua importância benéfica, esse AG é o mais observado no fígado de pacientes com esteatose hepática. (ARAYA et al., 2004). Um estudo *in vitro* demonstrou que o ácido palmítico promove maior

expressão de PPAR α e, quando comparado com o ácido oleico, resulta em menor acúmulo de TG nos hepatócitos, porém está associado com a resistência insulínica e a apoptose dos hepatócitos em cultivo (RICCHI et al., 2009). Ele também está envolvido no estresse do retículo endoplasmático e na inibição da secreção de ApoB100 no fígado (CAVIGLIA et al., 2011).

A dieta deficiente em colina foi descrita inicialmente em 1967 por Lombardi e Oler. A colina é um nutriente indispensável para a biossíntese de fosfolipídios essenciais na composição das membranas celulares e das moléculas de VLDL (ZEISEL; BLUSZTAJN, 1994). O acúmulo excessivo de TG hepático sob essas condições nutricionais ocorre pela diminuição da exportação de TG hepático para o plasma devido à diminuição da secreção de VLDL (MAVRELIS et al., 1983). O papel dessa dieta na promoção da esteatose hepática já é bem estabelecido na literatura (ZEISEL; BLUSZTAJN, 1994).

Levando em conta os prós e contras de cada dieta, para esse experimento foi escolhida a associação entre duas dietas: dieta hiperlipídica e dieta deficiente em colina. Wolf et al.(2014) demonstraram um bom desenvolvimento da EHNA e do CHC consequente da DHGNA em camundongos alimentados com essa dieta por 12 semanas.

2.2 COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES GAP E CONEXINAS

2.2.1 Estrutura e funções

A manutenção da homeostasia celular em organismos multicelulares depende de um sistema eficiente e complexo de comunicação, que envolve as vias extra, intra e intercelulares. Assim, as células são capazes de regular e manter um complexo controle de suas funções fisiológicas e metabólicas (VINKEN et al., 2008). A primeira descrição das junções comunicantes do tipo *gap* foi realizada por Loewenstein e Kanno, em 1966, demonstrando a incapacidade de troca de íons entre células tumorais hepáticas de rato. No mesmo ano, Revel e Karnovsky nomearam essas junções como “canais comunicantes do tipo *gap*” e apresentaram a estrutura hexagonal das subunidades presentes nas junções intercelulares da membrana plasmática de hepatócitos.

Os canais comunicantes são compostos por duas estruturas básicas, denominadas hemicanais ou *conexons* (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996). Em 1974, Goodnough isolou e apresentou duas subunidades proteicas presentes nas junções comunicantes de hepatócitos de camundongos, com pesos moleculares de 26 e 32 kDa, denominadas de *conexinas* (Cx). Assim, cada *conexon* é composto por seis *conexinas*, que se distribuem hexagonalmente e formam um poro central. Por sua vez, cada *conexon* se associa a outro *conexon* pertencente à célula adjacente, formando um canal intercelular (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996). Quando os *conexons* são formados por seis *conexinas* iguais, são denominados *conexons* homoméricos, quando são formados por mais de um tipo de *conexina*, são chamados *conexons* heteroméricos. Adicionalmente, os canais intercelulares formados por *conexons* iguais são chamados de homotípicos, e quando formados por *conexons* diferentes são chamados de heterotípicos (Figura 8) (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996).

Figura 8 -Representação esquemática das possibilidades de arranjos entre as *conexinas* para formação de *conexons* e destes para formação de canais intercelulares

Fonte: (Adaptado de MESE; RICHARD; WHITE, 2007).

A nomenclatura das *conexinas* é baseada em seu peso molecular em kDa, precedida do termo Cx. O cDNA que codifica as *conexinas* revela regiões de alta homologia e regiões com

pequena ou nenhuma homologia, permitindo assim, a classificação através do peso molecular. Quando há conexinas com o peso molecular igual, elas recebem a adição de um número decimal para diferenciá-las, como, por exemplo, na Cx31 e na Cx31.1 (WILLECKE et al., 1991; HENNEMANN et al., 1992). Outra nomenclatura utilizada para as conexinas baseia-se na semelhança genética e agrupa as conexinas em cinco grupos: alfa, beta, gama, delta e épsilon. O nome do grupo a que a conexina faz parte é precedido da sigla GJ (*gap junction*) e sucedido por um número de acordo com a ordem de descoberta da conexina. Segundo esse sistema de nomenclatura, a Cx32, por ser a primeira conexina descoberta do grupo beta, recebe o nome de GJ β 1 (NIELSEN et al., 2012; OYAMADA; TAKEBE; OYAMADA, 2013).

Atualmente, 21 conexinas já foram descritas em humanos e 20 em camundongos (SU; LAU, 2014). Apesar da quantidade de conexinas identificadas, essas proteínas apresentam uma estrutura molecular comum, que consiste em quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares e uma alça intracelular (Figura9) (NIELSEN et al., 2012).

Figura 9 -Representação da estrutura transmembranal das conexinas

Fonte: (MARTIN; EVANS, 2004).

Legenda: Representação da estrutura transmembranal das conexinas, sendo TM1, TM2, TM3 e TM4 domínios transmembrana. As conexinas atravessam a membrana quatro vezes com duas voltas extracelulares altamente conservadas (EL1 e EL2) que facilitam a ancoragem e o reconhecimento das conexinas compatíveis e uma volta intracelular (IL).

Células e tecidos podem apresentar mais de um tipo de conexina, assim como podemos encontrar o mesmo tipo de conexina em tecidos diferentes, como exemplificado no (Quadro 1) (MARTIN; EVANS, 2004).

Quadro 1 - Principais conexinas descritas e sua distribuição nos diferentes tipos celulares e tecidos humanos

Células	Conexina
Cóclea; placenta; hepatócitos; pele; pâncreas; rim; intestino	Cx26
Astrócitos; Cóclea	Cx30
Cérebro; medula espinal; células de Schwann	Cx30.2
Pele; rins	Cx30.3
Cóclea; placenta; pele	Cx31
Pele	Cx31.1
Algumas células cardíacas	Cx 31.9
Células acinares secretoras; Células de Schwann; hepatócitos	Cx32
Neurônios; células pancreáticas β	Cx36
Endotélio; células da granulosa; pulmão; pele	Cx37
Endotélio; Células do sistema de condução cardíaca	Cx40
Diversos tipos celulares	Cx43
Algumas células cardíacas; células musculares lisas; neurônios	Cx45
Fibras do cristalino;	Cx46
Oligodendrócito; medula espinhal; órgãos linfáticos	Cx46.6 Cx 47
Cristalino	Cx50
Retina	Cx62

Fonte: (OYAMADA et al., 2013).

A comunicação direta entre células adjacentes é mediada pelas junções comunicantes do tipo *gap* (NIELSEN et al., 2012), as quais participam no desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular e no controle da homeostasia tecidual. As junções *gap* permitem o rápido e livre transito de pequenas moléculas (<1-2 kDa), íons e mensageiros secundários entre as células (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; KING; BERTRAM, 2005). Nas últimas décadas, foi demonstrado que as junções comunicantes do tipo *gap* são indispensáveis para o acoplamento intercelular metabólico e elétrico em todos os órgãos vitais (VINKEN, 2015).

As junções *gap* possuem um importante papel na manutenção da homeostase durante o desenvolvimento, assim como nas fases adultas. Alterações nesses canais podem promover doenças como câncer (NAUS; LAIRD, 2010) e doenças do coração (VAN VEEN; VAN RIJEN; OPTHOF, 2001; MARTIN; EVANS, 2004; SEVERS et al., 2008). A formação e funcionalidade dos canais comunicantes podem ser afetadas por mutações patogênicas, que também estão relacionadas às diversas alterações e síndromes genéticas em humanos e animais (MEŞE; RICHARD; WHITE, 2007). Até hoje não se sabe o real impacto das alterações nos genes das conexinas sobre os indivíduos, porém, sabe-se que a comunicação por junções *gap* é crucial para o funcionamento e desenvolvimento de diversos órgãos (AVANZO et al., 2004). Alterações nesses canais podem causar diversas anomalias, reafirmando a relação entre as junções *gap* e o crescimento celular (YAMASAKI; NAUS, 1996; TROSKO; RUCH, 1998).

No Quadro 2 estão representadas as principais alterações genéticas relacionadas às conexinas em humanos, assim como o fenótipo resultante em camundongos geneticamente modificados que sofreram a deleção dos dois genes alelos (camundongos *knockout*) para as mesmas conexinas.

Quadro 2 - Alterações genéticas relacionadas a mutações em genes que codificam conexinas em seres humanos, e o fenótipo destas mutações em camundongos *knockouts*

Gene	Doença Humana	Fenótipo em Camundongo knockout
Cx43	Síndrome da displasia oculodentodigital (SDODD)	Letalidade perinatal (Dismorfogênese cardíaca)
Cx46	Catarata zonular pulverulenta 3	Catarata nuclear zonular
Cx37	Predisposição à arteriosclerose	Esterilidade na fêmea
Cx40	Fibrilação atrial idiopática	Arritmia atrial
Cx50	Catarata zonular pulverulenta 1	Catarata congênita, microftalmia
Cx32	Doença de Charcot-Marie-Tooth	Aumento da hepatocarcinogênese
Cx26	Surdez sindrômica e não-sindrômica, hiperqueratose palmo-plantar	Letalidade no 11º dia embrionário
Cx31	Surdez sindrômica e não-sindrômica, eritroqueratodermia variável (EQV)	Dismorfogênese transiente da placenta
Cx30	Surdez não-sindrômica, Displasia ectodérmica hidrótica	Audição insuficiente, ausência de alterações dérmicas

Fonte: (COGLIATI, 2010).

2.2.2 Conexinas no fígado

No tecido hepático são descritas cinco tipos diferentes de conexinas: Cx26, Cx32, Cx37, Cx40 e Cx43 (Figura10) (MAES et al., 2014). Os hepatócitos, tipo celular mais proeminente no fígado, possuem junções comunicantes do tipo *gap* e expressam apenas Cx26

e Cx32, formando *conexons* homo e heteroméricos (STUTENKEMPER et al., 1992; VINKEN et al., 2008). A Cx32 foi a primeira conexinas a ser clonada e ocupa cerca de 3% da membrana plasmática dos hepatócitos (Figura 11). Em fígado de ratos e humanos, a expressão da Cx32 é distribuída uniformemente em todas as regiões e representa cerca de 90% das conexinas expressas pelo órgão, enquanto a Cx26 é preferencialmente expressa na região acinar periportal e representa cerca de 5% (KOJIMA et al., 1994; MAES et al., 2014). As células hepáticas não parenquimatosas, como as células de *Kupffer*, colangiócitos e células estreladas expressam Cx43, já as células endoteliais das artérias e veias do fígado expressam Cx37 e Cx40 (SHIOJIRI et al., 2006; MAES et al., 2014).

Figura 10 - Expressão das principais conexinas nos tipos celulares hepáticos de roedores e humanos

Fonte: (MAES et al., 2014).

Junções comunicantes hepatocelulares da área pericentral acinar são constituídas, principalmente, de hemicanais homoméricos de Cx32, enquanto seus homólogos da área periportal são, normalmente, heteroméricos, constituídos de Cx26 e Cx32 (VINKEN et al., 2008). Canais intercelulares homotípicos compostos por Cx26 e Cx32 favorecem a passagem de cátions e ânions, respectivamente (BUKAUSKAS et al., 1995). Da mesma forma, os ATP transitam significativamente melhor em canais homotípicos formados por Cx43 quando comparados com canais homotípicos de Cx32 (GOLDBERG; MORENO; LAMPE, 2002).

Figura 11 -Imunofluorescência para Cx32 em tecido humano e animal

Fonte: acervo pessoal Bruno Cogliati.

Legenda: A) Imunofluorescência demonstrando a presença da proteína Cx32 (pontos verdes) na membrana plasmática de hepatócitos em fígado humano. B) Imunofluorescência demonstrando a presença da proteína Cx32 (pontos verdes) na membrana plasmática de hepatócitos em fígado de camundongos.

A presença de junções *gap* no fígado é importante para a manutenção e competência metabólica do órgão. Em especial, as junções compostas por Cx32 possuem importância específica conhecida, por exemplo, na glicogenólise (STÜMPEL et al., 1998), na secreção de albumina (YANG; ICHIKAWA; TSUCHIYA, 2003), na secreção biliar (TEMME et al., 2001) na desintoxicação da amônia (YANG; ICHIKAWA; TSUCHIYA, 2003) e na biotransformação de xenobióticos (NEVEU et al., 1994; SHODA et al., 2000).

As junções *gap* também são de extrema importância para o desenvolvimento, crescimento e morte das células hepáticas (VINKEN, 2012). Já é bem documentada a participação dessas junções na toxicidade hepática (CHIPMAN; MALLY; EDWARDS, 2003; VINKEN et al., 2009) e na hepatocarcinogênese, porém pouco se sabe sobre o papel delas em situações não tumorais, como inflamações, fibrose, cirrose, esteatose, entre outras.

2.2.3 Conexinas nas doenças hepáticas

Sabe-se que os hemicanais das conexinas Cx32 e Cx43 desempenham papéis chaves na apoptose hepática (VINKEN et al., 2010; VINKEN, 2012). A diminuição dos níveis de Cx32, bem como mudanças em sua distribuição celular, leva ao mau funcionamento da atividade das junções comunicantes (NAKASHIMA et al., 2004). As quantidades de proteínas

e atividade das junções do tipo *gap* são drasticamente reduzidas em situações de hepatotoxicidade aguda induzida por drogas, colestase, hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (VINKEN, 2012).

Estudos demonstraram que a administração, em curto prazo, de doses elevadas de substâncias hepatotóxicas, incluindo acetaminofeno, tioacetamida, D-galactosamina, e tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos deficientes em Cx32 ou em ratos transgênicos negativos dominantes para Cx32 resultou na diminuição dos níveis séricos de ALT e AST, bem como diminuiu os danos no fígado em comparação aos animais selvagens (ASAMOTO et al., 2004; NAIKI-ITO et al., 2010). Park et al. (2014) relatou que camundongos deficientes em ceramida sintase 2 apresentaram a localização incorreta de Cx32 no citoplasma, disfunção na junção *gap* e resistência a lesão hepática aguda causada por paracetamol. Da mesma forma, hepatócitos de camundongos *knockout* para Cx32 isolados em cultura exibiram redução da morte celular após a exposição ao paracetamol (SAITO; SHINZAWA; TSUJIMOTO, 2014). Maes et al. (no prelo)¹, relatou que camundongos *knockout* para Cx32 e selvagens tratados com o mesmo hepatotóxico não apresentaram diferenças quanto à morte celular, inflamação e estresse oxidativo. Em pacientes com hepatites crônicas (YAMAOKA et al., 2000; NAKASHIMA et al., 2004) e em roedores tratados com lipopolissacarídeos (TEMME et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2002; CORREA et al., 2004), foram encontrados níveis diminuídos de Cx32 no fígado. *In vitro*, também se observou a redução de Cx32 em culturas de hepatócitos primários cultivados em condições inflamatórias. Em contraste, a Cx26 apresenta-se aumentada nessas condições, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (TEMME; TRAUB; WILLECKE, 1998; TEMME et al., 2000).

Em relação a Cx43, também se observa um aumento dessa proteína em cultura de células estreladas e células de *Kupffer* condições inflamatórias (FISCHER et al., 2005; EUGENÍN et al., 2007) e também *in vivo* durante a inflamação do fígado (GONZÁLEZ et al., 2002; EUGENÍN et al., 2007). Cogliati et al. (2011) avaliaram a participação da Cx32 na fibrose hepática em camundongos Cx32-KO e demonstraram que a deficiência em Cx32 aumenta os danos e a fibrose hepática após indução por tetracloreto de carbono. Em pacientes com cirrose alcoólica, a deterioração do parênquima hepático é acompanhada por um declínio

¹MAES, M.; MCGILL, M. R.; DA SILVA, T. C.; LEBOFISKY, M.; MARIA MONTEIRO DE ARAÚJO, C.; TIBURCIO, T.; VELOSO ALVES PEREIRA, I.; WILLEBRORDS, J.; CRESPO YANGUAS, S.; FARHOOD, A.; ZAIDAN DAGLI, M. L.; JAESCHKE, H.; COGLIATI, B.; VINKEN, M. Connexin32: a mediator of acetaminophen-induced liver injury? **Toxicol Mech Methods**, p. 1-9 (Aceito para publicação em 2016).

nos níveis de Cx32 e sua internalização (YAMAOKA et al., 1995; YAMAOKA et al., 2000; NAKASHIMA et al., 2004). Há também um aumento na expressão hepática de Cx43 nesses casos (HERNÁNDEZ-GUERRA et al., 2014).

Relacionado à carcinogênese, vários estudos demonstraram a redução das conexinas, indicando-as como genes supressores tumorais e de grande relevância nos eventos de transformação celular (TEMME et al., 1997; MA; SUI; WANG, 2000; OMORI et al., 2001; EVERT et al., 2002). Com relação ao carcinoma hepatocelular humano, alguns estudos demonstraram a diminuição da expressão de Cx32 e Cx43 e de seus respectivos RNAm, revelando o envolvimento dessas proteínas na progressão neoplásica (MA et al., 2002).

Dagli et al.(2004), utilizando camundongos transgênicos que expressam um mutante da Cx32 no fígado, relataram que as junções comunicantes do tipo *gap* atuam positivamente sobre a proliferação celular durante a regeneração hepática e negativamente sobre o desenvolvimento e progressão de tumores. Experimentos utilizando o carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) para instaurar a hepatocarcinogênese em camundongos deficientes em Cx43 revelou não haver diferença na formação neoplásica em relação aos animais selvagens (GUERRA, 2003). Já os camundongos *knockout* para Cx32, submetidos ao mesmo processo, apresentaram maior susceptibilidade ao CHC, sugerindo a significativa participação dessa conexina na supressão tumoral (TEMME et al., 1997). Estes resultados sugerem um papel da Cx32 na disseminação dos sinais de danos ativados por estes produtos químicos. Um estudo recente, realizado por Sagawa et al. (2015), relatou um efeito protetor da Cx32 na progressão da EHNA em ratos submetidos à dieta deficiente em colina e metionina.

Sabendo da importante participação dessas conexinas para o funcionamento e homeostase do fígado, investigar a participação das conexinas 32 na doença hepática gordurosa não alcoólica pode trazer novas informações sobre a fisiopatologia da doença, assim como permitir a instauração de novos procedimentos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a participação da Cx32 na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina em camundongos geneticamente modificados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da deficiência em Cx32 nos aspectos biométricos e na histopatologia hepática.
- Avaliar a participação da Cx32 na resistência insulínica e na bioquímica hepaticoplasmática.
- Avaliar a importância da Cx32 na proliferação dos hepatócitos após indução do modelo dietético da DHGNA.
- Avaliar a participação da Cx32 na produção de leptina, adiponectina e citocinas inflamatórias após indução de DHGNA.
- Avaliar a importância da Cx32 no estresse oxidativo hepático.
- Avaliar os efeitos da deficiência de Cx32 na expressão de genes envolvidos na DHGNA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Morfologia e Molecular (LAPMOL), nas dependências do Departamento de Patologia Experimental e Comparada (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *knockout* para conexina 32 (Cx32-KO) e selvagens (*wild-type*, WT). Os camundongos Cx32-KO foram gerados pela inserção de um gene que codifica para a resistência à neomicina na região codificante da Cx32 do genoma murino via recombinação homóloga (NELLES et al., 1996). Inicialmente, estes animais foram doados ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) pelo Dr. Hiroshi Yamasaki e, posteriormente, foi estabelecida uma colônia destes animais na linhagem C57BL/6 no mesmo departamento. O biotério do Departamento de Patologia possui o certificado de biossegurança da FMVZ-USP (CQB no. 100/99), de acordo com as informações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), com base na instrução normativa da CTNBio nº. 12, publicada no Diário Oficial da União nº. 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, páginas 10-12. Os animais foram alojados em sala isolada na área de criação do Biotério, a qual foi especialmente preparada para recebê-los. Para tanto, foram vedadas todas as possíveis passagens de insetos e de camundongos, e havia cartazes indicativos da presença deles nos locais em que foram manipulados.

4.2 GENOTIPAGEM

Para determinar o genótipo dos animais usados nesse experimento, um fragmento de aproximadamente 0,5 cm da cauda de cada camundongo foi digerido em tampão de lise (500

μl de Tris-HCl 1M, pH = 8,0; 200 μl de EDTA 0,5M pH = 8,0; 500 μl de SDS 10% H₂O destilada q.s.p. 10 mL) acrescido de proteinase K (1 mL de proteinase K para 60 μL de tampão) durante 2 horas em banho-maria a 65°C. Em seguida foi adicionado mais 200 μL tampão de lise e as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 15.000 rpm e 4°C. Então, 200 μL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 20 μL de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 400 μL de etanol absoluto para precipitação do DNA. Uma nova centrifugação foi feita por 10 minutos a 5.000 rpm e 4°C. O DNA foi lavado em etanol 70% e solubilizado em 200 μL de TE (Tris/EDTA). Os *primers* utilizados para a detecção do alelo selvagem da Cx32 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram 5'-CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC-3' e 5'-AGATAAGCTGCAGGGACCATAGG-3', gerando um produto de PCR com 550 pares de bases (pb). Os *primers* utilizados para a detecção do alelo mutado da Cx32 foram 5'-CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC-3' e 5'-ATCATGCGAAACGATCCTCATCC-3', gerando um produto de PCR com 414 pb. A amplificação padrão da PCR foi realizada em uma reação de 25 μL com SuperMix (Life Technologies, EUA), 10 pmol de cada *primer* e, aproximadamente, 100 ng do template de DNA. As amostras foram desnaturadas por 2 minutos a 94°C, seguido de 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, e finalmente 4 minutos a 72°C. Uma alíquota de 10 μL do produto final da PCR foi adicionada a 10 μL de corante (LGC Biotecnologia) e submetida à eletroforese em gel de agarose 2% diluído em tampão TAE (48,4 g de Tris base; 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 11,4 mL de Ácido Acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000 mL), 100V, por 50 minutos. O gel foi visualizado e fotografado em fotodocumentador sob luz ultravioleta (ChemIDOC, Bio-RAD, EUA).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 60 camundongos machos, com 8 semanas de idade. Os animais receberam água filtrada e dieta hiperlipídica deficiente em colina (Rhostrer, Brasil), *ad libitum*, durante 8 semanas. Os níveis nutricionais da dieta estão apresentados na Tabela 1. Os animais permaneceram em caixas de policarbonato, em sala com foto período de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sob condições controladas de temperatura de (22 ± 2°C) e umidade relativa do ar (45-60%).

Para os testes de tolerância à glicose e à insulina, foram utilizados 20 animais WT e 20 animais Cx32-KO. Para os demais estudos foram utilizados 11 animais WT e 9 animais Cx32-KO. Os animais e as rações foram pesados semanalmente para controle do consumo de ração e ganho de peso. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da FMVZ-USP, sob protocolo de pesquisa nº 3140301115.

Tabela 1– Níveis nutricionais da dieta por quilo de ração oferecida para os camundongos durante 8 semanas para indução de DHGNA – São Paulo – 2015

Produtos	%
Amido de milho	42,8
Caseína láctea (≥85% proteína)	14,95
Amido dextrinizado	5
Sacarose	10
Óleo de soja	7
Gordura animal	9,5
Colesterol Sigma-Aldrich	1,25
Celulose MC-101	5
Mix Mineral AIN-93M	3,5
Mix Vitamínico AIN-93	1,0
Tert-Butilhidroquinona	0,0008
Total	100

Fonte: Rhoster Indústria e Comércio Ltda.

4.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

Os testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) pretendem avaliar a capacidade de metabolização da glicose nos animais, identificando uma possível resistência insulínica. O fundamento do GTT é avaliar a metabolização da glicose mediada pela insulina endógena. Já o ITT pretende avaliar a queda da glicemia devido à inibição da produção

endógena de glicose regulada pelos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e estímulo de sua captação pelos tecidos alvos. Dessa maneira, avaliou-se o ritmo de recuperação da glicose basal após injeção de glicose e insulina nos animais WT e Cx32-KO submetidos ao modelo da DHGNA. A demora na recuperação revela a incapacidade de metabolização da glicose pela insulina, indicando resistência à insulina. Adicionalmente, foi realizada a dosagem dos níveis plasmáticos de insulina.

4.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Após 8 semanas de dieta, os camundongos foram submetidos a jejum alimentar por 16 horas. Posteriormente, eles foram pesados e a ponta da cauda foi cortada para coleta de sangue ao longo do teste. A glicemia foi medida imediatamente para determinação da concentração de glicose no tempo zero, utilizando-se o medidor glicêmico Accu-check performa[®] (Roche, Alemanha). Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de glicose (Sigma, EUA), diluída em PBS estéril (2 g/kg). A glicemia foi medida novamente 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose.

4.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

Dois dias após o teste de tolerância à glicose, foi realizado o teste de tolerância à insulina nos mesmos animais. Para realização do ITT, os animais foram submetidos a jejum alimentar por 4 horas. Posteriormente, eles foram pesados e a ponta da cauda foi cortada para coleta de sangue ao longo do teste. A glicemia foi medida imediatamente para determinação da concentração de glicose no tempo zero, utilizando-se o medidor glicêmico Accu-check performa[®] (Roche, Alemanha). Em seguida, os animais receberam uma injeção i.p. de insulina regular humana (Humulin R U-100, Brasil), diluída em PBS estéril (0,75 U/kg). A glicemia de cada animal foi medida novamente 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina.

4.7 DOSAGEM DE INSULINA PLASMÁTICA

Para dosagem plasmática de insulina foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA). Foi utilizado kit comercial segundo as orientações do fabricante (Crystal Chem, EUA). As placas pré-sensibilizadas com os anticorpos de captura foram incubadas com as amostras de plasma, assim como as soluções controle fornecidas pelo fabricante, para a confecção das curvas de calibração, durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo conjugado durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi realizada a incubação com a solução cromatogênica por 30 minutos, desta vez protegida da luz. A reação foi interrompida com 100 µL de ácido fosfórico e a leitura da absorbância foi realizada imediatamente em leitor de placas (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, EUA), com comprimento de onda a 450 nm e correção a 630 nm.

4.8 BIOMETRIA E COLHETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após o término das 8 semanas do período experimental, os animais foram pesados (peso corpóreo) e eutanasiados por anestesia inalatória com isoflurano (Cristalia, Brasil), seguida de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue foi coletado em seringas previamente heparinizadas (Blau, Brasil) e transferido para tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Os tubos com sangue foram centrifugados logo após a eutanásia para separação do plasma a 4.000 rpm e 4°C durante 10 minutos, o qual foi armazenado em freezer -20°C até o momento das análises bioquímicas e ensaios imunoenzimáticos. O fígado dos animais foi colhido, pesado e fotografado para análise macroscópica. As gorduras retroperitoneal e epididimal também foram colhidas e pesadas. O peso relativo do fígado e das gorduras foi calculado através da fórmula: $\text{Peso relativo (\%)} = \frac{\text{Peso do fígado ou da gordura (g)}}{\text{Peso corpóreo(g)}} \times 100$. Fragmentos de fígado e da gordura foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Outros fragmentos foram fixados em solução de formol 10%, por 24 horas, posteriormente trocados para álcool 96°C e processados histologicamente.

4.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Foram realizadas as dosagens plasmáticas de aspartato aminotransferase (AST, U/l), alanina aminotransferase (ALT, U/l), triglicérides (TG, mg/g) e colesterol (CL, mg/dL). Os *slides* de cada teste foram processados e analisados no equipamento Vet Test 8008 (QBC Analyzer, IDEXX Laboratories Ltd, Chalfont St Peter, Reino Unido).

4.10 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos de tecido hepático fixados em solução de formalina foram processados histologicamente e incluídos em parafina. Em micrótomo, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura, os quais foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (TILLMANN et al., 1999) para avaliação histopatológica. Para avaliação do acúmulo de gordura no tecido hepático, cortes congelados obtidos em criostato foram corados pelo método de *Oil red-O* (MEHLEM et al., 2013). Para a realização do procedimento de imunohistoquímica, os cortes histológicos foram aderidos em lâminas silanizadas (Starfrost, Alemanha).

4.10.1 Classificação histopatológica da DHGNA

A avaliação histopatológica baseou-se na classificação padronizada pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network*, que designou e validou um sistema de escore de atividade de DGHNA para estudos clínicos – “*NAFLD Activity Score (NAS)*” (KLEINER et al., 2005). O escore de cada animal foi definido pela soma dos graus de esteatose macro/microgoticular (0 a 3), inflamação globular (0 a 3) e balonização (0 a 2) avaliados nas lâminas coradas em HE. Assim, os valores do índice NAS variaram entre 0 e 8, sendo que $NAS \geq 5$ correlaciona-se com o diagnóstico de EHNA, enquanto $NAS \leq 2$ é considerado como esteatose simples. As lâminas histológicas foram minuciosamente avaliadas por dois observadores, de maneira duplo cega, e receberam um valor para cada critério seguindo os itens apresentados no Quadro 3.

Quadro 3- Parâmetros para classificação histopatológica e cálculo do índice de atividade histológica (NAS) na doença hepática gordurosa não alcoólica experimental

Grau de esteatose	Grau
< 5%	0
5% - 33%	1
33 – 66%	2
> 66%	3
Grau de inflamação lobular	Grau
Sem focos inflamatórios no campo 200x	0
< 2 focos inflamatórios por campo de 200x	1
2 a 4 focos inflamatórios por campo de 200x	2
> 4 focos inflamatórios por campo de 200x	3
Grau de balonização	Grau
Sem balonização	0
Poucas células balonizadas	1
Muitas células balonizadas	2

Fonte: (Modificado de KLEINER et al., 2005).

4.10.2 Avaliação histológica da gordura hepática

Para avaliação do acúmulo de gordura no tecido hepático, foram realizados cortes histológicos com 10 µm de espessura em criostato (Leica MicroSystems, EUA) à -18°C. As lâminas com os cortes congelados foram retiradas do freezer -80°C apenas no momento da coloração, fixadas em solução de formalina 10% por 10 minutos e incubadas em solução de isopropanol 60% (diluído em água MiliQ), por 5 minutos. A solução estoque de *Oil red* foi preparada com 300 mg de corante *Oil red-O* (Sigma, EUA) e 100 mL de isopropanol P.A. Em seguida, as lâminas foram coradas em solução de uso de *Oil Red-O* por 15 minutos, a qual foi preparada com 3 partes da solução estoque e 2 partes de água miliQ. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 2 minutos e montadas com glicerina e lamínula. As lâminas foram vedadas com esmalte e mantidas à 4°C até o momento da análise.

4.10.3 Imunohistoquímica para PCNA

Para a identificação dos hepatócitos em proliferação, foi realizada a reação de imunohistoquímica para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Os cortes histológicos preparados em lâminas silanizadas foram desparafinizados e reidratados, sendo em seguida submetidos ao procedimento de recuperação antigênica em solução de tampão citrato (ácido cítrico 10 mM, pH 7.2) por 13 minutos em micro-ondas, na potência máxima. Após, as lâminas foram imediatamente resfriadas em água corrente, lavadas em águas destiladas e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 6%, por 30 minutos e protegido da luz. Após lavagens em PBS 1x com Tween20[®] (pH 7,4), os cortes foram incubados em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal anti-PCNA humano (Dako, EUA), diluído 1:15.000 em solução contendo PBS 1x, 1% de BSA e 0,1% de azida sódica por 30 minutos em estufa à 37°C e 18h à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero SuperPicture Poly HRP conjugate (Life Technologies, EUA) durante 30 minutos em estufa à 37°C. Após lavagens, as lâminas foram reveladas em solução de diaminobenzidina (Sigma, EUA) (100mg de diaminobenzidina; 1 mL de DMSO; 1 mL H₂O₂ 6%; PBS pré-aquecido à 37°C q.s.p 100 mL) e contra coradas com Hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos de todas as reações pela omissão do anticorpo primário e lâminas com cortes de intestino foram utilizadas como controle positivo.

4.11 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para realização dos ensaios de ELISA e *Western blot*, foi realizada a extração e quantificação de proteínas das amostras de fígado e gordura. As proteínas foram extraídas de homogenato total do fígado ou gordura em tampão de lise contendo inibidores de protease *Complete Lysis-M* (Roche, Alemanha). Aproximadamente 300 µL de solução foram adicionadas a 30 g de tecido hepático ou tecido adiposo congelado. O tecido foi homogeneizado em triturador por 10 segundos em tubo de vidro, sendo mantido no gelo durante todo o processamento. Posteriormente, o homogenato total foi transferido para tubo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugado por 15 minutos, a 14000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi

separado e armazenado em freezer -80°C até o momento do uso. A concentração das proteínas do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se um reagente comercial (Bio-RAD, EUA) e albumina de soro fetal bovino (BSA, Sigma, USA) como padrão.

4.12 WESTERN BLOT PARA PCNA

A quantificação proteica do PCNA foi avaliada pelo método de *Western blot*. Para isso, foram aplicados 50 µg/poço de cada lisado proteico em gel pré-fabricado de poliacrilamida a 12% (Mini-Protean® TGXTM; Bio-Rad, EUA) e foi realizada eletroforese em cuba vertical por 1 hora, a 100V, contendo tampão de corrida Tris/Glycine/SDS diluído 1:10 em água destilada (Bio-Rad, EUA). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose pelo Sistema iBlot (Life Technologies, EUA), por 7 minutos. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado (BD Biosciences, EUA) em TTBS (tampão tris-salina, 20 mM Tris, 0,15 M NaCl e 0,1% de Tween20®). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, EUA), diluído 1:500 em TTBS com 5% de leite desnatado, *overnight* a 4°C sob agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TTBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (Dako, EUA), diluído 1:100 em TTBS com 5% de leite desnatado, por uma hora sob agitação. Após lavagens em TTBS, as proteínas foram reveladas com ECL (Thermo Fisher Scientific, EUA) e visualizadas por quimiluminescência (ChemiDOC, Bio-Rad, EUA). Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas incubadas com anticorpo monoclonal anti-β-Actina (Sigma, EUA), diluído 1:10000 em TTBS com 5% de leite desnatado, por duas horas. Após nova lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-camundongo (Dako, EUA), diluído 1:80000 em TTBS com 5% de leite desnatado, por 1 hora, e novamente revelada com ECL visualizadas por quimiluminescência. As imagens foram capturadas pelo ChemiDoc (Bio-Rad, EUA) e analisadas pelo software Image Lab versão 5.2 (Bio-Rad, EUA). O sinal das bandas de PCNA foi normalizado pelo sinal das bandas de β-actina e comparados entre os grupos.

4.13 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES HEPÁTICOS

Para a extração de triglicérides hepáticos, 30 mg de tecido hepático foram macerados, adicionados a 1 mL da solução de extração (2 partes de clorofórmio e 1 parte de metanol) e incubados em termobloco seco à 22°C, com agitação orbital de 1400 rpm a cada 12 segundos, durante 1 hora. Em seguida, o produto da digestão foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar os debris celulares e o sobrenadante foi transferido para outro tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Foram adicionados 200 µL de H₂O destilada e centrifugado novamente a 8000 rpm por 5 minutos. Finalmente, a fase lipídica foi transferida para outro tubo *eppendorf*, o qual permaneceu aberto *overnight* para evaporação do solvente, sendo armazenado em freezer -80°C até o momento do uso. A quantificação de triglicérides hepáticos foi realizada pelo kit *Serum Triglyceride Determination* (Sigma, EUA), segundo as orientações do fabricante. Resumidamente, os triglicérides secos foram solubilizados em 100 µL de álcool butílico, incubados com as soluções do kit e a absorbância de cada amostra foi mensurada a 540 nm em leitor de placas (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.14 QUANTIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS HEPÁTICOS

As amostras do tecido hepático foram esterificadas como descrito por Shirai et al. (2005). Os homogenatos de fígado (10 mg) foram transferidos para tubos contendo 1 mg de IS (éster metílico do ácido tricosanóico), 50 µL de 0,5% de BHT e 1 mL de 0,5 M de NaOH metanólico). A solução foi vortexada por 15 segundos e aquecida em banho-maria 100°C durante 5 minutos. Após resfriamento, as amostras foram misturadas com 2 mL de 14% de BF₃ em metanol, agitada em vortex, e aquecida em banho-maria à 100°C por mais 5 minutos. Após novo resfriamento, 1 mL de isooctano foi adicionado. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 30 segundos, foram adicionados 5 mL de solução saturada de NaCl e os tubos foram homogeneizados suavemente. Após centrifugação a 13500 rpm durante 5 minutos, a fase orgânica foi transferida para um novo tubo e seca em fluxo de nitrogênio. Os lipídeos recuperados foram reconstituídos em 0,5 mL de isooctano.

A quantificação de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa (CG) equipado com um detector de MS G3243A (Agilent 7890). Um sistema de GC, Agilent

Technologies Inc., Santa Clara, EUA). Uma coluna capilar de sílica (J&W DB-23 Agilent 122-236; 60m x 250 mm diâmetro interior) foi usada para injetar 1 µL de amostra. O gás hélio com alto grau de pureza foi utilizado como gás de arraste com uma taxa de fluxo de 1,3 mL/min com injeção dividida de amostra de 50:1. A temperatura do forno aumentou gradualmente de 80°C to 175°C (5°C/ min), seguido de outro gradiente de 3°C/ min até atingir 230°C; esta temperatura foi mantida por 5 minutos.

A temperatura entrada e transferência de linha da CG foram de 250°C e 280°C, respectivamente. A espectrometria de massa GC-MS foi realizada utilizando 70 eV elétron-ionização na aquisição e quantificado por corrente total de íons. Os ácidos graxos foram identificados por NIST11 e os seus tempos de retenção foram comparados com os de padrão de 4 misturas purificadas dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (Sigma, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg/100mg de tecido hepático.

Quadro 4 - Lista de ácidos graxos analisados

Ácidos graxos	
Palmítico	(C16:0)
Palmitoleico trans	(C16:1 n7)
Palmitoleico cis	(C16:1 n9)
Estearico	(C18:0)
Oleico	(C18:1 n9 cis)
Vacênico	(C18:1 n7)
Linoleico	(LNA- C18:2 n6 cis)
Eicosenoíco	(20:1 n9)
Diomo gama linoleico	(DGLA- C20:3 n6)
Araquidônico	(ARA- C20:4 n6)
Erúico	(C22:1 n9)
Nervônico	(C24:1 n9)

4.15 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA (*ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY*)

4.15.1 Citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α

Para a dosagem das citocinas inflamatórias no plasma, fígado e gordura dos animais, foram utilizados kits comerciais, seguindo as orientações do fabricante (BD Biosciences, EUA). Inicialmente, placas de plástico estéreis de 96 poços e livres de tratamentos (Corning, EUA) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura, *overnight* e a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução de lavagem e bloqueadas em solução de PBS com soro fetal bovino, durante 1 hora. Em seguida, foram adicionadas nas placas as amostras alvo (plasma, homogenato de tecido hepático ou de tecido adiposo), assim como as soluções controle fornecidas pelo fabricante para a confecção das curvas de calibração. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 2 horas. Para a detecção de IL-10, IFN- γ e IL-1 β , as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual permaneceu incubado durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com a enzima conjugada por 30 minutos, seguida de novas lavagens e incubação com a solução cromatogênica por 30 minutos, desta vez protegida da luz. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido fosfórico e a leitura da absorbância foi realizada imediatamente em leitor de placas (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, EUA), com comprimento de onda a 450 nm e correção a 570 nm. Para a detecção das citocinas IL-6 e TNF- α , o anticorpo de detecção e a enzima conjugada foram aplicados juntos, na mesma etapa, sendo incubados durante 1 hora em temperatura ambiente e seguiu-se o mesmo protocolo das outras citocinas. As diluições padronizadas das diferentes amostras biológicas para cada citocina estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Diluições utilizadas das amostras para cada citocina analisada – São Paulo – 2015

Amostra	IL-6	IL-10	IL-1β	TNF-α	IFN-γ
Plasma	NR	NR	NR	NR	1:5
Tecido hepático	1:5	1:2	1:100	1:100	1:10
Tecido adiposo	1:1	1:100	1:5	1:5	1:10

Legenda: IL-6 (interleucina 6); IL-10 (interleucina 10), IL-1 β (interleucina 1 β), TNF- α (fator de necrose tumoral α); IFN- γ (interferon γ), NR (Não reagente).

4.15.2 Leptina e adiponectina

Para a dosagem da leptina e adiponectina no plasma e tecido adiposo dos animais, foram usados kits comerciais, seguindo as orientações do fabricante (R&D system, EUA). As placas pré-sensibilizadas com os anticorpos de captura foram incubadas com as amostras alvo (plasma e homogenato do tecido adiposo), assim como as soluções controle fornecidas pelo fabricante para a confecção das curvas de calibração, durante 2 horas para leptina e 3 horas para adiponectina, em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo conjugado durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com a enzima conjugada por 30 minutos, seguida de novas lavagens e incubação com a solução cromatogênica por 30 minutos, desta vez protegida da luz. A reação foi interrompida com 100 μ L de ácido fosfórico e a leitura da absorbância foi realizada imediatamente em leitor de placas (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, EUA), com comprimento de onda a 450 nm e correção a 570 nm. As diluições padronizadas das diferentes amostras biológicas para cada citocina estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Diluição utilizada para cada adipocinas analisada - São Paulo – 2015

Amostra	Leptina	Adiponectina
Plasma	1:50	1:5000
Tecido adiposo	1:5	1:200

4.15.3 Análise de dados dos ELISA

Para determinar a concentração de citocina/adipocinas em cada amostra, o valor de absorbância foi relacionado aos valores da curva padrão para determinar a concentração final em cada amostra. Em seguida, o valor de concentração foi multiplicado pela diluição escolhida para cada citocina e, posteriormente, normalizada pela quantidade total de proteínas dos homogenatos quantificada pelo método descrito no item 4.11.

4.16 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

4.16.1 Enzimas do metabolismo oxidativo

Foram analisadas as seguintes enzimas do estresse oxidativo: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e superóxido dismutase (SOD).

Homogenatos de tecido hepático, preparados com tampão fosfato de sódio (10 mM pH 7,4) na proporção de 1g de tecido para 10 mL de tampão, foram utilizados para determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

A CAT acelera a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

Para a determinação de sua atividade, pipetou-se 140 µL do tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), com EDTA 1mM em microplaca com tratamento UV, logo em seguida, foram adicionados 20 µL da diluição final do homogenato (0,05 µg/µL). Por fim, acrescentou-se 40 µL de solução de H₂O₂ 30 mM (56,2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% em 10 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). A reação foi monitorada, em intervalos de 45 segundos, durante 8 minutos a 240 nm e temperatura de 26°C, por um leitor de microplacas multidetecção (BioTek, Synergy HT, Winooski, VT, EUA), integrado ao software Gen 5. A atividade da CAT (U/mg de proteína) foi determinada através da mensuração da redução da H₂O₂ (BEERS; SIZER, 1952) sendo o percentual de inibição interpolado na regressão linear

preparada com 0,11 a 0,44 U/mg de proteína de CAT de fígado bovino (Sigma, C8362, Cambridge, MA, USA).

A GPx é outra enzima que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos a água, através da oxidação da glutathione reduzida (GSH), que atua como cosubstrato da enzima:

A GPx dos mamíferos tem uma maior afinidade para o H_2O_2 do que a CAT, o que significa que em concentrações baixas deste peróxido, a GPx apresenta um papel muito mais ativo na sua remoção celular.

Para determinar a atividade de GPx (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984), 30 μ L de homogenato hepático (contendo 2 μ g/ μ L de proteína) foi incubado com 125 μ L de tampão fosfato 0,1M contendo 1mM de EDTA (pH7,4), 5 μ L de glutathione reduzida (GSH) 0,08 mol/L e 5 μ L de glutathione redutase (GR) (9,6U) a 37°C por 5 minutos em microplaca de 96 poços. Então, 30 μ L de NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) 1,2mM e 5 μ L de terc-butil hidroperóxido a 0,46% foram adicionados à solução. A absorbância (340 nm) foi continuamente monitorada por um leitor de microplacas multidetecção (BioTek, Synergy HT, Winooski, VT, EUA), integrado ao software Gen 5, por 4 minutos a 37°C. A atividade de GPx foi expressa em U/mg de proteína, calculada com base numa regressão linear usando a % de inibição promovida pela enzima em concentrações variando de 1,5 a 50 U/mg de glutathione peroxidase provindas de eritrócitos bovinos (Sigma, G6137, Cambridge, MA, USA).

A GR opera em conjunto com a GPx, catalisando a redução da glutathione oxidada (GSSG) pelo NADPH, transformando-a novamente em GSH:

A determinação da atividade de GR (Torres et al., 2011) ocorreu pela incubação de 20 μ L de homogenato hepático contendo 4 mg/mL de proteína com 180 μ L de meio de reação (2 mL de tampão fosfato 0,1M com 1 mM de EDTA, pH7,0; 1,5 mL de EDTA 0,005 M; 1,5mL de água milliQ, 10 mg de GSSG e 2 mg NADPH). Por 26 minutos, a 37°C, a absorbância (340 nm) foi monitorada por um leitor de microplacas multidetecção (BioTek, Synergy HT, Winooski, VT, EUA), integrado ao software Gen 5, continuamente. A atividade de GR (U/mg de proteína) foi calculada pela regressão linear usando a % de inibição da oxidação do NADPH promovida pela GR de *Saccharomyces cerevisiae* a concentrações de 0.0003 a 0.25 U/mL (Sigma, G3664, Cambridge, MA, USA).

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

A determinação de sua atividade em homogenato de tecido hepático foi possível por um microensaio (EWING; JANERO, 1995) baseado numa reação aeróbica entre NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido) e PMS (Metossulfato de Fenazina), que gera radicais superóxido em pH não ácido. O NBT (*nitro blue tetrazolium*) foi usado como detector molecular para avaliar a dismutação destes radicais pelas SODs teciduais (tipos Cu, Zn e Mn), através de sua redução a um produto estável: a formazana. Amostras de homogenato (25 µL) contendo 0,024 mg/mL de proteína foram colocadas numa microplaca de 96 poços já contendo 200 µL de meio de reação composto de 0,1 mM de EDTA, 62 µmol/L de NBT e 98 µmol/L de NADH em tampão fosfato a 50 mM (pH 7,4). A reação se iniciou com a adição de 25 µL de um preparado fresco de 33 µmol/L de PMS em tampão fosfato 50 mM com 0,1 mM de EDTA (pH 7,4). A reação foi monitorada durante 5 minutos a 560 nm, 26°C, por um leitor de microplacas multidetecção (BioTek, Synergy HT, Winooski, VT, EUA), integrado ao software Gen 5. O efeito da eliminação dos radicais superóxido pela SOD (U/mg de proteína) foi calculado pela interpolação da inibição (%) de formação da formazana, usando uma regressão linear preparada com 0,69 a 22,15 U/mg de proteína de SOD de eritrócitos bovinos (Sigma, S7446, Cambridge, MA, USA).

4.16.2 Concentração de Malondialdeído (MDA)

A concentração do malondialdeído foi determinada em proteínas extraídas por cromatografia líquida de alta performance, seguindo o protocolo de Hong et al.(2000). O ácido tiobarbitúrico-Malondialdeído conjugado foi injetado na fase reversa da Phenomenex C18 (fase 250 mm x 4.6 mm; 5 µm – Phenomenex, Torrance, CA, USA) com uma pré coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287) e foi quantificado por fluorometria em excitação de 515 nm e emissão de 553 nm. A bomba de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) entrega a fase móvel isocrática, isto é, 60% de solução salina tamponada com fosfato (10 mmole, pH 7,4) e 40% de metanol a uma taxa de fluxo de 1,0 mL por minuto. A curva

padrão foi preparada usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos como pmol de MDA/mg de proteína.

4.17 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA (PCR ARRAY)

4.17.1 Extração de RNA

A extração de RNA do tecido hepático foi realizada com o Kit *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE, EUA). Inicialmente, 350 μ L da solução de lise RA1 do kit acrescido de 3,5 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma, EUA), foi adicionado em aproximadamente 30 mg de tecido hepático. Com a ajuda de pistilo autoclavados e RNase-free, o tecido foi macerado. Então, a mistura foi transferida para colunas de extração em sílica, seguindo o protocolo determinado pelo fabricante do kit de extração. O processo consistiu basicamente em colocar o macerado em colunas de extração que retêm o RNA, que nas etapas seguintes foi lavado e purificado com uma sequência de reagentes. Na etapa final, o reagente promove a eluição do RNA da coluna, o qual foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

4.17.2 Quantificação e determinação da integridade do RNA total

Uma alíquota de 10 μ L do RNA total foi utilizada para quantificação e verificação de sua integridade. Para análise qualitativa, as amostras foram adicionadas a 2 μ L do corante *Blue Green Loading Dye I* (LGC biotecnologia, BRA) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% diluída em TAE 1X (48,4 g de Tris base; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; 11,4 mL de ácido acético; H₂O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000 mL), 60V, por 1,5 hora, para a visualização das bandas 28S e 18S em luz UV (ChemiDOC, Bio-Rad, EUA). A quantificação do RNA total foi realizada por fluorimetria, utilizando-se o sistema Qubit, segundo as indicações do fabricante (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.17.3 Transcrição reversa (cDNA)

A transcrição reversa é uma reação onde ocorre a confecção do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído do tecido hepático. O RNA total foi tratado com DNase I para eliminar quaisquer resquícios de DNA. Foi utilizado 1 µL de DNase I para tratar 4 µg/µL de RNA total. Os *ependorfs* foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) para bloquear a ação da enzima e aquecidos por 10 minutos a 65°C no termociclador. As amostras receberam 1 µL de Oligo DT; 1 µL de dNTPs (mix 10 mM-2,5 mM de cada dNTP) e posteriormente foram incubadas a 65°C por 5 minutos e resfriadas em gelo. Ainda no gelo, foram adicionados a cada tudo 4 µL do buffer 5X (*superscript II*); 2 µL de DTT 0,1M; 1 µL de *RNAse OUT* incubando-se por 2 minutos a 42°C e resfriadas no gelo. Foi acrescido 1 µL da enzima de transcrição reversa *superscript II*, permanecendo incubado a 42°C, por 50 minutos e em seguida por 70°C por 15 minutos no termociclador. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA. Todos os reagentes foram fornecidos pela empresa *Life Technologies* (EUA).

4.17.4 PCR-Array

Para análise da expressão gênica foi utilizado o kit de PCR array *RT² Profiler™ PCR Array Mouse Fatty Liver* (PAMM-167Z), pré-fabricado com 84 genes relacionados à DHGNA (Qiagen, EUA) (Apêndice A). As placas de *RT² Profiler PCR* são matrizes que contêm ensaios de primers para 84 genes da via metabólica da doença e 5 genes endógenos. Além disso, apresenta 3 controles de contaminação de DNA genômico, 3 controles de transcrição reversa e 3 controles positivos de PCR. As amostras de cDNA foram misturadas ao *SYBR Green* qPCR Mastermix e distribuídas igualmente nos poços (1350 µL 2x RT2 SYBR Green Mastermix, 102 µL de cDNA e 1248 µL de água). As reações de qPCR foram realizadas no LightCycler 96® (Roche, Alemanha) e os dados analisados por $\Delta\Delta CT$ e normalizados contra os genes endógenos.

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos em valores de média e desvio padrão. Para a comparação das médias foi utilizada a análise de variância seguida da aplicação do teste *t-Student*, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO INTERFERE NA RESISTÊNCIA À INSULINA

A partir dos valores de glicemia obtidos durante o teste de tolerância à glicose e à insulina, não foram observadas diferenças significativas na metabolização da glicose nos animais Cx32-KO quando comparados aos animais WT. Entretanto, é possível identificar uma discreta demora na recuperação dos níveis basais de glicose nos animais Cx32-KO, tanto no GTT quanto no ITT, podendo sinalizar um início de desenvolvimento de resistência à insulina (Figura 12).

Figura 12 - Testes de tolerância à glicose e à insulina

Legenda: Valores de glicemia obtidos durante (A) GTT e (B) ITT em animais Cx32-KO (n=20) e WT (n=20). Para o GTT, foi medido o índice basal de glicemia após jejum alimentar de 16 horas, assim como as taxas glicêmicas 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção i.p. com solução de glicose (2 g/kg). O ITT foi realizado dois dias após o GTT, com mensuração da glicemia basal e das taxas glicêmicas 30, 60, 90 e 120 após administração i.p. de insulina (0,75 U/kg). Não houve diferença estatística entre os animais WT e Cx32-KO em nenhum dos pontos analisados no GTT e ITT.

Os níveis plasmáticos de insulina, dosados por ELISA, também não apresentaram diferença significativa ($p=0,537$) entre os animais Cx32-KO e WT (Figura 13).

Figura 13- Níveis plasmáticos de insulina

Legenda: Níveis plasmáticos de insulina nos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. Não houve diferença estatística entre os animais WT e Cx32-KO ($p=0,537$).

5.2 DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA O PESO CORPORAL, MAS AUMENTA OS PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DO FÍGADO

Ao final do período experimental, não se observou diferenças significativas ($p=0,491$) entre o peso corporal final dos animais WT e Cx32-KO (Tabela 4).

Tabela 4 - Peso corpóreo inicial e final dos animais WT e Cx32-KO – São Paulo – 2015

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)
WT (n=11)	$26,0 \pm 1,8$	$29,6 \pm 2,8$
Cx32-KO (n=9)	$25,4 \pm 2,1$	$29,0 \pm 2,1$

Na análise macroscópica, o fígado dos animais alimentados com a ração hiperlipídica e deficiente em colina apresentou aspecto amarelado e com bordos abaulados, porém sem diferenças significativas entre os grupos. No entanto, os animais Cx32-KO apresentaram aumento significativo do peso do fígado absoluto ($p=0,001$) e relativo ($p<0,0001$) quando comparados aos animais WT (Figura 14).

Figura 14- Aspectos macroscópicos e biométricos do fígado

Fonte: (TIBURCIO, 2016).

Legenda: Fotomacrografia do fígado de animais WT (A) e Cx32-KO (B) submetidos à dieta hiperlipídica deficiente em colina para indução da DHGNA. Observe a coloração amarelada e bordos dos lobos hepáticos levemente abaulados, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. (C) Peso relativo do fígado dos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) (D) Peso absoluto do fígado dos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) *($p < 0,0001$);**($p = 0,0019$).

Foram analisados os dados biométricos referentes ao peso relativo das gorduras retroperitoniais e epididimais nos animais WT e Cx32-KO. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa no peso relativo das gorduras retroperitoniais e epididimais entre os animais WT e Cx32-KO (Figura 15).

Figura 15- Peso relativo das gorduras retroperitoneais e epididimais

Legenda: Peso relativo das gorduras (A) epididimal ($p=0,831$) (B) retroperitoneal ($p=0,339$) em camundongos WT ($n=11$) e Cx32-KO ($n=9$). Não houve diferença estatística entre os animais WT e Cx32-KO

5.3 DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA OS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA DHGNA

A análise histopatológica dos cortes histológicos do fígado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica deficiente em colina, corados pela técnica de HE e avaliados pelos critérios estabelecidos por Kleiner et al. (2005), demonstraram a presença de EHNA em todos os animais após o término do período experimental ($NAS \geq 5$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes genótipos (Figura 16).

Figura 16- Classificação histopatológica da DHGNA

Fonte: (TIBURCIO, 2016).

Legenda: Análise histopatológica para classificação da DHGNA em cortes histológicos do fígado de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. Fotomicrografia do tecido hepático de animais WT (A) e Cx32-KO (B). Coloração HE. Barra de escala = 20 µm. Fotomicrografia do tecido hepático de animais WT (C) e Cx32-KO (D). Coloração Oil Red-O. Barra de escala = 20 µm. (E) Escore para esteatose. (F) Escore para balonização hepatocelular. (G) Escore para inflamação lobular. (H) Índice NAS.

5.4 DEFICIÊNCIA DE CX32 AUMENTA LESÃO HEPATOCELULAR E COLESTEROL TOTAL CIRCULANTE

Após dosagem bioquímica, observou-se o aumento significativo dos níveis plasmáticos de ALT ($p=0,013$), AST ($p=0,008$) e colesterol ($p=0,001$) nos animais Cx32-KO quando comparados aos animais WT. Por outro lado, os níveis plasmáticos de triglicérides não apresentaram diferença significativa entre os genótipos ($p=0,061$) (Figura 17).

Figura 17- Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Legenda: Níveis plasmáticos de ALT (A), AST (B), colesterol (C) e triglicérides (D) nos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

5.5 DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES NO FÍGADO

Foi analisada a concentração de ácidos graxos totais e o perfil de ácidos graxos no fígado de animais WT e Cx32-KO, assim como os níveis de triglicérides hepáticos. Não houve diferença significativa na quantidade total de ácidos graxos no fígado ($p=0,542$) (Figura 15A), no entanto, houve diferença no perfil dos ácidos graxos isolados ($p<0,05$). Os animais Cx32-KO apresentaram menor quantidade dos ácidos esteárico (C18:0), linoleico (LNA- C18:2 n6 cis), diomo- γ -linoleico (DGLA- C20:3 n6), nervônico (C24:1 n9) e eicosenóico (C20:1 n9) (Tabela 5). Na dosagem de triglicérides hepáticos, os animais Cx32-KO apresentaram nível significativamente maior ($p=0,015$) quando comparados aos animais WT (Figura 18).

Figura 18- Ácidos graxos totais

Legenda: Concentração de ácidos graxos totais (A) e de triglicérides (B) no fígado de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. * ($p<0,05$)

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos no tecido hepático – São Paulo – 2015

Ácido graxo	WT	CX32-KO	<i>p-Value</i>
C16:0	2,06	1,84	0,110
C16:1 n7	0,04	0,03	0,660
C16:1 n9 cis	0,42	0,41	0,960
C18:0	0,68	0,60	0,000
C18:1 n9 cis	4,65	4,18	0,230
C18:1 n7	0,33	0,31	0,720
C18:2 n6 cis (LNA)	2,38	1,87	0,000
C20:1 n9	0,04	0,00	0,020
20:3 n6 (DGLA)	0,04	0,00	0,020
C20:4 n6 (ARA)	0,33	0,30	0,130
C22:1 n9	0,01	0,00	0,370
C24:1 n9	0,13	0,05	0,02
TOTAL	11,10	9,60	0,07

Legenda: Perfil de ácidos graxos no fígado de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas.

5.6 DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO FÍGADO APÓS INDUÇÃO DA DHGNA

Os métodos de imunohistoquímica e *western blot* para PCNA não revelaram diferença significativa na proliferação celular hepática entre os animais WT e Cx32-KO ($p>0,780$), que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas (Figura 19).

Figura 19 - Imunohistoquímica e *Western blot* para PCNA

Fonte: (TIBURCIO, 2016).

Legenda: Fotomicrografia do tecido hepático após reação de imunohistoquímica para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). (A) Animal WT. (B) Animal Cx32-KO. (C) *Western blot* para quantificação de PCNA em homogenato de tecido hepático de camundongos WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. Não houve diferença estatística entre os animais WT e Cx32-KO ($p=0,780$)

5.7 DEFICIÊNCIA DE CX32 REDUZ NÍVEIS DE LEPTINA E ADIPONECTINA NO TECIDO ADIPOSEO

Os níveis dos hormônios leptina e adiponectina foram mensurados no plasma e tecido adiposo dos animais WT e Cx32-KO após a indução do modelo dietético da DHGNA. Não foram observadas diferenças significativas em ambas as adipocinas no plasma dos animais WT e Cx32-KO, porém, observaram-se níveis significativamente menores de leptina ($p=0,033$) e adiponectina ($p=0,010$) no tecido adiposo dos animais Cx32-KO (Figura 20).

Figura 20- Dosagem das adipocinas leptina e adiponectina

Legenda: Níveis plasmáticos de leptina (A) e adiponectina (B) nos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. (C) Dosagem de leptina em tecido adiposo de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9). (D) Dosagem de adiponectina em tecido adiposo de animais WT (n=8) e Cx32-KO (n=8). *($p<0,05$); **($p<0,01$).

5.8 DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA A LIBERAÇÃO DE CITOCINA INFLAMATÓRIAS NO PLASMA E TECIDOS HEPÁTICO E ADIPOSE.

No tecido hepático, não houve diferença estatística nos níveis das citocinas IL-1 β ($p=0,095$), IL-6 ($p=0,301$), IFN- γ ($p=0,092$) e MCP-1 ($p=0,898$) entre os animais WT e Cx32-KO. No entanto, os animais Cx32-KO apresentaram menor concentração hepática de IL-10 ($p=0,020$) e maior concentração de TNF- α ($p=0,020$) (Figura 21).

Figura 21 - Dosagem de citocinas inflamatórias no tecido hepático

Legenda: Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA em tecido hepático de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. (A) IL-1 β em tecido hepático. (B) IL-6 em tecido hepático. (C) TNF- α em tecido hepático. (D) IL-10 em tecido hepático. (E) IFN- γ em tecido hepático. (F). MCP-1 em tecido hepático. *($p < 0,05$).

Figura 22 – Dosagem de IFN- γ plasmático

Legenda: Dosagem por ELISA de IFN- γ plasmático nos animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. Houve diferença estatística entre os animais WT e Cx32-KO ($p=0,036$)

No plasma, os animais Cx32-KO apresentaram aumento significativo na concentração de IFN- γ ($p=0,036$) em relação aos animais WT (Figura 22). As demais citocinas não apresentaram valores mensuráveis no plasma dos animais submetidos ao modelo de DHGNA.

No tecido adiposo, não houve diferença significativa nos níveis das citocinas IL-1 β ($p=0,583$) e TNF- α ($p=0,110$) entre os animais WT e Cx32-KO. No entanto, os animais Cx32-KO apresentaram menores concentrações de IFN- γ ($p=0,005$), IL-6 ($p=0,000$) e IL-10 ($p=0,011$) em relação aos animais WT (Figura 23).

Figura 23 - Dosagem de citocinas inflamatórias no tecido adiposo

Legenda: Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA em tecido adiposo de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. (A) IL-1β. (B) IL-6. (C) TNF-α. (D) IL-10. (E) IFN-γ. *($p < 0,05$); **($p < 0,01$); ***($p < 0,0001$).

5.9 DEFICIÊNCIA DE CX32 NÃO ALTERA O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO, PORÉM EXACERBA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para avaliação do estresse oxidativo, foram dosadas as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase. A peroxidação lipídica foi avaliada pela concentração de malondialdeído (MDA). Os animais Cx32-KO apresentaram maiores níveis

hepáticos de MDA ($p=0,010$) em relação aos animais WT. No entanto, não houve diferença significativa entre os genótipos em relação às enzimas superóxido dismutase ($p=0,178$), catalase ($p>0,330$), glutathiona redutase ($p=0,365$) e glutathiona peroxidase ($p=0,940$) (Figura 24).

Figura 24- Dosagem de moléculas associadas ao estresse oxidativo hepático e peroxidação lipídica

Legenda: Dosagem de MDA e enzimas do estresse oxidativo em tecido hepático de animais WT (n=11) e Cx32-KO (n=9) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. (A) Malondialdeído (MDA). (B) Superóxido dismutase (SOD). (C) Catalase (CAT). (D) Glutathiona redutase (GR). (E) Glutathiona peroxidase (GPx). * ($p<0,05$).

5.10 DEFICIÊNCIA DE CX32 ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES CHAVES ENVOLVIDOS NA DHGNA

Para a análise da expressão gênica no tecido hepático, utilizou-se uma placa de PCR *array* que permitiu avaliar 84 genes envolvidos na DHGNA (Apêndice A). Os resultados foram calculados por $\Delta\Delta Ct$ e foram considerados diferentemente expressos os genes que apresentaram uma mudança positiva ou negativa de 2 “*fold change*” quando comparados entre os animais WT e Cx32-KO. Assim, foram identificados os genes proteína de ligação de ácidos graxos (Fabp3) e proteína de ligação do elemento de regulação do esterol (SREBP1) como superexpressos no tecido hepático dos animais Cx32-KO; e os genes proteína ligante de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (Igfb1) e piruvato desidrogenase quinase 4 (Pdk4) como menos expressos no fígado dos animais Cx32-KO ($p<0,05$) (Figura 26).

Figura 25 – Genes diferentemente expressos no tecido hepático

Legenda: A avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real em tecido hepático de animais WT (n=6) e Cx32-KO (n=6) que receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina por 8 semanas. Os genes Fabp3 e SREBP1 apresentaram-se aumentados, enquanto os genes Igfb1 e Pdk4 apresentaram-se diminuídos nos animais Cx32-KO. *($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

A doença hepática gordura não alcoólica (DHGNA) compreende um espectro de doenças desde esteatose simples até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), podendo evoluir para fibrose, cirrose e, eventualmente, carcinoma hepatocelular (CHC)(DAM-LARSEN et al., 2004). Atualmente, a DHGNA é considerada a doença mais comum no fígado e está intimamente associada com a resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade, o que a torna um problema de saúde pública mundial (MARCHESINI et al., 2003). O primeiro estágio da doença é caracterizado pelo acúmulo de triglicérides em mais de 5% dos hepatócitos, os quais são as principais células hepáticas e se comunicam através de junções do tipo *gap*, formadas por conexinas (Cx) 32 e 26 (STUTENKEMPER et al., 1992). Diversos estudos relacionaram o efeito protetor da Cx32 em doenças hepáticas (YAMAOKA et al., 1995; YAMAOKA et al., 2000; NAKASHIMA et al. 2004; COGLIATI et al., 2011), principalmente na hepatocarcinogênese (TEMME et al., 1997; MA; SUI; WANG, 2000; OMORI et al., 2001; EVERT et al., 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a participação desta proteína na esteatose hepática. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da Cx32 no desenvolvimento da DHGNA, analisando parâmetros correlacionados aos principais mecanismos fisiopatogênicos da doença em camundongos *knockout* para Cx32 (Cx32-KO). Em conjunto, nossos resultados demonstraram que os camundongos Cx32-KO, submetidos à dieta hiperlipídica deficiente em colina, apresentaram uma exacerbação das principais características da doença quando comparados com os animais selvagens (WT). Assim, estes resultados demonstram o papel protetor da Cx32 na DHGNA, sugerindo seu potencial com alvo terapêutico nesta doença.

A dieta hiperlipídica deficiente em colina é reconhecida como um modelo eficaz para indução da EHNA em roedores, pois além da esteatose, ela aciona mecanismos de lesão hepatocelular e inflamação. A colina desempenha um papel importante na beta-oxidação dos lipídios, bem como na produção e secreção de VLDL. Uma dieta carente em colina causa esteatose hepática devido a um aumento da captação de ácidos graxos e alterações na secreção de VLDL (ANSTEE E GOLDIN, 2006). Além disso, roedores alimentados com essa dieta apresentam aumento de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo hepático (TANAKA et al., 2012). Os resultados obtidos em relação às características macroscópicas e histopatológicas do fígado, como aumento de peso absoluto e relativo, coloração amarelada difusa e intensa presença de esteatose, balonização e inflamação tecidual, demonstraram que a

dieta foi eficiente para indução da EHNA nos camundongos WT e Cx32-KO. No entanto, o ganho de peso ao longo do período experimental não indicou obesidade, o que está de acordo com diversos trabalhos que utilizaram o mesmo modelo experimental. Estudos realizados em camundongos C57BL/6 não demonstraram aumento de peso significativo após 8 semanas de dieta hiperlipídica deficiente em colina, ou seja, os animais também não desenvolveram obesidade durante esse período (WOLF et al., 2014; ACHIWA et al., 2016).

Estudos demonstraram que a DHGNA está fortemente associada à redução da sensibilidade à insulina nos tecidos (SANYAL et al., 2001; FABBRINI et al., 2009; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; YKI-JÄRVINEN, 2010), mesmo em indivíduos não obesos (BUGIANESI et al., 2005). Desta forma, foram realizados os testes de tolerância à glicose e à insulina, assim como a dosagem de insulina plasmática, para avaliar a capacidade de metabolização da glicose pelos animais WT e Cx32-KO, com o principal objetivo de detectar a presença da resistência à insulina (RI). Os testes de GTT e ITT demonstraram que não houve diferença significativa no tempo de metabolização da glicose entre os genótipos, sugerindo que a ausência da Cx32 não influencia nos mecanismos de RI na DHGNA. Estudos realizados em roedores demonstraram que as conexinas desempenham importante papel no desenvolvimento da diabetes e da síndrome metabólica. A Cx36 atua de forma relevante nas células beta pancreáticas enquanto as Cx37, Cx40 e Cx43 atuam nas células endoteliais dos vasos que transportam esse hormônio (HAEFLIGER; NICOD; MEDA, 2004; MICHON et al., 2005; BAVAMIAN et al., 2007). No entanto, não há estudos que demonstrem a participação da comunicação intercelular mediada por Cx32 na RI.

Histologicamente, a DHGNA possui como característica básica a esteatose hepatocelular, podendo evoluir para forma mais grave da doença, como a EHNA, com a presença de balonização hepatocelular, infiltrado inflamatório lobular e fibrose. A partir da classificação histopatológica proposta por Kleiner et al. (2005), os cortes histológicos do fígado de animais WT e Cx32-KO foram avaliados e não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros semi-quantitativos analisados. De maneira similar, Sagawa et al. (2015) demonstraram que ratos transgênicos dominantes negativos para Cx32 (Cx32-Tg), submetidos à injeção única de DEN (200mg/kg) e 2 semanas de dieta deficiente em colina e metionina, apresentaram esteatose na mesma intensidade dos animais WT, porém, apenas os animais Cx32-Tg apresentaram infiltrado inflamatório. Após 12 semanas de dieta, os autores relataram intensa esteatose em ambos os grupos, porém maior quantidade de infiltrado inflamatório, células balonizadas e, conseqüentemente, índice NAS nos animais Cx32-Tg. Apesar dos resultados relacionados à inflamação e balonização não terem sido concordantes

com o trabalho de Sagawa et al. (2015), faz-se necessário considerar que os autores utilizaram um modelo animal, dieta e período experimental diferentes do presente estudo. Adicionalmente, a concordância do padrão de esteatose foi realizado ao nível histológico, uma vez que Sagawa et al. (2015) não realizaram métodos quantitativos para a dosagem de triglicérides e ácidos graxos no fígado.

Neste contexto, deve-se considerar que o índice NAS considera o padrão morfológico da deposição de gordura nos hepatócitos, sendo um método semi-quantitativo e com grandes intervalos de classificação. Assim, diferenças menores de 30% comumente não são diferenciadas por esta classificação, sendo necessária a associação de métodos analíticos quantitativos. No presente estudo, a maioria dos animais de ambos os genótipos apresentou esteatose $\geq 66\%$ dos hepatócitos (grau 3), porém, após métodos analíticos, observou-se que os animais Cx32-KO apresentavam quantidade significativamente maior de TG hepáticos quando comparados aos animais WT. Os pesos absoluto e relativo do fígado dos animais Cx32-KO também foram significativamente maiores, sugerindo maior deposição de TG no órgão. Adicionalmente, foi realizada a quantificação de ácidos graxos totais no tecido hepático, assim como análise de sua composição. Apesar de não haver diferença significativa na concentração total de lipídios entre os genótipos, houve alteração no perfil dos ácidos graxos. Foi observado que os animais Cx32-KO apresentaram menor quantidade de ácido esteárico (C18:0), linoleico (LNA- C18:2 n6 cis), diomo- γ -linoleico (DGLA- C20:3 n6), nervônico (C24:1 n9) e eicosenóico (C20:1 n9). Dentre eles, destaca-se o ácido linoleico, o qual é um ácido graxo que auxilia na redução da gordura corporal em diferentes modelos animais e em seres humanos (PARK, et al., 1997; AZAIN et al., 2000; KRITCHEVSKY et al., 2000; TERPSTRA, 2004). A participação destes ácidos graxos ainda é obscura na patogênese da DHGNA, porém, os resultados analíticos indicam a função protetora da Cx32 na esteatose hepática devido à maior deposição de TG no tecido hepático nos animais deficientes em Cx32.

Para avaliar o dano hepático, foram dosadas as transaminases ALT e AST. Estas enzimas são liberadas pelos hepatócitos em caso de injúria, extravasando da célula para o soro devido danos na membrana, tal como ocorre na necrose hepatocelular (OZER et al., 2008; MARRER; DIETERLE, 2010). Os camundongos Cx32-KO submetidos ao modelo da dieta hiperlipídica deficiente em colina apresentaram aumento significativo de ambas as enzimas em relação aos animais WT. Os dados disponíveis na literatura em relação às enzimas AST e ALT em modelos de doenças hepáticas desenvolvidos em animais deficientes em Cx32 são contraditórios. Cogliati (2010) relatou o aumento dessas enzimas em animais Cx32-KO submetidos aos modelos de hepatite crônica induzida por tetracloreto de carbono, por outro

lado Maes et al. (no prelo)² e Patel et al. (2012) em camundongos Cx32-KO com hepatite aguda causada por paracetamol e tioacetamida, respectivamente, relataram que os animais apresentaram níveis dessas enzimas próximos da normalidade, indicando que a Cx32 seja um mediador essencial para o desenvolvimento de lesões induzidas quimicamente. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a Cx32 agiu como um fator protetor ao dano hepático ocasionado pelo modelo da DHGNA. É possível que estes efeitos tenham relação com o padrão da lesão hepática, uma vez que os resultados são contraditórios quando se comparam entre doenças hepáticas agudas e crônicas.

Após injúria, o fígado normalmente inicia uma resposta regenerativa no sentido de reparar o tecido danificado (MEHENDALE, 2005). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é geralmente utilizado como um indicador da atividade regenerativa em tecido hepático após lesão (BAJT et al., 2008). A Cx32 possui grande importância na manutenção da homeostase hepatocelular, participando de processos importantes como a proliferação celular. Existem resultados controversos na literatura quanto a participação dessa conexina na proliferação celular dos hepatócitos. Em processos neoplásicos, estudos demonstraram que animais deficientes em Cx32 apresentam maior incidência de tumores hepáticos (EVERT et al., 2002; MA et al., 2002). Zhao et al.(2015) relataram que a redução da Cx32 no CHC humano estava diretamente correlacionada com o aumento da invasão vascular, aumento do tamanho do tumor e menor sobrevida. Em processos hepáticos não neoplásicos, alguns estudos relataram a diminuição da proliferação celular na ausência da comunicação intercelular mediada pela Cx32 (DAGLI et al., 2004; COGLIATI, 2010; MAES et al., 2014). Por outro lado, Maes et al. (no prelo)³ relataram maior proliferação dos hepatócitos após lesão hepática aguda causada por paracetamol em animais deficientes em Cx32. Os resultados deste estudo diferem dos descritos anteriormente, uma vez que não foi observada diferença significativa na proliferação celular entre os dois genótipos, indicando que a ausência da Cx32 não alterou o padrão de proliferação hepatocelular na DHGNA.

Para avaliar a resposta inflamatória após a indução do modelo dietético da DHGNA, foram dosadas citocinas inflamatórias no plasma, tecido hepático e tecido adiposo dos animais WT e Cx32-KO. Uma das características marcantes da EHNA inclui a iniciação e propagação

^{2,3}MAES, M.; MCGILL, M. R.; DA SILVA, T. C.; LEBOSKY, M.; MARIA MONTEIRO DE ARAÚJO, C.; TIBURCIO, T.; VELOSO ALVES PEREIRA, I.; WILLEBRORDS, J.; CRESPO YANGUAS, S.; FARHOOD, A.; ZAIDAN DAGLI, M. L.; JAESCHKE, H.; COGLIATI, B.; VINKEN, M. Connexin32: a mediator of acetaminophen-induced liver injury? **Toxicol Mech Methods**, p. 1-9 (Aceito para publicação em 2016).

da inflamação hepática (FARRELL; LARTER, 2006). De maneira geral, o processo inflamatório é modulado por citocinas pró (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF β -1) (BERLANGA et al., 2014; DUWAERTS; MAHER, 2014). O desequilíbrio causado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição de citocinas anti-inflamatórias é encontrado no contexto da EHNA, tanto no tecido hepático (MIURA et al., 2010), quanto no tecido adiposo (WINER et al., 2009). No estudo realizado por Sagawa et al. (2015), os níveis de expressão gênica das citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α foi avaliada no fígado de ratos Cx32-Tg submetidos ao modelo da DHGNA. Os autores relataram que os animais deficientes em Cx32 apresentaram aumento na expressão gênica de IL-6 em relação aos animais WT, sugerindo maior resposta inflamatória. No entanto, os autores não avaliaram os níveis proteicos destas citocinas, o que poderia alterar a interpretação dos resultados obtidos.

O papel da IL-6 na patogênese da DHGNA ainda é pouco conhecido. Sabe-se que a expressão hepática dessa citocina aumenta de acordo com a gravidade da doença (JARRAR et al., 2008; WIECKOWSKA et al., 2008; YOUNOSSI et al., 2008). No presente estudo não houve diferença na concentração hepática de IL-6 entre os dois genótipos. A IL-1 β está relacionada ao acúmulo de lipídios nos hepatócitos (MIURA et al., 2010). Um estudo relatou que a deficiência de IL-1 β reduziu acentuadamente a progressão da esteatose para a esteato-hepatite e fibrose em camundongos com DHGNA induzida por dieta, confirmando a importância dessa citocina pró-inflamatória na doença (KAMARI et al., 2011). Assim como no estudo de Sagawa et al. (2015), no presente estudo os níveis proteicos de IL-1 β não apresentaram diferenças entre os dois genótipos. O papel do IFN- γ no desenvolvimento da EHNA não é bem determinado (LUO et al., 2013). Yu et al. (2010) relataram o aumento de IFN- γ hepático em camundongos com EHNA causada por dieta deficiente em colina e metionina. Li et al. (2005) demonstraram aumento de IFN- γ no soro de animais com esteatose hepática causada por dieta hiperlipídica. No presente estudo, os níveis plasmáticos de IFN- γ apresentaram-se significativamente aumentados nos animais deficientes em Cx32, indicando que a ausência dessa proteína favorece a inflamação durante a esteatose.

A importância do TNF- α vem sendo realçada pela observação de terapias anti-TNF- α que demonstraram a atenuação da DHGNA em modelos animais (LI et al., 2003). O TNF- α pode induzir a apoptose celular, aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial, inibir a cadeia respiratória e inibir também a ativação da via de sinalização da insulina levando a resistência insulínica (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; HARMON; TINIAKOS; ARGO, 2011). Camundongos deficientes em receptores de TNF- α apresentaram resistência à

esteatose e a danos hepáticos causados tanto por dieta rica em carboidratos, como por dieta deficiente em colina e metionina (FELDSTEIN et al., 2004; TOMITA et al., 2006). O nível proteico hepático de TNF- α apresentou-se significativamente aumentado nos animais Cx32-KO, diferentado observado no estudo de Sagawa et al. (2015), no qual não houve diferença entre os grupos. O MCP-1 é um mediador da esteatose hepática e tem papel chave no recrutamento de células inflamatórias (MARRA et al., 1998). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas apresentaram intensa esteatose, aumento de citocinas pró-inflamatórias e fibrose. Dentre as citocinas, os níveis de mRNA de MCP-1 apresentaram-se aumentados (GARCÍA-RUIZ et al., 2014). Ganz et al. (2015) demonstraram um aumento gradual e progressivo nos níveis da expressão gênica de MCP-1 no fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, porém não relatou diferença no nível proteico. No presente estudo, também não foi observada diferença significativa do nível proteico de MCP-1 no tecido hepático.

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, um estudo demonstrou que sua inibição aumenta os níveis de TG e colesterol hepáticos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DEN BOER et al., 2006). Rabelo et al. (2010) relataram a diminuição dos níveis séricos de IL-10 em pacientes obesos com EHNA. Outro estudo demonstrou que os níveis séricos de IL-10 diminuíram progressivamente de acordo com a piora da DHGNA em pacientes humanos (ZAHARAN et al., 2013). No presente estudo, foi observada a diminuição significativa desta citocina no tecido hepático dos camundongos Cx32-KO em relação aos animais WT. Os resultados obtidos da mensuração das citocinas TNF- α e IL-10 estão relacionados, uma vez que o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias é muito importante para o funcionamento do sistema imunológico. A superprodução do TNF- α relaciona-se com a diminuição na produção de IL-10 (STRACZKOWSKI et al., 2005). Zahran et al. (2013) relataram o aumento da TNF- α , concomitante com a diminuição da IL-10, de acordo com a progressão da DHGNA em humanos. Esses achados indicam que a Cx32 atua como protetor na inflamação hepática, uma vez que os animais Cx32-KO apresentam menores níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e maiores níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α . Além da maior liberação de IFN- γ no plasma dos animais Cx32-KO. Esses achados, em conjunto, indicam a participação da Cx32 na progressão da inflamação hepática na DHGNA pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e diminuição da citocina anti-inflamatória (IL-10) nos animais Cx32-KO.

Para avaliar o estresse oxidativo hepático, foram dosadas as enzimas antioxidantes SOD, GPX, GR e catalase. O papel dessas enzimas defensoras do sistema biológico é

neutralizar os radicais livres, ou seja, sua diminuição é um importante fator na promoção do estresse oxidativo em pacientes com EHNA (VIDELA et al., 2004). Estudos vêm demonstrando a diminuição de SOD e CAT plasmático em pacientes com EHNA (VIDELA et al., 2004; YESILOVA et al., 2005), assim como diminuição de SOD, GPX e GR em homogenato de tecido hepático de animais submetidos ao modelo da DHGNA por dieta deficiente em colina e metionina (AMINI et al., 2009). Sagawa et al. (2015) relataram maior estresse oxidativo em ratos Cx32-Tg com EHNA e lesões pré-neoplásicas pela mensuração da formação de EROs, no entanto, não avaliaram as enzimas antioxidantes individualmente. Os resultados obtidos no presente estudo não demonstraram diferença significativa em nenhuma das enzimas analisadas. Correlacionando com outras doenças hepáticas, Maes et al. (no prelo)⁴ relataram que a Cx32 não exerceu influência sobre o estresse oxidativo hepático em camundongos tratados com altas doses de paracetamol para indução de lesão hepática aguda. Esses achados sugerem que a comunicação intercelular mediada pela Cx32 não apresenta participação significativa no estabelecimento do estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica resulta na formação de malondialdeído (MDA) (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012), que pode afetar a oxidação mitocondrial, a permeabilidade da membrana celular e a excitabilidade celular (BAGIS et al., 2005). Cui et al. (2013) relataram aumento de MDA em camundongos com DHGNA induzida por dieta hiperlipídica quando comparados com camundongos saudáveis. Loguercio et al. (2001) demonstrou que os níveis de MDA em humanos são mais altos na EHNA quando comparado com a esteatose simples, indicando sua relação com o grau e progressão da doença. Os níveis de MDA hepático nos camundongos Cx32-KO foram significativamente maiores em relação aos animais WT, indicando maior peroxidação lipídica e, conseqüentemente, um quadro mais grave da doença.

O tecido adiposo produz e secreta diversos hormônios e substâncias bioativas, atuando como o maior órgão endócrino do organismo (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010). Neste estudo, foram dosadas as concentrações das adipocinas leptina e adiponectina no tecido adiposo e plasma dos animais submetidos ao modelo de DHGNA, assim como as citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo. A adiponectina é um hormônio produzido

⁴ MAES, M.; MCGILL, M. R.; DA SILVA, T. C.; LEBOFISKY, M.; MARIA MONTEIRO DE ARAÚJO, C.; TIBURCIO, T.; VELOSO ALVES PEREIRA, I.; WILLEBRORDS, J.; CRESPO YANGUAS, S.; FARHOOD, A.; ZAIDAN DAGLI, M. L.; JAESCHKE, H.; COGLIATI, B.; VINKEN, M. Connexin32: a mediator of acetaminophen-induced liver injury? **Toxicol Mech Methods**, p. 1-9 (Aceito para publicação em 2016).

exclusivamente pelo tecido adiposo (SPIEGELMAN; FLIER, 2001), cuja liberação é inversamente proporcional à quantidade de massa gorda. É um hormônio anti-esteatótico, pois aumenta a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose e desempenha um papel importante na regulação do metabolismo lipídico. Este hormônio aumenta a utilização de glicose e a oxidação de ácidos graxos hepático através de seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2. Diversos estudos *in vivo* demonstram que os níveis plasmáticos de adiponectina apresentam-se diminuídos na DHGNA (LEMOINE et al., 2009; NANNIPIERI et al., 2009; MATSUZAWA, 2010). Nannipieri et al. (2009), relataram a diminuição dos receptores de adiponectina no tecido adiposo de pacientes com EHNA. Os animais Cx32-KO apresentaram diminuição de adiponectina no tecido adiposo, sem, entretanto, alterar os níveis plasmáticos dessa adipocina.

Por sua vez, a leptina é um hormônio peptídico produzido nos adipócitos, que age no sistema nervoso central, diminuindo o apetite e aumentando o gasto energético. Além disso, possui duplo papel na DHGNA em modelos experimentais, exercendo uma eventual ação anti-esteatótica, porém pró-inflamatória e pró-fibrogênica (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2015). Os níveis de leptina no tecido adiposo e no plasma dependem da quantidade de tecido adiposo e do estado de equilíbrio energético. Alguns estudos demonstram que os níveis de leptina estão aumentados em pacientes com EHNA, sendo relacionados ao grau de esteatose hepática (UYGUN et al., 2000; CHITTURI et al., 2002a; SINGH et al., 2013). Em contraste, há estudos que não demonstraram diferença dos níveis de leptina entre pacientes saudáveis e com EHNA (ANGULO et al., 2004; MUSSO et al., 2005; MEDICI et al., 2010). No presente estudo, os níveis plasmáticos de leptina não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos, no entanto, seus níveis foram menores no tecido adiposo dos camundongos Cx32-KO. Não há estudos que correlacionem a expressão dessas adipocinas no tecido adiposo com as conexinas, mas os resultados obtidos indicam que existe uma correlação entre a expressão de Cx32 com as adipocinas adiponectina e leptina no tecido adiposo. Dentre as citocinas inflamatórias avaliadas no tecido adiposo, a IL-6, IFN- γ e IL-10 apresentaram valores significativamente menores nos animais Cx32-KO. Há relatos de junções comunicantes interligando adipócitos da gordura marrom (REVEL; SHERIDAN, 1968; LINCK et al., 1974), mas sobre a gordura branca pouco se sabe. Burke et al. (2014) relataram a expressão de Cx43 em ambas as gorduras de camundongos, porém sobre a Cx32 não há relatos nesse tecido. Da mesma forma, não foram encontrados relatos da mensuração dessas citocinas em tecido adiposo de animais submetidos a modelos de DHGNA, porém os resultados indicam que a ausência da Cx32 está alterando a expressão das citocinas no tecido

adiposo. No entanto, mais estudos serão necessários para compreender a participação da Cx32 nos processos fisiológicos e patológicos do tecido adiposo.

Análise da expressão gênica hepática foi realizada utilizando uma placa de PCR contendo 84 genes relacionados aos mecanismos fisiopatológicos da DHGNA em camundongos. Do total, quatro genes apresentaram diferença significativa nos animais Cx32-KO em relação aos animais WT, sendo dois superexpressos: proteína de ligação de ácidos graxos (*Fabp3*) e proteína de ligação do elemento de regulação do esterol (*SREBP1*); e dois menos expressos: proteína ligante de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Igf1*) e piruvato desidrogenase quinase 4 (*Pdk4*).

Em relação aos genes superexpressos, as FABPs estão envolvidas no transporte de AG para controlar sua concentração, metabolismo, transdução de sinal e transcrição gênica (MAKOWSKI; HOTAMISLIGIL, 2005). As FABPs podem facilitar o transporte intracelular de FAS e outras moléculas lipofílicas ao longo do citosol para os seus receptores nucleares, incluindo PPAR, RAR, LXR α e NF- κ B, controlando, assim, a disponibilidade de ligantes para regular a transcrição de genes importantes envolvidos no metabolismo e em processos inflamatórios (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009). Estudos demonstraram o aumento de FABP3 em humanos com DHGNA (BAŞAR et al., 2013) e ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica (MATSUDA et al., 2009; WANG et al., 2011).

O SREBP1c é responsável pela ativação de genes que estão relacionados à lipogênese e sua expressão depende da ação da insulina (HORTON et al., 1998). Ahmed e Byrne (2007) indicaram em seus experimentos que o SREBP-1c executa importante função no metabolismo de triglicérides e glicose hepáticos e sua atividade pode ter importante participação no acúmulo de lipídios hepáticos. SREBPs também são importantes fatores de transcrição que regulam a homeostase do colesterol no hepatócito. Shimomura et al. (1999) relataram que a superexpressão de SREBP1c no fígado de camundongos transgênicos promoveu aumento da lipogênese *de novo* e o desenvolvimento de esteatose hepática. Tu et al. (2012) relataram níveis maiores de SREBP1c em camundongos com DHGNA alimentados com dieta hiperlipídica. Lima-Cabello et al. (2011) demonstrou o aumento gradativo da SREBP1c na esteatose simples e na EHNA.

Em relação aos genes menos expressos, as IGFBP1 possuem alta afinidade de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). A principal função dessa proteína é regular a disponibilidade de IGF-1 circulante, que está envolvido no crescimento, diferenciação e apoptose celular (GIBSON et al., 1996). Os IGFs fazem parte da família dos hormônios de crescimento e dos hormônios da insulina, sendo o fígado a maior fonte desse

peptídeo circulante. Ele é liberado assim que sintetizado, e por isso não fica armazenado. As IGFBP1 são importantes também, por manter uma reserva desse peptídeo. Nishizawa et al. (2012) demonstraram que as IGF-1 possuem efeito protetor no desenvolvimento de EHNA. Níveis baixos de IGFBP1 têm sido associados à resistência insulínica, síndrome metabólica e obesidade (UNDERWOOD et al., 1994; GIBSON et al., 1996; HARRELA et al., 2000). Stahl et al. (2005) avaliaram a expressão desse gene em animais Cx32-KO e WT que receberam fenobarbital para indução de tumor hepático e observaram uma maior expressão hepática de IGFBP1 nos animais Cx32-KO. Esses achados indicam que a Cx32 participa da expressão desse gene, porém de forma diferente em processos neoplásicos e não neoplásicos.

O complexo da piruvato desidrogenase (CPD) é o maior determinante da oxidação da glicose, a regulação da atividade desse complexo possui importante papel na adequação da atividade metabólica dos órgãos, escolhendo quais substratos o órgão utilizará para manter a homeostase energética. Normalmente, a glicose é o substrato preferencial para oxidação. O CPD possui enzimas associadas reguladoras, uma delas é a piruvato desidrogenase quinase (PDK). Essa enzima possui quatro isoformas, que apresentam propriedades bioquímicas diferentes. O PDK4 é altamente responsivo em tecido muscular cardíaco e esquelético, e no tecido hepático. Nos hepatócitos, a PDK4 está envolvida na oxidação mitocondrial de AG pelos hepatócitos. (HOUTEN et al., 2009; RAKHSHANDEHROO et al., 2009). Wei et al. (2011) demonstrou que os níveis de gene PDK4 estavam diminuídos em camundongos que desenvolveram CHC espontaneamente, assim como em humanos com CHC. *In vitro*, esse grupo demonstrou que a superexpressão de PDK4 suprimia o crescimento de células tumorais.

A partir desses resultados não é possível afirmar que a Cx32 atue de forma direta na expressão desses genes. A ausência dessa proteína causou alterações em mecanismos relacionados ao desenvolvimento e progressão da DHGNA, como apresentado nos resultados anteriores, e essas alterações provavelmente causaram essas mudanças na expressão gênica.

Com os resultados obtidos nesse estudo, de maneira geral, é possível sugerir que a conexina 32 possui participação importante na fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica. Sendo assim, a comunicação intercelular mediada pela conexina 32 pode ser considerada um potencial alvo terapêutico, uma vez que sua ausência promoveu a intensificação dos efeitos deletérios pela modulação de diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da DHGNA.

7 CONCLUSÃO

A Cx32 apresenta importante participação na fisiopatogênese da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina em camundongos geneticamente modificados, uma vez que a ausência dessa proteína causou alterações no quadro da doença. Ainda:

- A ausência da Cx32 não altera o ganho de peso ou acúmulo de tecido adiposo nos animais, mas causa maior peso absoluto e relativo do fígado.
- A deficiência de Cx32 não interfere no grau histológico da DHGNA (NAS), porém promover maior deposição de triglicérides e mudança no perfil de ácidos graxos hepáticos.
- A redução da Cx32 não influencia na resistência insulínica, porém aumenta o dano hepatocelular e os níveis plasmáticos de colesterol.
- A deficiência de Cx32 não altera a proliferação de hepatócitos no modelo da DHGNA.
- A ausência da Cx32 não altera os níveis plasmáticos de leptina e adiponectina, porém altera os níveis dessas adipocinas no tecido adiposo, assim como de algumas citocinas.
- A deficiência de Cx32 aumenta a resposta inflamatória no tecido hepático pelo aumento de TNF- α e a supressão de IL-10.
- A redução de Cx32 não interfere no estresse oxidativo hepático em camundongos, no entanto intensifica a peroxidação lipídica.

-
- A Cx32 altera a expressão dos genes chaves na DHGNA, como o SREBP1, FABP3, IGFBP1 e PDK4.

REFERÊNCIAS

ABDELMALEK, M. F.; DIEHL, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. **Med Clin North Am**, v. 91, n. 6, p. 1125-1149, ix, 2007.

ACHIWA, K.; ISHIGAMI, M.; ISHIZU, Y.; KUZUYA, T.; HONDA, T.; HAYASHI, K.; HIROOKA, Y.; KATANO, Y.; GOTO, H. DSS colitis promotes tumorigenesis and fibrogenesis in a choline-deficient high-fat diet-induced NASH mouse model. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 470, n. 1, p. 15-21, 2016.

ACKERMAN, Z.; ORON-HERMAN, M.; GROZOVSKI, M.; ROSENTHAL, T.; PAPPO, O.; LINK, G.; SELA, B. A. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1012-1018, 2005.

AHMED, M. H.; BYRNE, C. D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Drug Discov Today**, v. 12, n. 17-18, p. 740-747, 2007.

AHMED, M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. **World J Hepatol**, v. 7, n. 11, p. 1450-1459, 2015.

AI, Z. L.; ZHU, C. H.; MIN, M.; WANG, J.; LAN, C. H.; FAN, L. L.; SUN, W. J.; CHEN, D. F. The role of hepatic liver X receptor α - and sterol regulatory element binding protein-1c-mediated lipid disorder in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in rats. **J Int Med Res**, v. 39, n. 4, p. 1219-1229, 2011.

AMINI, R.; NOSRATI, N.; YAZDANPARAST, R.; MOLAEI, M. Teucrium polium in prevention of steatohepatitis in rats. **Liver Int**, v. 29, n. 8, p. 1216-1221, 2009.

ANDERSON, N.; BORLAK, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 3, p. 311-357, 2008.

ANGULO, P.; ALBA, L. M.; PETROVIC, L. M.; ADAMS, L. A.; LINDOR, K. D.; JENSEN, M. D. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 41, n. 6, p. 943-949, 2004.

ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 1, p. 1-16, 2006.

ARAB, J. P.; CANDIA, R.; ZAPATA, R.; MUÑOZ, C.; ARANCIBIA, J. P.; PONIACHIK, J.; SOZA, A.; FUSTER, F.; BRAHM, J.; SANHUEZA, E.; CONTRERAS, J.; CUELLAR, M. C.; ARRESE, M.; RIQUELME, A. Management of nonalcoholic fatty liver disease: an evidence-based clinical practice review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 34, p. 12182-12201, 2014.

ARAYA, J.; RODRIGO, R.; VIDELA, L. A.; THIELEMANN, L.; ORELLANA, M.; PETTINELLI, P.; PONIACHIK, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 6, p. 635-643, 2004.

ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; MAEDA, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNshaw-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 191-198, 2005.

ASAMOTO, M.; HOKAIWADO, N.; MURASAKI, T.; SHIRAI, T. Connexin 32 dominant-negative mutant transgenic rats are resistant to hepatic damage by chemicals. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 205-210, 2004.

AVANZO, J. L.; MESNIL, M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MACKOWIAK, I. I.; MORI, C. M.; DA SILVA, T. C.; OLORIS, S. C.; GÁRATE, A. P.; MASSIRONI, S. M.; YAMASAKI, H.; DAGLI, M. L. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1973-1982, 2004.

AZAIN, M. J.; HAUSMAN, D. B.; SISK, M. B.; FLATT, W. P.; JEWELL, D. E. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **J Nutr**, v. 130, n. 6, p. 1548-1554, 2000.

BAGIS, S.; TAMER, L.; SAHIN, G.; BILGIN, R.; GULER, H.; ERCAN, B.; ERDOGAN, C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **Rheumatol Int**, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.

BAJT, M. L.; YAN, H. M.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Plasminogen activator inhibitor-1 limits liver injury and facilitates regeneration after acetaminophen overdose. **Toxicol Sci**, v. 104, n. 2, p. 419-427, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutri**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

BAŞAR, O.; AKBAL, E.; KÖKLÜ, S.; TUNA, Y.; KOÇAK, E.; BAŞAR, N.; TOK, D.; ERBIŞ, H.; SENES, M. Increased H-FABP concentrations in nonalcoholic fatty liver disease.

Possible marker for subclinical myocardial damage and subclinical atherosclerosis. **Herz**, v. 38, n. 4, p. 417-422, 2013.

BAVAMIAN, S.; KLEE, P.; BRITAN, A.; POPULAIRE, C.; CAILLE, D.; CANCELA, J.; CHAROLLAIS, A.; MEDA, P. Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. **Diabetes Obes Metab**, v. 9 Suppl 2, n., p. 118-132, 2007.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.

BEGRICHE, K.; MASSART, J.; ROBIN, M. A.; BONNET, F.; FROMENTY, B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1497-1507, 2013.

BERLANGA, A.; GUIU-JURADO, E.; PORRAS, J. A.; AUGUET, T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 7, n., p. 221-239, 2014.

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D. C.; ROUDOT-THORAVALL, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **J Hepatol**, v. 58, n. 3, p. 593-608, 2013.

BODEN, G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n. 5, p. 545-549, 2002.

BOENTE, L.; COTRIM, H.; MATTEONI, L.; LEAL, R.; CAMPOS, F.; SOARES, D. **Importância da ultrassonografia no diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica.**: secondary title. Brasil: Gastroenterologia Endoscopia Digestiva (GED), 2007.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; RATZIU, V.; GIRAL, P.; CHARLOTTE, F.; BEUCLER, I.; POYNARD, T.; GROUP, L. S. Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 23, n. 1, p. 91-98, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.

BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol**, v. 22, n. 4, p. 330-338, 2005.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **Eur J Biochem**, v. 238, n. 1, p. 1-27, 1996.

BUGIANESI, E.; GASTALDELLI, A.; VANNI, E.; GAMBINO, R.; CASSADER, M.; BALDI, S.; PONTI, V.; PAGANO, G.; FERRANNINI, E.; RIZZETTO, M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 634-642, 2005.

BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 987-1000, 2005.

BUKAUSKAS, F. F.; ELFGANG, C.; WILLECKE, K.; WEINGART, R. Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. **Pflugers Arch**, v. 429, n. 6, p. 870-872, 1995.

BURANT, C. F.; SREENAN, S.; HIRANO, K.; TAI, T. A.; LOHMILLER, J.; LUKENS, J.; DAVIDSON, N. O.; ROSS, S.; GRAVES, R. A. Troglitazone action is independent of adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2900-2908, 1997.

BURKE, S.; NAGAJYOTHI, F.; THI, M. M.; HANANI, M.; SCHERER, P. E.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C. Adipocytes in both brown and white adipose tissue of adult mice are functionally connected via gap junctions: implications for Chagas disease. **Microbes Infect**, v. 16, n. 11, p. 893-901, 2014.

BYRNE, C. D.; OLUFADI, R.; BRUCE, K. D.; CAGAMPANG, F. R.; AHMED, M. H. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 7, p. 539-564, 2009.

CAVIGLIA, J. M.; GAYET, C.; OTA, T.; HERNANDEZ-ONO, A.; CONLON, D. M.; JIANG, H.; FISHER, E. A.; GINSBERG, H. N. Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. **J Lipid Res**, v. 52, n. 9, p. 1636-1651, 2011.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; DIEHL, A. M.; BRUNT, E. M.; CUSI, K.; CHARLTON, M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

CHAO, L.; MARCUS-SAMUELS, B.; MASON, M. M.; MOITRA, J.; VINSON, C.; ARIOGLU, E.; GAVRILOVA, O.; REITMAN, M. L. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. **J Clin Invest**, v. 106, n. 10, p. 1221-1228, 2000.

CHAVES, G.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, J.; CORTES, C.; RAMALHO, R. Ultrassonografia e ressonância magnética: estudo comparativo no diagnóstico da esteatose em obesos grau III. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.55, n.1, p.45-49, 2009.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflamm Res**, v. 49, n. 10, p. 497-505, 2000.

CHIPMAN, J. K.; MALLY, A.; EDWARDS, G. O. Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. **Toxicol Sci**, v. 71, n. 2, p. 146-153, 2003.

CHITTURI, S.; ABEYGUNASEKERA, S.; FARRELL, G. C.; HOLMES-WALKER, J.; HUI, J. M.; FUNG, C.; KARIM, R.; LIN, R.; SAMARASINGHE, D.; LIDDLE, C.; WELTMAN, M.; GEORGE, J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 373-379, 2002a.

CHITTURI, S.; FARRELL, G.; FROST, L.; KRIKETOS, A.; LIN, R.; FUNG, C.; LIDDLE, C.; SAMARASINGHE, D.; GEORGE, J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 403-409, 2002b.

COGLIATI, B. **Participação das conexinas 43 e 32 no desenvolvimento da fibrose hepática: estudo em camundongos geneticamente modificados**. 139 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

COGLIATI, B.; DA SILVA, T. C.; ALOIA, T. P.; CHAIBLE, L. M.; REAL-LIMA, M. A.; SANCHES, D. S.; MATSUZAKI, P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DAGLI, M. L. Morphological and molecular pathology of CCL4-induced hepatic fibrosis in connexin43-deficient mice. **Microsc Res Tech**, v. 74, n. 5, p. 421-429, 2011.

COREY, K. E.; KAPLAN, L. M. Obesity and liver disease: the epidemic of the twenty-first century. **Clin Liver Dis**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2014.

CORREA, P. R.; GUERRA, M. T.; LEITE, M. F.; SPRAY, D. C.; NATHANSON, M. H. Endotoxin unmasks the role of gap junctions in the liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 322, n. 3, p. 718-726, 2004.

CORTEZ-PINTO, H.; DE MOURA, M. C.; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. **J Hepatol**, v. 44, n. 1, p. 197-208, 2006.

COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; OLIVEIRA, C. P.; LEITE, N.; MARTINELLI, A.; GALIZZI, J.; SILVA, R. E. C.; MATTOS, A.; PEREIRA, L.; AMORIM, W.; IVANTES, C.;

SOUZA, F.; COSTA, M.; MAIA, L.; PESSOA, M.; OLIVEIRA, F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 1, p. 33-37, 2011.

CUI, Y.; WANG, Q.; LI, X.; ZHANG, X. Experimental nonalcoholic fatty liver disease in mice leads to cytochrome p450 2a5 upregulation through nuclear factor erythroid 2-like 2 translocation. **Redox Biol**, v. 1, p. 433-440, 2013.

DAGLI, M. L.; YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; OMORI, Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 483-492, 2004.

DAM-LARSEN, S.; FRANZMANN, M.; ANDERSEN, I. B.; CHRISTOFFERSEN, P.; JENSEN, L. B.; SØRENSEN, T. I.; BECKER, U.; BENDTSEN, F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. **Gut**, v. 53, n. 5, p. 750-755, 2004.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DE GOTTARDI, A.; VINCIGUERRA, M.; SGROI, A.; MOUKIL, M.; RAVIER-DALL'ANTONIA, F.; PAZIENZA, V.; PUGNALE, P.; FOTI, M.; HADENGUE, A. Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. **Lab Invest**, v. 87, n. 8, p. 792-806, 2007.

DEN BOER, M. A.; VOSHOL, P. J.; SCHRÖDER-VAN DER ELST, J. P.; KORSHENINNIKOVA, E.; OUWENS, D. M.; KUIPERS, F.; HAVEKES, L. M.; ROMIJN, J. A. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4553-4558, 2006.

DIESEN, D. L.; KUO, P. C. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. **J Surg Res**, v. 162, n. 1, p. 95-109, 2010.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **QJM**, v. 103, n. 2, p. 71-83, 2010.

DUVNJAK, M.; LEROTIĆ, I.; BARSIC, N.; TOMASIĆ, V.; VIROVIĆ JUKIĆ, L.; VELAGIĆ, V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 34, p. 4539-4550, 2007.

DUWAERTS, C. C.; MAHER, J. J. Mechanisms of Liver Injury in Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Curr Hepatol Rep**, v. 13, n. 2, p. 119-129, 2014.

EATON, J. W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 9, p. 833-840, 2002.

EUGENÍN, E. A.; GONZÁLEZ, H. E.; SÁNCHEZ, H. A.; BRAÑES, M. C.; SÁEZ, J. C. Inflammatory conditions induce gap junctional communication between rat Kupffer cells both in vivo and in vitro. **Cell Immunol**, v. 247, n. 2, p. 103-110, 2007.

EVERT, M.; OTT, T.; TEMME, A.; WILLECKE, K.; DOMBROWSKI, F. Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 697-703, 2002.'

EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Anal Biochem**, v. 232, n. 2, p. 243-248, 1995.

FABBRINI, E.; MAGKOS, F.; MOHAMMED, B. S.; PIETKA, T.; ABUMRAD, N. A.; PATTERSON, B. W.; OKUNADE, A.; KLEIN, S. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 36, p. 15430-15435, 2009.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.

FALCK-YTTER, Y.; YOUNOSSI, Z. M.; MARCHESINI, G.; MCCULLOUGH, A. J. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 17-26, 2001.

FARRELL, G. **Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005

FARRELL, G. C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. **Hepatology**, v. 43, p. S99-S112, 2006. Supplement, 1.

FELDSTEIN, A. E.; WERNEBURG, N. W.; CANBAY, A.; GUICCIARDI, M. E.; BRONK, S. F.; RYDZEWSKI, R.; BURGART, L. J.; GORES, G. J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 185-194, 2004.

FELDSTEIN, A. E. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 4, p. 391-401, 2010.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, R.; HOWARD, G.; MYKKÄNEN, L.; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation**, v. 102, n. 1, p. 42-47, 2000.

FISCHER, R.; REINEHR, R.; LU, T. P.; SCHÖNICKE, A.; WARSKULAT, U.; DIENES, H. P.; HÄUSSINGER, D. Intercellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 128, n. 2, p. 433-448, 2005.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, n., p. 114-121, 1984.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GALIZZI, J.; COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; OLIVEIRA, C. P. M. S. **Doença hepática gordurosa não alcoólica: esteato-hepatite e suas correlações**. São Paulo: Yendis, 2011.

GANZ, M.; BUKONG, T. N.; CSAK, T.; SAHA, B.; PARK, J. K.; AMBADE, A.; KODYS, K.; SZABO, G. Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. **J Transl Med**, v. 13, n., p. 193, 2015.

GAO, D.; WEI, C.; CHEN, L.; HUANG, J.; YANG, S.; DIEHL, A. M. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 5, p. G1070-1077, 2004.

GARCÍA-RUIZ, I.; SOLÍS-MUÑOZ, P.; FERNÁNDEZ-MOREIRA, D.; GRAU, M.; COLINA, F.; MUÑOZ-YAGÜE, T.; SOLÍS-HERRUZO, J. A. High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 11, p. 1287-1296, 2014.

GIBSON, J. M.; WESTWOOD, M.; YOUNG, R. J.; WHITE, A. Reduced insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) levels correlate with increased cardiovascular risk in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 2, p. 860-863, 1996.

GOLDBERG, G. S.; MORENO, A. P.; LAMPE, P. D. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 36725-36730, 2002.

GONZÁLEZ, H. E.; EUGENÍN, E. A.; GARCÉS, G.; SOLÍS, N.; PIZARRO, M.; ACCATINO, L.; SÁEZ, J. C. Regulation of hepatic connexins in cholestasis: possible involvement of Kupffer cells and inflammatory mediators. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, n. 6, p. G991-G1001, 2002.

GOODENOUGH, D. A. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. **J Cell Biol**, v. 61, n. 2, p. 557-563, 1974.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. **Annu Rev Biochem**, v. 65, n., p. 475-502, 1996.

GUERRA, J. L. **Hepatocarcinogênese em camundongos portadores de deleção em um dos alelos da conexina 43 (Cx43+/-): estudos histomorfométricos**, 2003. 86 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

HAEFLIGER, J. A.; NICOD, P.; MEDA, P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. **Cardiovasc Res**, v. 62, n. 2, p. 345-356, 2004.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARDY, T.; ANSTEE, Q. M.; DAY, C. P. Nonalcoholic fatty liver disease: new treatments. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, n. 3, p. 175-183, 2015.

HARMON, R. C.; TINIAKOS, D. G.; ARGO, C. K. Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 2, p. 189-200, 2011.

HARRELA, M.; KOISTINEN, R.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A.; SEPPÄLÄ, M. Low serum insulin-like growth factor-binding protein-1 is associated with an unfavourable cardiovascular risk profile in elderly men. **Ann Med**, v. 32, n. 6, p. 424-428, 2000.

HARRISON, S. A.; DAY, C. P. Benefits of lifestyle modification in NAFLD. **Gut**, v. 56, n. 12, p. 1760-1769, 2007.

HASHIMOTO, E.; TANIAI, M.; TOKUSHIGE, K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, p. 64-70, 2013. Supplement, 4.

HASSAN, K.; BHALLA, V.; EL REGAL, M. E.; A-KADER, H. H. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 34, p. 12082-12101, 2014.

HEEBA, G. H.; MORSY, M. A. Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 40, n. 3, p. 907-914, 2015.

HENNEMANN, H.; DAHL, E.; WHITE, J. B.; SCHWARZ, H. J.; LALLEY, P. A.; CHANG, S.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. **J Biol Chem**, v. 267, n. 24, p. 17225-17233, 1992.

HENSLEY, K.; KOTAKE, Y.; SANG, H.; PYE, Q. N.; WALLIS, G. L.; KOLKER, L. M.; TABATABAIE, T.; STEWART, C. A.; KONISHI, Y.; NAKAE, D.; FLOYD, R. A. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 983-989, 2000.

HERNÁNDEZ-GUERRA, M.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, Y.; DE GANZO, Z. A.; SALIDO, E.; GARCÍA-PAGÁN, J. C.; ABRANTE, B.; MALAGÓN, A. M.; BOSCH, J.; QUINTERO, E. Role of gap junctions modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. **Liver Int**, v. 34, n. 6, p. 859-868, 2014.

HONG, Y. L.; YEH, S. L.; CHANG, C. Y.; HU, M. L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin Biochem**, v. 33, n. 8, p. 619-625, 2000.

HOROZ, M.; BOLUKBAS, C.; BOLUKBAS, F. F.; SABUNCU, T.; ASLAN, M.; SARIFAKIOGULLARI, S.; GUNAYDIN, N.; EREL, O. Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. **BMC Gastroenterol**, v. 5, p. 35, 2005.

HORTON, J. D.; BASHMAKOV, Y.; SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 5987-5992, 1998.

HORTON, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochem Soc Trans**, v. 30, n. pt 6, p. 1091-1095, 2002.

HOUTEN, S. M.; CHEGARY, M.; TE BRINKE, H.; WIJNEN, W. J.; GLATZ, J. F.; LUIKEN, J. J.; WIJBURG, F. A.; WANDERS, R. J. Pyruvate dehydrogenase kinase 4

expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 7, p. 1283-1294, 2009.

HUSSAIN, M. M.; RAVA, P.; PAN, X.; DAI, K.; DOUGAN, S. K.; IQBAL, J.; LAZARE, F.; KHATUN, I. Microsomal triglyceride transfer protein in plasma and cellular lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 19, n. 3, p. 277-284, 2008.

IBDAH, J. A.; PAUL, H.; ZHAO, Y.; BINFORD, S.; SALLENG, K.; CLINE, M.; MATERN, D.; BENNETT, M. J.; RINALDO, P.; STRAUSS, A. W. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. **J Clin Invest**, v. 107, n. 11, p. 1403-1409, 2001.

ISMAIL-BEIGI, F. Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 366, n. 14, p. 1319-1327, 2012.

JANSEN, H.; VERHOEVEN, A. J.; SIJBRANDS, E. J. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? **J Lipid Res**, v. 43, n. 9, p. 1352-1362, 2002.

JARRAR, M. H.; BARANOVA, A.; COLLANTES, R.; RANARD, B.; STEPANOVA, M.; BENNETT, C.; FANG, Y.; ELARINY, H.; GOODMAN, Z.; CHANDHOKE, V.; YOUNOSSI, Z. M. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 27, n. 5, p. 412-421, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro, 2004

KALAANY, N. Y.; GAUTHIER, K. C.; ZAVACKI, A. M.; MAMMEN, P. P.; KITAZUME, T.; PETERSON, J. A.; HORTON, J. D.; GARRY, D. J.; BIANCO, A. C.; MANGELSDORF, D. J. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. **Cell Metab**, v. 1, n. 4, p. 231-244, 2005.

KALAANY, N. Y.; GAUTHIER, K. C.; ZAVACKI, A. M.; MAMMEN, P. P.; KITAZUME, T.; PETERSON, J. A.; HORTON, J. D.; GARRY, D. J.; BIANCO, A. C.; MANGELSDORF, D. J. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. **Cell Metab**, v. 1, n. 4, p. 231-244, 2005.

KAMARI, Y.; SHAISH, A.; VAX, E.; SHEMESH, S.; KANDEL-KFIR, M.; ARBEL, Y.; OLTEANU, S.; BARSHACK, I.; DOTAN, S.; VORONOV, E.; DINARELLO, C. A.; APTE, R. N.; HARATS, D. Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. **J Hepatol**, v. 55, n. 5, p. 1086-1094, 2011.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 11963-11980, 2013.

- KAWASAKI, T.; IGARASHI, K.; KOEDA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAGAWA, K.; HAYASHI, S.; YAMAJI, R.; INUI, H.; FUKUSATO, T.; YAMANOUCHI, T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. **J Nutr**, v. 139, n. 11, p. 2067-2071, 2009.
- KIM, S. H.; WU, S. Y.; BAEK, J. I.; CHOI, S. Y.; SU, Y.; FLYNN, C. R.; GAMSE, J. T.; ESS, K. C.; HARDIMAN, G.; LIPSCHUTZ, J. H.; ABUMRAD, N. N.; ROCKEY, D. C. A post-developmental genetic screen for zebrafish models of inherited liver disease. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125980, 2015.
- KING, T. J.; BERTRAM, J. S. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 146-160, 2005.
- KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J.; NETWORK, N. S. C. R. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.
- KOJIMA, T.; SAWADA, N.; OYAMADA, M.; CHIBA, H.; ISOMURA, H.; MORI, M. Rapid appearance of connexin 26-positive gap junctions in centrilobular hepatocytes without induction of mRNA and protein synthesis in isolated perfused liver of female rat. **J Cell Sci**, v. 107, pt 12, p. 3579-3590, 1994.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S. K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **J Am Coll Nutr**, v. 19, n. 4, p. 472S-477S, 2000.
- LAMBERT, J. E.; RAMOS-ROMAN, M. A.; BROWNING, J. D.; PARKS, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 726-735, 2014.
- LARTER, C. Z.; YEH, M. M.; WILLIAMS, J.; BELL-ANDERSON, K. S.; FARRELL, G. C. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. **J Hepatol**, v. 49, n. 3, p. 407-416, 2008.
- LECLERCQ, I. A.; FARRELL, G. C.; FIELD, J.; BELL, D. R.; GONZALEZ, F. J.; ROBERTSON, G. R. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Invest**, v. 105, n. 8, p. 1067-1075, 2000.

- LEE, K. S.; BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER, M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. **J Clin Invest**, v. 96, n. 5, p. 2461-2468, 1995.
- LEMOINE, M.; RATZIU, V.; KIM, M.; MAACHI, M.; WENDUM, D.; PAYE, F.; BASTARD, J. P.; POUPON, R.; HOUSSET, C.; CAPEAU, J.; SERFATY, L. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Int**, v. 29, n. 9, p. 1431-1438, 2009.
- LI, Z.; YANG, S.; LIN, H.; HUANG, J.; WATKINS, P. A.; MOSER, A. B.; DESIMONE, C.; SONG, X. Y.; DIEHL, A. M. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 343-350, 2003.
- LI, Z.; SOLOSKI, M. J.; DIEHL, A. M. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 880-885, 2005.
- LIMA-CABELLO, E.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; MIQUILENA-COLINA, M. E.; VARGAS-CASTRILLÓN, J.; LOZANO-RODRÍGUEZ, T.; FERNÁNDEZ-BERMEJO, M.; OLCOZ, J. L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; GARCÍA-MONZÓN, C.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 6, p. 239-250, 2011.
- LINCK, G.; STOECKEL, M. E.; PORTE, A.; PETROVIC, A. [Demonstration of gap junctions or nexus by lanthanum in the brown fat of the European hamster (*Cricetus cricetus*)]. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D**, v. 278, n. 1, p. 87-89, 1974.
- LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 666-685, 2007.
- LOEWENSTEIN, W. R.; KANNO, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, n. 5029, p. 1248-1249, 1966.
- LOGUERCIO, C.; DE GIROLAMO, V.; DE SIO, I.; TUCCILLO, C.; ASCIONE, A.; BALDI, F.; BUDILLON, G.; CIMINO, L.; DI CARLO, A.; DI MARINO, M. P.; MORISCO, F.; PICCIOTTO, F.; TERRACCIANO, L.; VECCHIONE, R.; VERDE, V.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. **J Hepatol**, v. 35, n. 5, p. 568-574, 2001.
- LOMBARDI, B.; OLER, A. Choline deficiency fatty liver. Protein synthesis and release. **Lab Invest**, v. 17, n. 3, p. 308-321, 1967.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 686-690, 2013.

LUO, X. Y.; TAKAHARA, T.; KAWAI, K.; FUJINO, M.; SUGIYAMA, T.; TSUNEYAMA, K.; TSUKADA, K.; NAKAE, S.; ZHONG, L.; LI, X. K. IFN- γ deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-fat diet. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 305, n. 12, p. G891-899, 2013.

MA, X. D.; SUI, Y. F.; WANG, W. L. Expression of gap junction genes connexin 32, connexin 43 and their proteins in hepatocellular carcinoma and normal liver tissues. **World J Gastroenterol**, v. 6, n. 1, p. 66-69, 2000.

MA, X. D.; MA, X.; SUI, Y. F.; WANG, W. L. Expression of gap junction genes connexin32 and connexin43 mRNAs and proteins, and their role in hepatocarcinogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 1, p. 64-68, 2002.

MAES, M.; DECROCK, E.; COGLIATI, B.; OLIVEIRA, A. G.; MARQUES, P. E.; DAGLI, M. L.; MENEZES, G. B.; MENNECIER, G.; LEYBAERT, L.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; VINKEN, M. Connexin and pannexin (hemi)channels in the liver. **Front Physiol**, v. 4, p. 405, 2014.

MAKOWSKI, L.; CASPAR, D. L.; PHILLIPS, W. C.; GOODENOUGH, D. A. Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. **J Cell Biol**, v. 74, n. 2, p. 629-645, 1977.

MAKOWSKI, L.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 16, n. 5, p. 543-548, 2005.

MALHOTRA, N.; BEATON, M. D. Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015. **World J Hepatol**, v. 7, n. 30, p. 2962-2967, 2015.

MANTENA, S. K.; KING, A. L.; ANDRINGA, K. K.; ECCLESTON, H. B.; BAILEY, S. M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 7, p. 1259-1272, 2008.

MARCHESINI, G.; PAGOTTO, U.; BUGIANESI, E.; DE IASIO, R.; MANINI, R.; VANNI, E.; PASQUALI, R.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Low ghrelin concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are related to insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 12, p. 5674-5679, 2003.

MARRA, F.; DEFRANCO, R.; GRAPPONE, C.; MILANI, S.; PASTACALDI, S.; PINZANI, M.; ROMANELLI, R. G.; LAFFI, G.; GENTILINI, P. Increased expression of

monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. **Am J Pathol**, v. 152, n. 2, p. 423-430, 1998.

MARRA, F. NASH: are genes blowing the hits? **J Hepatol**, v. 40, n. 5, p. 853-856, 2004.

MARRER, E.; DIETERLE, F. Impact of biomarker development on drug safety assessment. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 243, n. 2, p. 167-179, 2010.

MARTIN, P. E.; EVANS, W. H. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. **Cardiovasc Res**, v. 62, n. 2, p. 378-387, 2004.

MATSUDA, A.; WANG, Z.; TAKAHASHI, S.; TOKUDA, T.; MIURA, N.; HASEGAWA, J. Upregulation of mRNA of retinoid binding protein and fatty acid binding protein by cholesterol enriched-diet and effect of ginger on lipid metabolism. **Life Sci**, v. 84, n. 25-26, p. 903-907, 2009.

MATSUZAWA, Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 17, p. 1896-1901, 2010.

MAVRELIS, P. G.; AMMON, H. V.; GLEYSTEN, J. J.; KOMOROWSKI, R. A.; CHARAF, U. K. Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity. **Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 226-231, 1983.

MCCULLOUGH, A. J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, p. S17-29, 2006. Supplement, 1.

MEDICI, V.; ALI, M. R.; SEO, S.; AOKI, C. A.; ROSSARO, L.; KIM, K.; FULLER, W. D.; VIDOVSZKY, T. J.; SMITH, W.; JIANG, J. X.; MAGANTI, K.; HAVEL, P. J.; KAMBOJ, A.; RAMSAMOOJ, R.; TÖRÖK, N. J. Increased soluble leptin receptor levels in morbidly obese patients with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 12, p. 2268-2273, 2010.

MEHENDALE, H. M. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 1, p. 41-51, 2005.

MEHLEM, A.; HAGBERG, C. E.; MUHL, L.; ERIKSSON, U.; FALKEVALL, A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nat Protoc**, v. 8, n. 6, p. 1149-1154, 2013.

MERRIMAN, R. B.; AOUIZERAT, B. E.; BASS, N. M. Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, p. S30-33, 2006. Supplement, 1.

MEŞE, G.; RICHARD, G.; WHITE, T. W. Gap junctions: basic structure and function. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 11, p. 2516-2524, 2007.

MESNIL, M.; CRESPIEN, S.; AVANZO, J. L.; ZAIDAN-DAGLI, M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochim Biophys Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 125-145, 2005.

MICHON, L.; NLEND NLEND, R.; BAVAMIAN, S.; BISCHOFF, L.; BOUCARD, N.; CAILLE, D.; CANCELA, J.; CHAROLLAIS, A.; CHARPANTIER, E.; KLEE, P.; PEYROU, M.; POPULAIRE, C.; ZULIANELLO, L.; MEDA, P. Involvement of gap junctional communication in secretion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 82-101, 2005.

MIURA, K.; KODAMA, Y.; INOKUCHI, S.; SCHNABL, B.; AOYAMA, T.; OHNISHI, H.; OLEFSKY, J. M.; BRENNER, D. A.; SEKI, E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 1, p. 323-334.e327, 2010.

MORANTE, M.; SANDOVAL, J.; GÓMEZ-CABRERA, M. C.; RODRÍGUEZ, J. L.; PALLARDÓ, F. V.; VIÑA, J. R.; TORRES, L.; BARBER, T. Vitamin E deficiency induces liver nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and changes in related genes. **Free Radic Res**, v. 39, n. 10, p. 1127-1138, 2005.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; DURAZZO, M.; BIROLI, G.; CARELLO, M.; FAGÀ, E.; PACINI, G.; DE MICHIELI, F.; RABBIONE, L.; PREMOLI, A.; CASSADER, M.; PAGANO, G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1175-1183, 2005.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Prog Lipid Res**, v. 48, n. 1, p. 1-26, 2009.

NAGLE, C. A.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. **J Lipid Res**, v. 50, p. S74-79, 2009. Supplement.

NAIKI-ITO, A.; ASAMOTO, M.; NAIKI, T.; OGAWA, K.; TAKAHASHI, S.; SATO, S.; SHIRAI, T. Gap junction dysfunction reduces acetaminophen hepatotoxicity with impact on apoptotic signaling and connexin 43 protein induction in rat. **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 2, p. 280-286, 2010.

NAKASHIMA, Y.; ONO, T.; YAMANOI, A.; EL-ASSAL, O. N.; KOHNO, H.; NAGASUE, N. Expression of gap junction protein connexin32 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol**, v. 39, n. 8, p. 763-768, 2004.

NANJI, A. A. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. **Alcohol**, v. 34, n. 1, p. 21-25, 2004.

NANNIPIERI, M.; CECCHETTI, F.; ANSELMINO, M.; MANCINI, E.; MARCHETTI, G.; BONOTTI, A.; BALDI, S.; SOLITO, B.; GIANNETTI, M.; PINCHERA, A.; SANTINI, F.; FERRANNINI, E. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. **Obes Surg**, v. 19, n. 4, p. 467-474, 2009.

NASSIR, F.; IBDAH, J. A. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 5, p. 8713-8742, 2014.

NAUS, C. C.; LAIRD, D. W. Implications and challenges of connexin connections to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 6, p. 435-441, 2010.

NELLES, E.; BÜTZLER, C.; JUNG, D.; TEMME, A.; GABRIEL, H. D.; DAHL, U.; TRAUB, O.; STÜMPPEL, F.; JUNGGERMANN, K.; ZIELASEK, J.; TOYKA, K. V.; DERMIETZEL, R.; WILLECKE, K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9565-9570, 1996.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Evolving pathophysiologic concepts in nonalcoholic steatohepatitis. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2002.

NEVEU, M. J.; BABCOCK, K. L.; HERTZBERG, E. L.; PAUL, D. L.; NICHOLSON, B. J.; PITOT, H. C. Colocalized alterations in connexin32 and cytochrome P450IIB1/2 by phenobarbital and related liver tumor promoters. **Cancer Res**, v. 54, n. 12, p. 3145-3152, 1994.

NIELSEN, M. S.; AXELSEN, L. N.; SORGEN, P. L.; VERMA, V.; DELMAR, M.; HOLSTEIN-RATHLOU, N. H. Gap junctions. **Compr Physiol**, v. 2, n. 3, p. 1981-2035, 2012.

NISHIZAWA, H.; TAKAHASHI, M.; FUKUOKA, H.; IGUCHI, G.; KITAZAWA, R.; TAKAHASHI, Y. GH-independent IGF-I action is essential to prevent the development of nonalcoholic steatohepatitis in a GH-deficient rat model. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 423, n. 2, p. 295-300, 2012.

OMORI, Y.; ZAIDAN DAGLI, M. L.; YAMAKAGE, K.; YAMASAKI, H. Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. **Mutat Res**, v. 477, n. 1-2, p. 191-196, 2001.

OYAMADA, M.; TAKEBE, K.; OYAMADA, Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 1, p. 118-133, 2013.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PARISE, E.; SALGADO, A.; SECAF, R.; CERRI, L.; CERRI, G. Prevalência de esteatose hepática em ultra-sonografia de abdome. **GED Gastroenterol endosc dig**, v.22, n.6, p. 235-237, 2003.

PARISE, E. R.; OLIVEIRA, A. C. [Insulin resistance in chronic hepatitis C]. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n. 2, p. 178-184, 2007.

PARK, J. W.; PARK, W. J.; FUTERMAN, A. H. Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1841, n. 5, p. 671-681, 2014.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v. 32, n. 8, p. 853-858, 1997.

PATEL, S. J.; MILWID, J. M.; KING, K. R.; BOHR, S.; IRACHETA-VELLVE, A.; IRACHETA-VELLE, A.; LI, M.; VITALO, A.; PAREKKADAN, B.; JINDAL, R.; YARMUSH, M. L. Gap junction inhibition prevents drug-induced liver toxicity and fulminant hepatic failure. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 2, p. 179-183, 2012.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

PETTA, S.; MURATORE, C.; CRAXÌ, A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. **Dig Liver Dis**, v. 41, n. 9, p. 615-625, 2009.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 60-78, 2015.

POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 6, pt. 2, p. 643-648, 2008.

POWELL, E. E.; COOKSLEY, W. G.; HANSON, R.; SEARLE, J.; HALLIDAY, J. W.; POWELL, L. W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. **Hepatology**, v. 11, n. 1, p. 74-80, 1990.

PULZI, F. B.; CISTERNAS, R.; MELO, M. R.; RIBEIRO, C. M.; MALHEIROS, C. A.; SALLES, J. E. New clinical score to diagnose nonalcoholic steatohepatitis in obese patients. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, n. 1, p. 3, 2011.

QUAN, H. Y.; KIM, D. Y.; KIM, S. J.; JO, H. K.; KIM, G. W.; CHUNG, S. H. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 9, p. 1330-1340, 2013.

RABELO, F.; OLIVEIRA, C. P.; FAINTUCH, J.; MAZO, D. F.; LIMA, V. M.; STEFANO, J. T.; BARBEIRO, H. V.; SORIANO, F. G.; ALVES, V. A.; CARRILHO, F. J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in steatosis and steatohepatitis. **Obes Surg**, v. 20, n. 7, p. 906-912, 2010.

RAKHSHANDEHROO, M.; HOOIVELD, G.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6796, 2009.

REAVEN, G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 33, n. 2, p. 283-303, 2004.

RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; WEI, Y.; IBDAH, J. A. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 2, p. 185-192, 2008.

REVEL, J. P.; KARNOVSKY, M. J. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. **J Cell Biol**, v. 33, n. 3, p. C7-C12, 1967.

REVEL, J. P.; SHERIDAN, J. D. Electrophysiological and ultrastructural studies of intercellular junctions in brown fat. **J Physiol**, v. 194, n. 1, p. 34P-35P, 1968.

RICCHI, M.; ODOARDI, M. R.; CARULLI, L.; ANZIVINO, C.; BALLESTRI, S.; PINETTI, A.; FANTONI, L. I.; MARRA, F.; BERTOLOTTI, M.; BANNI, S.; LONARDO, A.; CARULLI, N.; LORIA, P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

RINELLA, M. E.; ELIAS, M. S.; SMOLAK, R. R.; FU, T.; BORENSZTAJN, J.; GREEN, R. M. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. **J Lipid Res**, v. 49, n. 5, p. 1068-1076, 2008.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 12, p. 885-896, 2006.

SAGAWA, H.; NAIKI-ITO, A.; KATO, H.; NAIKI, T.; YAMASHITA, Y.; SUZUKI, S.; SATO, S.; SHIOMI, K.; KATO, A.; KUNO, T.; MATSUO, Y.; KIMURA, M.; TAKEYAMA, H.; TAKAHASHI, S. Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 12, p. 1539-1549, 2015.

SAITO, C.; SHINZAWA, K.; TSUJIMOTO, Y. Synchronized necrotic death of attached hepatocytes mediated via gap junctions. **Sci Rep**, v. 4, p. 5169, 2014.

SANYAL, A. J.; CAMPBELL-SARGENT, C.; MIRSHAHI, F.; RIZZO, W. B.; CONTOS, M. J.; STERLING, R. K.; LUKETIC, V. A.; SHIFFMAN, M. L.; CLORE, J. N. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**, v. 120, n. 5, p. 1183-1192, 2001.

SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; DIEHL, A. M.; BASS, N. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; LAVINE, J. E.; TONASCIA, J.; UNALP, A.; VAN NATTA, M.; CLARK, J.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H.; ROBUCK, P. R.; CRN, N. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 18, p. 1675-1685, 2010.

SCHULTZ, A.; NEIL, D.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21873-21886, 2013.

SEVERS, N. J.; BRUCE, A. F.; DUPONT, E.; ROTHERY, S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. **Cardiovasc Res**, v. 80, n. 1, p. 9-19, 2008.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 30028-30032, 1999.

SHINDO, N.; FUJISAWA, T.; SUGIMOTO, K.; NOJIMA, K.; OZE-FUKAI, A.; YOSHIKAWA, Y.; WANG, X.; YASUDA, O.; IKEGAMI, H.; RAKUGI, H. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. **J Hepatol**, v. 52, n. 6, p. 903-912, 2010.

SHIOJIRI, N.; NIWA, T.; SUGIYAMA, Y.; KOIKE, T. Preferential expression of connexin37 and connexin40 in the endothelium of the portal veins during mouse liver development. **Cell Tissue Res**, v. 324, n. 3, p. 547-552, 2006.

SHIRAI, N.; SUZUKI, H.; WADA, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. **Anal Biochem**, v. 343, n. 1, p. 48-53, 2005.

SHODA, T.; MITSUMORI, K.; ONODERA, H.; TOYODA, K.; UNEYAMA, C.; TAKADA, K.; HIROSE, M. Liver tumor-promoting effect of beta-naphthoflavone, a strong CYP 1A1/2 inducer, and the relationship between CYP 1A1/2 induction and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in the rat. **Toxicol Pathol**, v. 28, n. 4, p. 540-547, 2000.

SINGH, D. K.; SAKHUJA, P.; RASTOGI, A.; SINGH, A.; GONDAL, R.; SARIN, S. K. Serum leptin levels correlate with body mass index but not with histologic disease severity in Indian patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 5, p. 986-987, 2013.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STAHL, S.; ITTRICH, C.; MARX-STOELTING, P.; KÖHLE, C.; OTT, T.; BUCHMANN, A.; SCHWARZ, M. Effect of the tumor promoter phenobarbital on the pattern of global gene expression in liver of connexin32-wild-type and connexin32-deficient mice. **Int J Cancer**, v. 115, n. 6, p. 861-869, 2005.

STRACZKOWSKI, M.; KOWALSKA, I.; NIKOLAJUK, A.; KRUKOWSKA, A.; GORSKA, M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. **Diabetes Care**, v. 28, n. 8, p. 2036-2037, 2005.

STÜMPEL, F.; OTT, T.; WILLECKE, K.; JUNGERMANN, K. Connexin 32 gap junctions enhance stimulation of glucose output by glucagon and noradrenaline in mouse liver. **Hepatology**, v. 28, n. 6, p. 1616-1620, 1998.

STUTENKEMPER, R.; GEISSE, S.; SCHWARZ, H. J.; LOOK, J.; TRAUB, O.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin32 and connexin26 but very low expression of connexin43. **Exp Cell Res**, v. 201, n. 1, p. 43-54, 1992.

SU, V.; LAU, A. F. Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. **FEBS Lett**, v. 588, n. 8, p. 1212-1220, 2014.

- TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, 2012.
- TANAKA, N.; MATSUBARA, T.; KRAUSZ, K. W.; PATTERSON, A. D.; GONZALEZ, F. J. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 56, n. 1, p. 118-129, 2012.
- TEMME, A.; BUCHMANN, A.; GABRIEL, H. D.; NELLES, E.; SCHWARZ, M.; WILLECKE, K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. **Curr Biol**, v. 7, n. 9, p. 713-716, 1997.
- TEMME, A.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Downregulation of connexin32 protein and gap-junctional intercellular communication by cytokine-mediated acute-phase response in immortalized mouse hepatocytes. **Cell Tissue Res**, v. 294, n. 2, p. 345-350, 1998.
- TEMME, A.; OTT, T.; HABERBERGER, T.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Acute-phase response and circadian expression of connexin26 are not altered in connexin32-deficient mouse liver. **Cell Tissue Res**, v. 300, n. 1, p. 111-117, 2000.
- TEMME, A.; STÜMPPEL, F.; SÖHL, G.; RIEBER, E. P.; JUNGGERMANN, K.; WILLECKE, K.; OTT, T. Dilated bile canaliculi and attenuated decrease of nerve-dependent bile secretion in connexin32-deficient mouse liver. **Pflugers Arch**, v. 442, n. 6, p. 961-966, 2001.
- TERPSTRA, A. H. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 3, p. 352-361, 2004.
- TESSARI, P.; CORACINA, A.; COSMA, A.; TIENGO, A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 19, n. 4, p. 291-302, 2009.
- TILLMANN, T.; KAMINO, K.; DASENBROCK, C.; KOHLER, M.; MORAWIETZ, G.; CAMPO, E.; CARDESA, A.; TOMATIS, L.; MOHR, U. Quality control of three methods for lung tumorigenesis studies. **Exp Toxicol Pathol**, v. 51, n. 1, p. 99-104, 1999.
- TOMITA, K.; TAMIYA, G.; ANDO, S.; OHSUMI, K.; CHIYO, T.; MIZUTANI, A.; KITAMURA, N.; TODA, K.; KANEKO, T.; HORIE, Y.; HAN, J. Y.; KATO, S.; SHIMODA, M.; OIKE, Y.; TOMIZAWA, M.; MAKINO, S.; OHKURA, T.; SAITO, H.; KUMAGAI, N.; NAGATA, H.; ISHII, H.; HIBI, T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. **Gut**, v. 55, n. 3, p. 415-424, 2006.
- TORRES, L. L.; QUAGLIO, N. B.; DE SOUZA, G. T.; GARCIA, R. T.; DATI, L. M.; MOREIRA, W. L.; LOUREIRO, A. P.; DE SOUZA-TALARICO, J. N.; SMID, J.; PORTO,

C. S.; BOTTINO, C. M.; NITRINI, R.; BARROS, S. B.; CAMARINI, R.; MARCOURAKIS, T. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 26, n. 1, p. 59-68, 2011.

TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front Biosci**, v. 3, n., p. d208-236, 1998.

TU, K.; ZHENG, X.; YIN, G.; ZAN, X.; YAO, Y.; LIU, Q. Evaluation of Fbxw7 expression and its correlation with expression of SREBP-1 in a mouse model of NAFLD. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 3, p. 525-530, 2012.

UNDERWOOD, L. E.; THISSEN, J. P.; LEMOZY, S.; KETELSLEGERS, J. M.; CLEMMONS, D. R. Hormonal and nutritional regulation of IGF-I and its binding proteins. **Horm Res**, v. 42, n. 4-5, p. 145-151, 1994.

UYGUN, A.; KADAYIFCI, A.; YESILOVA, Z.; ERDIL, A.; YAMAN, H.; SAKA, M.; DEVECI, M. S.; BAGCI, S.; GULSEN, M.; KARAEREN, N.; DAGALP, K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 12, p. 3584-3589, 2000.

VAN VEEN, A. A.; VAN RIJEN, H. V.; OPTHOF, T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. **Cardiovasc Res**, v. 51, n. 2, p. 217-229, 2001.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **J Clin Invest**, v. 97, n. 11, p. 2553-2561, 1996.

VIDELA, L. A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUIÑONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; BURDILES, P.; DIAZ, J. C.; SMOK, G.; THIELEMANN, L.; PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 3, p. 261-268, 2004.

VINKEN, M.; HENKENS, T.; DE ROP, E.; FRACZEK, J.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Biology and pathobiology of gap junctional channels in hepatocytes. **Hepatology**, v. 47, n. 3, p. 1077-1088, 2008.

VINKEN, M.; DOKTOROVA, T.; DECROCK, E.; LEYBAERT, L.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 44, n. 4, p. 201-222, 2009.

VINKEN, M.; DECROCK, E.; DE VUYST, E.; DE BOCK, M.; VANDENBROUCKE, R. E.; DE GEEST, B. G.; DEMEESTER, J.; SANDERS, N. N.; VANHAECKE, T.; LEYBAERT, L.; ROGIERS, V. Connexin32 hemichannels contribute to the apoptotic-to-necrotic transition during Fas-mediated hepatocyte cell death. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 6, p. 907-918, 2010.

VINKEN, M. Gap junctions and non-neoplastic liver disease. **J Hepatol**, v. 57, n. 3, p. 655-662, 2012.

VINKEN, M. Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 15, p. 2775-2778, 2015.

WANG, X.; HASEGAWA, J.; KITAMURA, Y.; WANG, Z.; MATSUDA, A.; SHINODA, W.; MIURA, N.; KIMURA, K. Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. **J Pharmacol Sci**, v. 117, n. 3, p. 129-138, 2011.

WEI, D.; TAO, R.; ZHANG, Y.; WHITE, M. F.; DONG, X. C. Feedback regulation of hepatic gluconeogenesis through modulation of SHP/Nr0b2 gene expression by Sirt1 and FoxO1. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 2, p. E312-320, 2011.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEIß, J.; RAU, M.; GEIER, A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. **Dtsch Arztebl Int**, v. 111, n. 26, p. 447-452, 2014.

WHITE, U. A.; STEPHENS, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**, v. 318, n. 1-2, p. 10-14, 2010.

WIECKOWSKA, A.; PAPOUCHADO, B. G.; LI, Z.; LOPEZ, R.; ZEIN, N. N.; FELDSTEIN, A. E. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 6, p. 1372-1379, 2008.

WILLEBRORDS, J.; PEREIRA, I. V.; MAES, M.; CRESPO YANGUAS, S.; COLLE, I.; VAN DEN BOSSCHE, B.; DA SILVA, T. C.; DE OLIVEIRA, C. P.; ANDRAUS, W.; ALVES, V. A.; COGLIATI, B.; VINKEN, M. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. **Prog Lipid Res**, v. 59, p. 106-125, 2015.

WILLECKE, K.; HENNEMANN, H.; DAHL, E.; JUNGBLUTH, S.; HEYNKES, R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. **Eur J Cell Biol**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 1991.

WINER, S.; CHAN, Y.; PALTZER, G.; TRUONG, D.; TSUI, H.; BAHRAMI, J.; DORFMAN, R.; WANG, Y.; ZIELENSKI, J.; MASTRONARDI, F.; MAEZAWA, Y.; DRUCKER, D. J.; ENGLEMAN, E.; WINER, D.; DOSCH, H. M. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 921-929, 2009.

WOLF, M. J.; ADILI, A.; PIOTROWITZ, K.; ABDULLAH, Z.; BOEGE, Y.; STEMMER, K.; RINGELHAN, M.; SIMONAVICIUS, N.; EGGER, M.; WOHLLEBER, D.; LORENTZEN, A.; EINER, C.; SCHULZ, S.; CLAVEL, T.; PROTZER, U.; THIELE, C.; ZISCHKA, H.; MOCH, H.; TSCHÖP, M.; TUMANOV, A. V.; HALLER, D.; UNGER, K.; KARIN, M.; KOPF, M.; KNOLLE, P.; WEBER, A.; HEIKENWALDER, M. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. **Cancer Cell**, v. 26, n. 4, p. 549-564, 2014.

WORTHAM, M.; HE, L.; GYAMFI, M.; COPPLE, B. L.; WAN, Y. J. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 10, p. 2761-2774, 2008.

YAMAOKA, K.; NOUCHI, T.; TAZAWA, J.; HIRANUMA, S.; MARUMO, F.; SATO, C. Expression of gap junction protein connexin 32 and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 22, n. 5, p. 536-539, 1995.

YAMAOKA, K.; NOUCHI, T.; KOHASHI, T.; MARUMO, F.; SATO, C. Expression of gap junction protein connexin 32 in chronic liver diseases. **Liver**, v. 20, n. 2, p. 104-107, 2000.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YANG, J.; ICHIKAWA, A.; TSUCHIYA, T. A novel function of connexin 32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, n. 1, p. 80-85, 2003.

YANG, S. Q.; LIN, H. Z.; LANE, M. D.; CLEMENS, M.; DIEHL, A. M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 6, p. 2557-2562, 1997.

YESILOVA, Z.; YAMAN, H.; OKTENLI, C.; OZCAN, A.; UYGUN, A.; CAKIR, E.; SANISOGLU, S. Y.; ERDIL, A.; ATES, Y.; ASLAN, M.; MUSABAK, U.; ERBIL, M. K.; KARAEREN, N.; DAGALP, K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. **Am J Gastroenterol**, v. 100, n. 4, p. 850-855, 2005.

YILMAZ, Y. NAFLD in the absence of metabolic syndrome: different epidemiology, pathogenetic mechanisms, risk factors for disease progression? **Semin Liver Dis**, v. 32, n. 1, p. 14-21, 2012.

YKI-JÄRVINEN, H. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Dig Dis**, v. 28, n. 1, p. 203-209, 2010.

YOUNOSSI, Z. M.; JARRAR, M.; NUGENT, C.; RANDHAWA, M.; AFENDY, M.; STEPANOVA, M.; RAFIQ, N.; GOODMAN, Z.; CHANDHOKE, V.; BARANOVA, A. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Obes Surg**, v. 18, n. 11, p. 1430-1437, 2008.

YU, J.; CHU, E. S.; WANG, R.; WANG, S.; WU, C. W.; WONG, V. W.; CHAN, H. L.; FARRELL, G. C.; SUNG, J. J. Heme oxygenase-1 protects against steatohepatitis in both cultured hepatocytes and mice. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 694-704, 704.e691, 2010.

ZAHRAN, W. E.; SALAH EL-DIEN, K. A.; KAMEL, P. G.; EL-SAWABY, A. S. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. **Indian J Clin Biochem**, v. 28, n. 2, p. 141-146, 2013.

ZEISEL, S. H.; BLUSZTAJN, J. K. Choline and human nutrition. **Annu Rev Nutr**, v. 14, p. 269-296, 1994.

ZELBER-SAGI, S.; KESSLER, A.; BRAZOWSKY, E.; WEBB, M.; LURIE, Y.; SANTO, M.; LESHNO, M.; BLENDIS, L.; HALPERN, Z.; OREN, R. A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 5, p. 639-644, 2006.

ZHAO, B.; ZHAO, W.; WANG, Y.; XU, Y.; XU, J.; TANG, K.; ZHANG, S.; YIN, Z.; WU, Q.; WANG, X. Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and Akt pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 10116-10133, 2015.

APÊNDICE A-LISTA DE GENES INVESTIGADOS

Símbolo	Nome
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
Acaca	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha
Acadl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain
Acly	ATP citrate lyase
Acox1	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
Acsl5	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
Acsn3	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
Adipor1	Adiponectin receptor 1
Adipor2	Adiponectin receptor 2
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1
Apoa1	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC3	Apolipoprotein C-III
ApoE	Apolipoprotein E
Atp5c1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
Casp3	Caspase 3
Cd36	CD36 antigen
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Cnbp	Cellular nucleic acid binding protein
Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver
Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2
Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1
Cyp7a1	Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
Dgat2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2
Fabp1	Fatty acid binding protein 1, liver
Fabp3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Fabp5	Fatty acid binding protein 5, epidermal
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)
Fasn	Fatty acid synthase
Foxa2	Forkhead box A2
G6pc	Glucose-6-phosphatase, catalytic
G6pdx	Glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked
Gck	Glucokinase
Gsk3b	Glycogen synthase kinase 3 beta
Gyk	Glycerol kinase
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
Hnf4a	Hepatic nuclear factor 4, alpha
Ifng	Interferon gamma
Igf1	Insulin-like growth factor 1
Igfbp1	Insulin-like growth factor binding protein 1
Il10	Interleukin 10
Il1b	Interleukin 1 beta
Il6	Interleukin 6

Insr	Insulin receptor
Irs1	Insulin receptor substrate 1
Ldlr	Low density lipoprotein receptor
Lepr	Leptin receptor
Lpl	Lipoprotein lipase
Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1
Mapk8	Mitogen-activated protein kinase 8
MLXipl	MLX interacting protein-like
Mtor	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
Ndufb6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
Nr1h2	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
Nr1h3	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
Nr1h4	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4
Pck2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
Pdk4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Pik3ca	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
Pik3r1	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)
Pklr	Pyruvate kinase liver and red blood cell
Ppa1	Pyrophosphatase (inorganic) 1
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
Ppard	Peroxisome proliferator activator receptor delta
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Ppargc1a	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
Prkaa1	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
Ptpn1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
Rbp4	Retinol binding protein 4, plasma
Rxra	Retinoid X receptor alpha
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Slc27a5	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5
Slc2a1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
Slc2a2	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
Slc2a4	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3
Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
Srebf2	Sterol regulatory element binding factor 2
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tnf	Tumor necrosis factor
Xbp1	X-box binding protein 1
Actb	Actin, beta
B2m	Beta-2 microglobulin
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gusb	Glucuronidase, beta
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1