ALINE DAVID SILVA

**A ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA ACOMPANHA-SE
DE SUPEREXPRESSÃO DE *SLC2A2*, *PCK1* E *G6PC* O QUE
AUMENTA O EFLUXO HEPÁTICO DE GLICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

ALINE DAVID SILVA

**A ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA ACOMPANHA-SE
DE SUPEREXPRESSÃO DE *SLC2A2*, *PCK1* E *G6PC* O QUE
AUMENTA O EFLUXO HEPÁTICO DE GLICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientador: Ubiratan Fabres Machado.

Versão Original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Aline David.

A esteato-hepatite não alcoólica acompanha-se de superexpressão de SLC2A2, PCK1 e G6PC o que aumenta o efluxo hepático de glicose / Aline David Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiopatologia do Diabetes Mellitus: papel dos transportadores de glicose.

Versão do título para o inglês: The nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by SLC2A2, PCK1 and G6PC superexpression and increased glucose liver efflux.

1. Diabetes Mellitus 2. Obesidade 3. Fígado gorduroso 4. Glicose
I. Machado, Prof. Dr. Ubiratan Fabres II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica III. Título.

ICB/SBIB035/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline David Silva.

Título da Tese: A esteato-hepatite não alcoólica acompanha-se de superexpressão de SLC2A2, PCK1 e G6PC o que aumenta o efluxo hepático de glicose.

Orientador(a): Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **82** nas fls. **105** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ubiratan Fabres Machado**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Regulação transcricional do gene SLC2A2 em animais com esteato-hepatite não alcoólica*" do qual participam o(s) alunos **Aline David Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **15.07.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 031.14

São Paulo, 02 de junho de 2014.

REF.: Protocolo nº 082/11.

"Regulação transcricional do gene SLC2A2 em animais com esteato-hepatite não alcoólica"

Prezado^(a) Professor^(a),

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 15.07.17.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.
Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À equipe do laboratório de Metabolismo e Endocrinologia,
Pelos 10 anos de aprendizado e amizade.

AGRADECIMENTOS

Após uma década de pesquisa, chegou o momento de agradecer por toda contribuição e auxílio que recebi.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pelo qual tenho grande admiração e gratidão imensurável.

À Luciana Belpidade, Daniela Furuya, Helayne Freitas, Maristela Okamoto e Patrícia Ebersbach, meus agradecimentos por toda ajuda científica, acadêmica e também pela amizade.

Aos amigos de laboratório, Ana Bárbara Alves, Bruna Lins, Danilo Correa, Frederico Gerlinger, João Esteves, João Andrade, José Augusto, Raquel Campello, Rosana Mori, Malu Michalani e Erika Machado pela solidariedade, carinho e inúmeros momentos de diversão.

Aos excelentes professores, Ângelo Carpinelli, Maria Tereza Nunes e Luciana Rossoni, por serem grandes exemplos e me auxiliarem além da pesquisa e ensino. Ao admirável professor Rui Curi, por me mostrar que um profissional incrível também pode ser uma pessoa sensacional e humilde.

Aos colaboradores deste trabalho: à professora Thelma Zorn e sua equipe do laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular, pelo cuidado nas análises histológicas; ao professor Francisco Garcia Soriano e sua equipe do LIM-51 – Laboratório de Emergências Clínicas, pela acurácia nas análises de ELISA.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Camila Lucena, Marco Fortes, Ana Panveloski, Katherine Veras e Maíra Valle, muito obrigada pelas discussões científicas (e não científicas) banhadas de risadas, almoços e viagens.

A todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial ao memorável José Maria, à doce Paloma e à querida Leila, agradeço por toda a ajuda, carinho e dedicação. Agradeço também a todos os funcionários do biotério, principalmente ao Wilson, sem vocês, esta pesquisa não seria possível.

A todos os funcionários da biblioteca, especialmente às queridas Monica, Val, Bel, Rosa e Terezinha. Agradeço pela paciência, ensino e amizade.

Aos funcionários da limpeza, com destaque para os meus amigos: Aline e Sr. Peninha.

Ao Curso de Verão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por me mostrar que ensinar é a melhor maneira de aprender.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

O meu agradecimento mais profundo é destinado àqueles que são minha vida e essência: aos meus amados pais, por estarem sempre presentes, pelo incentivo, amor, paciência, dedicação e compreensão; e ao Carlos, que transformou a minha vida, deixando-a mais alegre, com mais sentido e amor.

Às minhas três terapeutas caninas que deixam a minha vida muito mais leve e divertida.

A Deus, por criar e permitir a realização dos meus sonhos e por iluminar meus caminhos. Agradeço a Deus por poder citar todas estas pessoas e por colocá-las em minha vida.

“O que fizemos apenas por nós mesmos morre conosco; o que fizemos pelos outros
e pelo mundo permanece e é imortal”.

Albert Pike

Resumo

Silva, AD. A esteato-hepatite não alcoólica acompanha-se de superexpressão de *Slc2a2*, *Pck1* e *G6pc* o que aumenta o efluxo hepático de glicose. [tese (doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) tem sido associada à resistência à insulina. Essa última, na maioria das vezes, envolve aumento no efluxo hepático de glicose, o que contribui para hiperglicemia. Entretanto, a associação entre EHNA e aumento do efluxo de glicose, assim como alterações moleculares dessas duas condições, nunca foram clara e concomitante demonstradas. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar alterações moleculares relacionadas ao metabolismo da glicose em fígado de camundongos obesos portadores de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), assim como determinar o provável envolvimento da hiperglicemia nessas alterações.

Estudamos camundongos de 20 semanas de idade, tornados obesos por tratamento neonatal com glutamato monóssódico (MSG) e tratados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas ou com florizina (inibidor da reabsorção renal de glicose) durante 6 dias. Nos animais obesos (MSG), independentemente da dieta hiperlipídica, a análise histológica do fígado revelou a presença de esteatose, balonização e inflamação, caracterizando o quadro de EHNA; e isso acompanhou-se de aumento no conteúdo dos mRNAs *Tnfa*, *Il6* e *Rela*, reiterando a atividade inflamatória local. Em relação ao metabolismo de carboidrato, observou-se no fígado de animais MSG: 1) aumento na expressão dos mRNAs *Slc2a2*, *Pck1*, *G6pc* e respectivas proteínas GLUT2, PEPCK e G6Pase; 2) redução na expressão do mRNA *Gck* e sua proteína GCK; 3) aumento no conteúdo hepático de glicogênio e no efluxo hepático de glicose; e 4) resistência insulínica (menor decaimento da glicose durante ITT), hiperinsulinemia e hiperglicemia. A regulação da expressão do gene do transportador GLUT2 foi confirmada ser mediada por aumento na atividade dos fatores transcripcionais HNF4A, HNF3B, HNF1A e NFkB (maior ligação no promotor do *Slc2a2*). O tratamento de camundongos MSG com florizina, induzindo perda urinária de glicose, normalizou a glicemia. Esse efeito foi acompanhado por: 1) atenuação importante da EHNA com redução na esteatose, na balonização e no peso do fígado; 2) reversão completa de todas as alterações moleculares

relacionadas ao metabolismo de carboidrato, da atividade dos fatores transcricionais estudados, do conteúdo hepático de glicogênio e do efluxo hepático de glicose. Com base nos resultados obtidos conclui-se em camundongos obesos que a esteato-hepatite não alcoólica acompanha-se de aumento na expressão do GLUT2 e das enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase, levando a maior efluxo hepático de glicose, resistência à insulina e hiperglicemia. Essas alterações revertem em resposta à queda glicêmica induzida por florizina, revelando a hiperglicemia como potente fator etiopatogênico.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Obesidade. Fígado gorduroso. Glicose.

ABSTRACT

Silva, AD. The nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by *Slc2a2*, *Pck1* and *G6pc* superexpression and increased glucose liver efflux. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The nonalcoholic steatohepatitis (NASH) has been linked to insulin resistance. In most cases, insulin resistance, involves increased hepatic glucose efflux, which contributes to hyperglycaemia. However, the association between NASH and increased glucose efflux as well as molecular changes of these two conditions are not clear and were never demonstrated. The objective of this study was to investigate molecular changes related to glucose metabolism in liver of obese mice with a non-alcoholic steatohepatitis (NASH), as well as determine the probable involvement of hyperglycemia in these changes.

We studied 20 weeks of age obese mice, the obesity was established due to neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG). The animals were treated with high-fat diet for 16 weeks or with phlorizin (inhibitor of renal reabsorption of glucose) for 6 days. In obese animals (MSG), regardless of fat diet, histological analysis of liver revealed the presence of steatosis, ballooning degeneration and inflammation, characterizing NASH; and this was accompanied by an increase in the content of *TNFA*, *Il6* and *Rela* mRNAs, reiterating the local inflammatory activity. In relation to carbohydrate metabolism, it was observed in the liver of MSG animals: 1) increased expression of the *Slc2a2*, *Pck1* and *G6pc* mRNAs and their GLUT2 PEPCCK and G6Pase protein; 2) reduced expression of *Gck* mRNA and GCK protein; 3) increased hepatic glycogen and glucose hepatic efflux; and 4) insulin resistance (lower decay of glucose during ITT), hyperinsulinemia and hyperglycemia. The regulation of GLUT2 transporter gene expression was confirmed to be mediated by an increased activity of transcription factors HNF4A, HNF3B, HNF1A and NFkB (*Slc2a2* in increased binding of the promoter). Treatment of mice with MSG phlorizin, inducing urinary loss of glucose normalized glucose test. This effect was accompanied by: 1) significant attenuation of NASH with reduction in steatosis, ballooning and the liver weight; 2) complete reversal of all molecular changes related

to carbohydrate metabolism, the activity of transcription factors studied, the liver glycogen content and hepatic glucose efflux. Based on the results, it is concluded that nonalcoholic steatohepatitis obese mice is accompanied with increased expression of the GLUT2 and gluconeogenic enzymes PEPCK and G6Pase, leading to increased hepatic glucose efflux, insulin resistance and hyperglycemia. These changes reversed in response to glucose-induced fall phlorizin, revealing hyperglycemia as powerful pathogenetic factor.

Keywords: Diabetes Mellitus. Obesity. Fatty liver. Glucose.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Mecanismos da esteatose e esteato-hepatite não alcoólica	20
Figura 2 - Análise histológica (HE – aumento 20X) de fígado de animais controle (C) e obesos (MSG), alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 4, 8, 12 e 16 semanas	47
Figura 3 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA (B) para cada animal avaliado, e a média $\pm$ EPM do score de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 4 semanas	48
Figura 4 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA para cada animal avaliado (B) e a média $\pm$ EPM do score de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 8 semanas	49
Figura 5 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA para cada animal avaliado (B) e a média $\pm$ EPM dos scores de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 12 semanas	50
Figura 6 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA para cada animal avaliado (B) e a média $\pm$ EPM dos scores de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	51
Figura 7 - As imagens mostram análise histológica de fígado (HE - aumento 40x) de animais MSG alimentados durante 16 semanas com dieta hiperlipídica: A) presença de foco inflamatório (setas pretas), macro-esteatose (seta vermelha), micro-esteatose (seta verde) e balonização (seta laranja); e B) foco inflamatório (setas pretas)	52
Figura 8 - Vista dorsal de camundongos controle e MSG alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, durante 16 semanas. Camundongos controle normolipídica (A), camundongos MSG dieta normolipídica (B) e camundongo dieta hiperlipídica (C)	53
Figura 9 - Massa corporal no momento do desmame (A) e após 16 semanas de consumo das dietas(B), de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH)	54
Figura 10 - Delta de peso corporal após 16 semanas de tratamento (A) e evolução do peso corporal (B) dos animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH)	55
Figura 11 - Ingestão diária média de ração, em gramas (A) e kcal (B), dos camundongos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	57
Figura 12 - Peso do fígado dos camundongos dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	58

Figura 13 - Concentração plasmática de triglicérides (A), glicose (B) e colesterol total (C) dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	59
Figura 14 - Concentração de ALT (A) e AST (B) em animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	60
Figura 15 - Valores de insulinemia dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	61
Figura 16 - Teste de Tolerância à Insulina A. Valores da constante de decaimento da glicose (Kitt). B. Curva de decaimento da glicose. O Teste de Tolerância à Insulina foi realizado em grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	62
Figura 17 - Conteúdo de glicogênio no fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	63
Figura 18 - Quantificação dos mRNAs <i>Slc2a2</i> (A), <i>G6pc</i> (B), <i>Pck1</i> (C) e <i>Gck</i> (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	65
Figura 19 - Quantificação dos mRNAs <i>Hnf4a</i> (A), <i>Foxa2</i> (B) <i>Tnfa</i> (C) e <i>Hnf1a</i> (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	66
Figura 20 - Quantificação dos mRNAs <i>Il6</i> (A), <i>Il1b</i> (B) <i>Tnfa</i> (C) e <i>Rela</i> (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas	67
Figura 21 - Autoradiografia do ensaio de competição. Proteínas nucleares foram extraídas de fígado e incubadas com oligonucleotídeo radioativo contendo os domínios de ligação para: A. HNF1A (lanes 1-5), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lane 1: 0X, lane 2: 10X, lane 3: 20X, lane 4: 50X) ou anti-corpo anti-HNF1A (lane 5). B. HNF4A (lanes 1-7), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lanes 1 e 4: 0X, lanes 2 e 5: 50X, lanes 3 e 6: 100X) ou anti-corpo anti-HNF4A (lane 7)	69
Figura 22 - Autoradiografia do ensaio de competição. Proteínas nucleares foram extraídas de fígado e incubadas com oligonucleotídeo radioativo contendo o domínio de ligação HNF3B (lanes 1-4), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lane 1: 0X, lane 2: 10X, lane 3: 20X) ou anti-corpo anti-HNF3B (lane 4)	70
Figura 23 - Autoradiografia do ensaio de competição. Proteínas nucleares foram extraídas de fígado e incubadas com oligonucleotídeo radioativo contendo o domínio de ligação do NFkB (lanes 1-10), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lane 1, 6 e 9: 0X, lane 2 e 7: 10X, lane 3 e 8: 50X, lane 4: 100X) ou anti-corpo (lane 5 e 10)	71
Figura 24 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do <i>Slc2a2</i> em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. B. Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do <i>Slc2a2</i>	72

Figura 25 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2*73

Figura 26 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2*74

Figura 27 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do NFkB no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do NFkB no promotor do *Slc2a2*75

Figura 28 - I. Imagem representativa das proteínas avaliadas. **II.** Quantificação da análise da proteína GLUT2 (**A**), G6PASE (**B**) e PEPCK (**C**) no fígado dos animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas76

Figura 29 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (**A**), o score de EHNA para cada animal avaliado (**B**) e a média $\pm$ EPM dos scores de EHNA (**C**) de animais controle, MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL)78

Figura 30 - Estereologia do fígado de animais controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **A.** Volume de tecido hepático ocupado pelos hepatócitos. **B.** Volume de tecido hepático ocupado por gordura79

Figura 31 - Peso do fígado dos animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL)80

Figura 32 - Concentração plasmática de triglicérides (**A**), glicose (**B**) e colesterol total (**C**) dos animais dos grupos controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL)81

Figura 33 - Quantificação dos mRNAs *Slc2a2* (**A**), *G6pc* (**B**), *Pck1* (**C**) e *Gck* (**D**) em fígado de animais controle, MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL)82

Figura 34 - Quantificação do mRNA do *Hnf4a* (**A**) *Foxa2* (**B**) e *Hnf1a* (**C**) em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL)83

Figura 35 - Quantificação dos mRNAs *Il6* (**A**), *Il1b* (**B**), *Tnfa* (**C**) e *Rela* (**D**) em fígado e animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL)84

Figura 36 - I. Imagem representativa das proteínas avaliadas. **II.** Quantificação da análise da proteína GLUT2 (**A**), G6PASE (**B**) e PEPCK (**C**) no fígado dos animais controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL)85

Figura 37 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2*86

Figura 38 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2*87

Figura 39 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2*88

Figura 40 - Conteúdo de glicogênio no fígado de animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL)89

Figura 41 - Teste de tolerância ao piruvato para verificar os níveis de gliconeogênese hepática dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **A.** Curva de glicemia obtida pelo teste. **B.** Área sob a curva referente ao teste90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCÓOLICA	20
1.2 SLC2A2/GLUT2 E FÍGADO	23
1.3 GLICOSE-6-FOSFATASE, GLICOCINASE E FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE	25
1.3.1 GLICOSE-6-FOSFATASE (G6PASE)	25
1.3.2 GLICOCINASE (GK)	26
1.3.3 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE (PEPCK)	27
1.4 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTORS (HNFS) E EXPRESSÃO DO GENE SLC2A2	27
1.4.1 HNF1A	27
1.4.2 HNF4A	29
1.4.3 HNF3B	30
1.5 NFKB	31
1.6 FLORIZINA	32
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS MSG (GLUTAMATO MONOSSÓDICO)	36
4.2 TRATAMENTO COM DIETA HIPERLIPÍDICA	37
4.3 TRATAMENTO COM FLORIZINA	38
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
4.4.1 COLETA DE AMOSTRAS	39
4.4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (IPITT)	39
4.4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO INTRAPERITONEAL (IPPTT)	40
4.4.4 DOSAGEM DO CONTEÚDO HEPÁTICO DE GLICOGÊNIO	40
4.4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS NO PLASMA	40
4.4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS – ELISA	41
4.4.7 WESTERN BLOTTING	41
4.4.8 PCR – TEMPO REAL	42
4.4.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (ELETROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY- EMSA) OU GEL DE RETARDO (GEL SHIFT)	45
4.4.10 ENSAIO DE SUPER SHIFT (COMPETIÇÃO ESPECÍFICA)	46
4.4.11 ESTUDO HISTOLÓGICO	47
4.4.12. ESTEREOLOGIA DOS HEPATÓCITOS	48
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	48
5 RESULTADOS	49

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCÓOLICA (EHNA)	49
5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA OBESIDADE	56
5.3 INGESTÃO ALIMENTAR	60
5.4 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO	61
5.5 ANÁLISE DE SUBSTRATOS NO PLASMA	62
5.5.1 TRIGLICÉRIDES, GLICEMIA E COLESTEROL TOTAL	62
5.5.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ALT E AST	63
5.5.3 CONCENTRAÇÃO DE INSULINA PLASMÁTICA	64
5.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (IPITT)	65
5.7 DOSAGEM DO CONTEÚDO HEPÁTICO DE GLICOGÊNIO	66
5.8 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO FÍGADO	67
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE MRNAS ESPECÍFICOS EM FÍGADO	68
5.10 ENSAIOS DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA	71
5.10.1 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS SONDAS E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS	71
5.10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DOS FATORES TRANSCRICIONAIS AO PROMOTOR DO SLC2A2	75
5.11 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO FÍGADO	79
5.12. EFEITO DA FLORIZINA NA ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO	80
5.13. EFEITO DA FLORIZINA EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DOS ANIMAIS	82
5.14 ANÁLISE DE SUBSTRATOS PLASMÁTICOS	84
5.15 QUANTIDADE DE mRNAs ESPECÍFICOS NO FÍGADO	85
5.16 QUANTIDADE DAS PROTEÍNAS GLUT2, G6PASE E PEPCK NO FÍGADO	88
5.17 ENSAIOS DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA	89
5.18. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE	92
6 DISCUSSÃO	96
7 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA

O fígado é o órgão com maior diversidade de funções. A localização anatômica desse órgão condiz, entre outras funções, com uma importante contribuição para a homeostasia glicêmica. Este órgão está em contato direto com a circulação portal e a circulação sistêmica, recebe fluidos e moléculas provenientes do trato digestório (intestino delgado e grosso), do pâncreas e do baço, além do contato com o sangue da artéria hepática, proveniente da circulação sistêmica. Desta forma, o fígado é capaz de metabolizar compostos endógenos e exógenos (Boron, Boulpaep, 2009). Especificamente, os hepatócitos são essenciais na manutenção da glicemia, pois permitem o influxo e o efluxo de glicose (Weinhouse, 1962).

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) caracteriza-se pelo acúmulo de triglicerídeos no hepatócito (Browning, Horton 2004). Atualmente é considerada a mais comum desordem hepática no mundo ocidental (Farrell, Larter, 2006; Ludwig et al., 1997, 1980; Zafrani 2004;), e pode manifestar-se na forma de esteatose simples, progredir à EHNA (Esteato-hepatite Não Alcoólica) e finalmente evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular (Caldwell et al., 1999; Powell et al., 1990).

Ludwig et al. (1980) descreveram pela primeira vez a EHNA em pacientes que apresentavam alterações histológicas semelhantes às encontradas na hepatite alcoólica, contudo na ausência de álcool. Este distúrbio afeta aproximadamente 1-3% da população total, subindo para 20% nos obesos e 50% nos obesos mórbidos (Moscatiello et al., 2007). Esta afecção é caracterizada por desordem lipídica com esteatose macro (grandes gotas de gordura que ocupam todo o citoplasma e empurram o núcleo para um lado da célula) e/ou microvesicular (gotículas de gordura nos hepatócitos), inflamação e balonização hepatocelular (hepatócito tumefeito), podendo apresentar fibrose (Brunt, 2005). A EHNA é considerada componente hepático da síndrome metabólica, estando relacionada com obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Chitturi et al., 2002). Cerca de 10% dos pacientes com esteatose simples progridem para EHNA (Matteoni et al., 1999).

A teoria mais antiga para esta progressão é conhecida como “teoria dos 2 passos”, proposta por Day e James em 1998 (Johnson et al., 2008), e demonstrada na **Figura 1**.

O primeiro “passo” envolve acúmulo de gordura no hepatócito, o que está associado ao quadro de resistência à insulina e obesidade visceral, onde o aumento da lipólise no tecido adiposo aumenta o fornecimento de ácido graxo livre para o fígado; como consequência há infiltração e deposição de gordura (triglicerídeo) no hepatócito ocasionando a esteatose (Brunt, 2004). Além da resistência à insulina, o desenvolvimento da esteatose também pode estar envolvido com o excesso de gordura, principalmente a saturada (Johnson et al., 2008), e de glicose na dieta, ocasionando maior influxo de ácido graxo no hepatócito e aumento da lipogênese *de novo* (Diraison et al., 2003). O acúmulo de triglicérides no hepatócito favorece a resistência à insulina hepática. A insulina se liga ao seu receptor (RI) e ativa o resíduo tirosina quinase, assim, o IR fosforilado permitirá tanto a ligação quanto a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos proteicos intracelulares, como IRS, Shc e Cbl. A partir da fosforilação do IRS, passam a existir sítios de reconhecimento para moléculas que contenham domínios específicos SH2, como a subunidade regulatória da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), o que ativa esta enzima e a mobiliza para a membrana plasmática (Hanke et al., 2009). A mobilização da PI3K favorece sua ação em substratos lipídicos, em particular, o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) que, então, será fosforilado originando o PIP3 (Chang et al., 2004; Kanzaki et al., 2006). O PIP3 pode recrutar proteínas como a AKT/PKB (*protein kinase B*), pela interação com domínios específicos (domínio PH) (19). A AKT suprime a produção de glicose por dois mecanismos: a) reduz a expressão das enzimas gliconeogênicas por fosforilar e promover a exclusão nuclear da proteína FOXO1 (Paradis et al., 1998); e b) ativa a glicogênio sintase pela fosforilação e inativação da glicogênio sintase kinase 3 B (Cross et al., 1995). O excesso de diacilglicerol hepático ativa a PKC ϵ que está envolvida com a resistência insulínica hepática. A PKC ϵ transloca para a membrana plasmática, interage e inibe a atividade quinase do receptor de insulina, promovendo, portanto aumento na gliconeogênese e redução da glicogeniogênese hepáticas (Lan et al., 2002).

O segundo “passo” ocorre a partir do estabelecimento de estresse oxidativo, um fator importante para o desenvolvimento de inflamação (Day, James, 1998), e consequente evolução da esteatose para EHNA e fibrose (Leclercq et al., 2000; Madan et al., 2006; Oliveira et al., 2005; Yang et al., 2000). No metabolismo celular, o oxigênio é reduzido à água e, neste processo, os produtos intermediários são o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs possuem meia-vida muito curta, pois a presença de um elétron não pareado as faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar as EROs, ou ainda, quando existe produção excessiva de EROs. As EROs extraem os átomos de hidrogênio dos ácidos graxos, deixando-os altamente reativos. Isto cria uma cadeia de reações destrutivas conhecidas como peroxidação lipídica que causa danos à membrana e organelas dos hepatócitos (Benzie, 1996). Desta forma o excesso de ácidos graxos ao fígado pode promover, pela oxidação destes, o esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de EROs, bem como ativação de outras vias de oxidação lipídica (peroxissomal e microssomal) que aumentam mais ainda o estresse oxidativo hepático.

O estresse oxidativo envolve a ativação da via de sinalização do NFkB, o que está associado com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Friedman, Arthur, 1989). Um dos produtos finais da peroxidação dos lipídios é o malonaldeído, que ativa citocinas pró-inflamatórias como TNFA, IL8 e IL6 (Gressner, 1995), as quais estão envolvidas na ativação das células de Kupffer (Friedman, 2008), que contribuem para o aumento da inflamação durante a EHNA (Cai et al., 2005).

Por outro lado, mais recentemente (Tilg, Moschen, 2010), tem sido demonstrado que a inflamação pode anteceder a esteatose hepática. Na obesidade, a inflamação induzida por fatores oriundos do tecido adiposo e/ou do trato gastrointestinal, pode ser a primeira injúria do fígado. Em humanos obesos, a expressão de IL6 é 100 vezes maior no tecido adiposo visceral e subcutâneo quando comparado ao fígado, sugerindo que na obesidade severa, o tecido adiposo

é a principal fonte de IL6 e que a inflamação no adiposo precede a inflamação hepática (Sabio et al., 2008).

Figura 1 - Mecanismos da esteatose e esteato-hepatite não alcoólica. Uma dieta com grande quantidade de ácido graxo saturado e glicose pode causar um quadro de esteatose hepática, tanto pelo maior influxo de ácido graxo para o hepatócito quanto pelo aumento da lipogênese *de novo*. Ainda, pode-se observar um aumento do tecido adiposo visceral que é metabolicamente ativo, produz fatores pró-inflamatórios (TNF-α, IL6) e está associado com a redução da produção de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória. Estas citocinas estão envolvidas com o quadro de resistência à insulina, que promove um aumento da lipólise do adiposo visceral, aumentando o fluxo de ácidos graxos livres para a circulação e consequentemente para o fígado, favorecendo o acúmulo de gordura na forma de esteatose. Diante da esteatose, o fígado passa a oxidar ácidos graxos, levando à produção de EROs, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios. Finalmente, desenvolve-se um quadro de esteatose aliado à inflamação que caracteriza a esteato-hepatite não alcoólica.

1.2 SLC2A2/GLUT2 E FÍGADO

O *Slc2a2* (Solute Carrier 2A2) é um gene que foi identificado e clonado por rastreamento de biblioteca de cDNA (DNA complementar) de fígado de rato (Thorens et al., 1988). Este gene codifica a proteína transportadora de glicose GLUT2 (Glucose transporter 2), que é expressa em células com alto fluxo de glicose,

como enterócito, hepatócito, célula do túbulo proximal do néfron e célula B pancreática. Nessa última, permite o influxo de glicose proporcional à elevação da concentração extracelular do substrato, garantindo a secreção de insulina, também de forma proporcional. O GLUT2 é um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, sendo o membro da família de GLUTs que apresenta o maior K_m para a glicose, descrito como até ~40 mmol/L (Guillemain et al., 2000).

Para contribuir na manutenção da concentração de glicose circulante, o fígado realiza tanto influxo como efluxo de glicose através do GLUT2. Quando o nível de glicose sanguínea/extracelular tende a se elevar, como no período pós-prandial, a produção hepática de glicose reduz e a síntese de glicogênio aumenta em resposta à insulina, gerando gradiente de concentração a favor do influxo de glicose (Sher et al., 1993). No período pós-absortivo/jejum, a glicose plasmática/extracelular tende a baixar, e o hepatócito passa a produzir glicose (glicogenólise e gliconeogênese), gerando gradiente de concentração a favor do efluxo de glicose. Assim, o transportador de glicose GLUT2 exerce fundamental papel, permitindo o influxo da glicose no período pós-prandial e o efluxo deste substrato no período pós-absortivo e no jejum (Guillemain et al., 2000).

Na maioria das pessoas com intolerância à glicose ou diabetes tipo 2, há uma série de fatores de risco que comumente cursam juntos, constituindo a chamada Síndrome Metabólica (SM) (Powell et al., 2005). A EHNA tem sido incluída como um dos componentes da SM, especialmente quando a resistência insulínica for grave (Hamaguchi et al., 2005). De fato, aproximadamente 69 a 100% dos pacientes com EHNA são obesos e 1/3 são diabéticos (Ludwig et al., 1980), e tudo isso poderia induzir alteração de expressão do *Sl2a2/GLUT2*. Além disso, aumento na expressão do mRNA do *Sl2a2* já foi demonstrado em hepatócitos humanos HepG2 que desenvolvem acúmulo de triglicerídeos após cultura em alta concentração de ácido oleico, representando mais um fator predisponente à alteração de expressão do gene *Sl2a2* na EHNA (Okamoto et al., 2002).

Ainda, em ratos Zucker e Wistar obesos foi observado aumento do mRNA do *Slc2a2* hepático, quando comparados aos seus controles (Seino et al., 1992; Yamamoto et al., 1991), e em camundongos que se tornaram obesos após

alimentação com dieta hiperlipídica também foi descrito aumento do mRNA do *Slc2a2* hepático (Riu et al., 2003).

1.3 GLICOSE-6-FOSFATASE, GLICOCINASE E FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE

No fígado, a fosforilação e desfosforilação da glicose pela glicocinase (GK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), respectivamente, são etapas essenciais na captação e liberação de glicose realizadas através do GLUT2. Além disso, para a síntese *de novo* de glicose no hepatócito, é fundamental a participação da PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxicinase), enzima chave da gliconeogênese (Lehninger, 2007). O equilíbrio entre a atividade dessas enzimas, juntamente com o GLUT2, representam um importante controle para o influxo ou efluxo de glicose hepática (Clore et al., 2000; Efendic et al., 1988).

1.3.1 GLICOSE-6-FOSFATASE (G6PASE)

A glicose-6-fosfatase (codificada em murinos pelo gene *G6pc*), expressa no fígado e no rim, e catalisa a última reação bioquímica da gliconeogênese e da glicogenólise, retirando o fosfato da glicose-6-fosfato, gerando a glicose livre que é passível de ser exportada, através do GLUT2 para o extracelular. Essa enzima é, portanto, um ponto final obrigatório de controle da liberação de glicose (Gerin 2002; Sloop et al., 2007). Redução na atividade da G6Pase (por mutação no gene *G6PC*) é evidenciada na GSD-1a (Glycogen Storage Disease Type 1a), levando a graves anormalidades que incluem acúmulo de glicogênio hepático, hepatomegalia e hipoglicemia de jejum (Burchell et al., 1985; Seoane et al., 1997). Por outro lado, a indução do gene *G6pc* no hepatócito aumenta a liberação de glicose e diminui o estoque de glicogênio (Seoane et al., 1997).

A atividade G6Pase é aumentada em humanos e ratos com resistência à insulina ou *diabetes mellitus* (Burchell, Cain, 1985; Clore et al., 2000). Estudos realizados em animais diabéticos (Barzilai, 1993; Belfiore, 1974; Liu, 1994) e obesos

(Iizuka et al., 2006; Kreutner et al., 1975;) demonstraram aumento na atividade e expressão gênica da *G6pc*.

1.3.2 GLICOCINASE (GK)

Opostamente ao efeito da *G6Pase*, as hexocinases catalisam a fosforilação da glicose livre nas células, gerando a glicose-6-fosfato que tanto pode ser metabolizada na glicólise como polimerizada na glicogeniogênese (Lehninger, 2007). No fígado, é a isoforma 4 da hexocinase que se expressa, a qual é chamada de glicocinase (GK) e é codificada pelo gene *Gck*, e muitos estudos demonstram que a ativação da GK é passo limitante para a glicólise e síntese de glicogênio (O'Doherty et al., 1996; Seoane et al., 1996; Valera, Bosch, 1994), a partir da glicose captada do extracelular. Uma vez que a glicose seja fosforilada, reduz a concentração de glicose livre no hepatócito, determinando/mantendo gradiente de concentração favorável ao influxo do substrato. Os principais reguladores da expressão gênica da GK são insulina e glucagon, onde a insulina aumenta e o glucagon reduz a transcrição gênica, e este efeito parece não ser dependente de glicose (Haber, 1995; Liu, 1994).

A mutação no gene codificador da GK é responsável pelo MODY 2 (Maturity-onset Diabetes Mellitus of the Young Type 2), caracterizado por hiperglicemia leve e crônica, devido a uma pequena redução da resposta secretória das células beta pancreáticas à glicose (Hattersley et al., 1998; Owen, 2001), e a uma menor captação de glicose hepática (Gidh-Jain et al., 1993; Iynedjian, 1993). No diabetes, a expressão gênica e a atividade da GK são baixas, prejudicando o metabolismo hepático da glicose (Iynedjian 1993; Printz et al., 1993).

1.3.3 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE (PEPCK)

A produção de glicose hepática pode decorrer da glicogenólise e da gliconeogênese, nessa última ocorre a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicerol, lactato ou aminoácidos, e a enzima chave envolvida é a PEPCK (Lehninger, 2007; Reshef et al., 1970). Esta enzima catalisa descarboxilação e fosforilação do oxaloaceto para formar fosfoenolpiruvato, usando o GTP como doador do fosfato (Efendic et al., 1988). A PEPCK (codificada pelo gene *Pck1*) possui uma isoforma citosólica e uma isoforma mitocondrial, sendo que a forma citosólica representa mais de 95% da atividade enzimática em fígado e rim (Nordlie, Lardy 1963; Wiese et al., 1991).

Estudos realizados com animais diabéticos (Beale, 2004; Yang, 2005) e obesos (Beale, 2004; Way, 2001) já demonstraram aumento na expressão gênica e proteica da PEPCK. A insulina é importante inibidor da gliconeogênese, suprimindo a expressão do gene *Pck1* (Belfiore, 1974; Liu, 1994); contrariamente, o glucagon aumenta a expressão desta enzima durante o jejum (Dickens et al., 1998; Gabbay et al., 1996; Lange et al., 1994). Assim, em quadros de resistência à insulina a redução da inibição dessas enzimas contribui para aumentar a liberação de glicose hepática mediada pelo GLUT2, aumentando os níveis plasmáticos de glicose (Michael et al., 2000).

1.4 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTORS (HNFS) E EXPRESSÃO DO GENE SLC2A2

1.4.1 HNF1A

HNF1A e HNF1B, membros da subfamília HNF1 (Blumenfeld et al., 1991), têm um papel chave na expressão de muitos genes específicos do fígado durante a diferenciação e o desenvolvimento (Miura, Tanaka, 1993). O HNF1A foi inicialmente conhecido como um regulador transcricional específico do fígado (motivo de seu nome), mas depois foi encontrado em outros tecidos como rim, intestino e pâncreas (Blumenfeld et al., 1991). O HNF1A pode se homodimerizar ou heterodimerizar com o HNF1B (De Simone, Cortese, 1991; Frain et al., 1989;). O promotor do *HNF1A*

possui local de ligação para HNF4 e HNF3 (Gragnoli et al., 1997; Kuo et al., 1992; Stoffel, Duncan et al., 1997), e pode ser regulado positivamente por ambos HNFs (Duncan et al., 1998; Kuo et al., 1992; Tian, Schibler, 1991; Xanthopoulos et al., 1991).

No fígado, o HNF1A é necessário para a expressão do gene que codifica o GLUT2, assim como de outros genes como os que codificam a albumina, a aldolase B, a A1 antitripsina e o fibrinogênio (Ott et al., 1991; Wang et al., 2000). Mais recentemente, mutações heterozigóticas no gene codificador do *HNF1A* foram identificadas como causa do diabetes mellitus monogênico chamado MODY 3 (Maturity-onset Diabetes Mellitus of the Young Type 3) (Vaxillaire et al., 1995; Yamagata et al., 1996). Os pacientes afetados têm comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose, que se torna aparente antes dos 25 anos de idade. Isto evidencia a participação do HNF1A no controle de genes importantes para a homeostase glicêmica, e reforça a importância do HNF1A na secreção de insulina, processo diretamente dependente do GLUT2 (Gerich, 2010; Lazzaro et al., 1992; Vaxillaire et al., 1995;). Ainda, os pacientes com MODY3 apresentam deficiência na reabsorção renal de glicose devido redução na expressão do GLUT2 e SGLT2 causada por deficiência de HNF1-A (Isomaa et al., 1998). Já foi mostrada a interação direta deste fator transcricional na região promotora do *Slc2a2* (Cha et al., 2000), e mais recentemente nosso grupo demonstrou em rim (Freitas et al., 2009) e fígado (David-Silva et al., 2013) de animais diabéticos que o aumento da expressão do GLUT2, característico desta doença, envolve aumento da ligação do HNF1A na região promotora do *Slc2a2*. Assim, podemos observar a importante participação do HNF1A na homeostase glicêmica, participando da regulação da expressão do GLUT2.

Por outro lado, o HNF1A também está envolvido na repressão do gene *G6pase*. A ação inibitória da insulina sobre o gene *G6pase* envolve duas regiões A e B no promotor (Argaud et al., 1996; Ayala et al., 1999; Streeper et al., 1997); e o domínio A é sítio de ligação para HNF, sugerindo então um papel inibitório para esse fator transcricional (Streeper et al., 1998). Entretanto, outros estudos foram mais eficientes em demonstrar que o HNF1A é um ativador da expressão gênica da *G6pc*

(Lin et al., 1997; Pontoglio et al., 1996), o que foi reforçado pela demonstração de que camundongos knock-out para HNF1A apresentam redução do mRNA da *G6pc*.

1.4.2 HNF4A

O HNF4A, juntamente com o HNF4B e HNF4G, são membros da superfamília do receptor de hormônio esteróide (Sladek et al., 1990). Este fator transcricional liga-se ao DNA como homodímero e está localizado em fígado, intestino, rim e ilhota pancreática (Miquerol et al., 1994; Sladek et al., 1990). Em cultura primária de hepatócitos, a ativação da AMPK (Hardie, 2007; Leclerc et al., 2001) ou da PKA (Viollet et al., 1997) fosforila a proteína HNF4A, diminuindo a transcrição de genes alvos do HNF4A como o *Slc2a2*.

Segundo Stoffel (1997), o HNF4A é essencial para a regulação do *Slc2a2* em fígado, e estudo em células pancreáticas INS-1 revelou que a ausência de HNF4A afeta a expressão do gene *Slc2a2* na célula beta (Wang et al., 2000). O HNF4A é conhecido por ser um receptor órfão, mas apresenta papel importante na regulação de vários genes no fígado, e mutação no gene *HNF4a* causa o diabetes monogênico MODY 1 (Hattersley, 1998; Lindner et al., 1997; Yamagata et al., 1996).

Estudo em células HepG2 (Hirota et al., 2008) e fígado de camundongos (De Souza et al., 2010) relatou que o FOXO1 associa-se a HNF4A na ausência de insulina, inibindo desta maneira a transcrição da glicocinase, e ao mesmo tempo ativando a transcrição da *G6pc* e *Pck1*. Na presença de insulina, o FOXO1 é fosforilado pela insulina, desligando-se do HNF4A, o qual estará livre para ativar a transcrição do gene *Gck*. Outros estudos também já mostraram ativação da transcrição dos genes da *G6pc* e *Pck1* pelo HNF4A (Borgius et al., 2002; Roth et al., 2002; Yamagata et al., 2004).

1.4.3 HNF3B

HNF3A, HNF3B e HNF3G são codificados respectivamente pelos genes *Foxa* (Forkhead box A) 1, 2 e 3, (Lai et al., 1991; Shen et al., 2001), e ligam-se como monômeros na mesma sequência de DNA, mas com afinidades diferentes (McPherson et al., 1993; Shim et al., 1998). O gene *Foxa2* é o primeiro da família *Foxa* a ser ativado durante a embriogênese (Kaestner et al., 1993; Lai et al., 1991; Monaghan et al., 1993), e este fator transcricional (HNF3B) é necessário, no fígado, para a expressão do gene *Slc2a2* e outros como os da albumina, da transtirretina, da α 1-antitripsina (Costa et al., 1989; Lai et al., 1990). Ainda, camundongos knockout para o gene *Foxa2* morrem de hipoglicemia nas primeiras semanas de vida (Weinstein et al., 1994).

Já foi evidenciado que o HNF3B ativa a transcrição do gene *Slc2a2* em fígado de ratos (Cha et al., 2000), e o local de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* já foi demonstrado (Shim et al., 1998; Tomura et al., 1999). A super-expressão do gene *Slc2a2* é regulada pelo HNF3B (Freitas et al., 2009), que segundo Wolfrum et al. (2003) é inibido por insulina através da via de sinalização PI3K/Akt; o HNF3B uma vez fosforilado pela AKT, permanece inativado no citoplasma de hepatócitos, resultando na inibição da sua atividade transcricional.

Adicionalmente, o HNF3B desempenha papel importante na manutenção da homeostase glicêmica pela regulação da expressão gênica de enzimas da glicólise, gliconeogênese e glicogenólise no fígado e no rim, incluindo *Pck1* e *G6pc*, assim como pela regulação de genes que codificam várias enzimas do metabolismo lipídico (Hughes et al., 2003; Rausa et al., 2000). Ainda, os HNF4A e HNF3B são necessários para a expressão da *G6pc* e *Pck1* induzida por glicocorticóides (Vander Kooi et al., 2003, 2005; Wang et al., 1996).

Por fim, já se sabe que o HNF3B pode se ligar aos promotores do *Hnf1a* e *Hnf1b*, ativando a transcrição destes genes; o que sugere uma hierarquia entre os HNFs, na qual o HNF3B é o regulador principal (Duncan et al., 1997; Gragnoli et al., 1997; Kuo et al., 1992; Stoffel, Duncan, 1997)

Em conjunto, observa-se que os fatores transcricionais HNF1A, HNF4A e HNF3B altamente expressos em fígado, regulam genes importantes para o metabolismo da glicose, assim como o gene que codifica o transportador de glicose GLUT2, proteína chave para influxo/efluxo de glicose no hepatócito. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel desses fatores transcricionais na regulação da expressão do gene *Slc2a2* em fígado de animais com EHNA.

Também já foi demonstrado por nosso grupo, que em fígado e rim de animais diabéticos existe uma regulação do gene *Slc2a2* pelos HNF1A, HNF3B e HNF4A. Mais do que isso, demonstramos em fígado e rim que o tratamento com insulina durante seis dias, reduz o RNAm do *Slc2a2* e destes *Hnfs*, assim como a atividade de ligação destes HNFs ao promotor do *Slc2a2*, mostrando a participação do HNF1A, HNF3B e HNF4A na regulação deste gene (David-Silva et al., 2013; Freitas et al., 2009).

1.5 NFKB

Além do estresse oxidativo, a endotoxemia crônica presente principalmente na obesidade, está envolvida na progressão da esteatose para EHNA e fibrose. Na obesidade e na síndrome metabólica, as condições inflamatórias presentes conduzem a um processo inflamatório crônico (Das, 2002; Stumvoll, 2003). O tecido adiposo secreta citocinas como o IL6, IL8 e IL1B (Trayhurn, Wood, 2004), sendo que a atividade secretória pró-inflamatória do adipócito encontra-se elevada na obesidade (Hotamisligil et al., 1995). Desta forma, existe a evidência de que a obesidade venha a ser um estado de inflamação crônica subclínica, com expressão elevada de TNFA (Hotamisligil et al., 1993), IL6 (Yudkin et al., 1999; Pickup et al., 1997) e IL1 (Meier et al., 2002).

Além disso, TNFA, IL1 e IL6 estão envolvidas na resistência à insulina (Koivisto et al., 1989), fenômeno relacionado com a EHNA. Ainda, o estado inflamatório induzido por estas citocinas, é fator fundamental na progressão da esteatose hepática à EHNA e fibrose. Existem diferentes vias de ativação do NFKB, sendo a mais comum, a via induzida por estímulo pró-inflamatório mediado por

TNFA, IL1B e LPS (Baeuerle, 1991; Baud, Karin, 2001). Apesar de atuar sobre a resistência a insulina, a IL6, ao contrário de TNFA e IL1B, não induz a ativação do NFkB (Senn et al., 2003).

Em células em homeostase, o NFkB mantém-se no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio KB, chamadas inibidoras KB (IKB) (Zingarelli et al., 2003). Para ativar o NFkB, são necessários estímulos intracelulares e ou extracelulares, cujos ativadores podem ser produtos bacterianos (endotoxinas, peptídeo glicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (TNFA, interleucinas) ou mesmo hiperglicemia (Verma, 2004; Zingarelli et al., 2003). Já foi evidenciado que o NFkB está mais ativado em camundongos com obesidade, com hiperfagia genética (camundongo ob/ ob) e alimentados com dieta hiperlipídica (Cai et al., 2005).

A ativação do NFkB regula a expressão de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e RAGE. Muitos produtos dos genes regulados pelo NFkB também funcionam como seus próprios ativadores, tais como TNFA, IL1B e RAGE (DiDonato et al., 1997; Karin, 1999).

Em células B pancreáticas, o NFkB foi relatado como importante regulador da expressão do *Slc2a2*, contribuindo para a secreção de insulina estimulada por glicose (Norlin et al., 2005). Ainda, em células B pancreáticas, que expressam grande quantidade de IKBA (inibidor do NFkB), a expressão do GLUT2 foi reduzida em 80% em comparação ao grupo controle, evidenciando que a supressão da atividade do NFkB prejudica a expressão do GLUT2 (Norlin et al., 2005).

1.6 FLORIZINA

A florizina (1-Propanone, 1-[2-(.beta.-D-glucopyranosyloxy)- 4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4- hydroxyphenyl) pertence a família das dihidrocalconas, e é extraída de árvores frutíferas, especialmente a macieira (Ehrenkranz et al., 2004). A florizina é um ligante inespecífico dos transportadores de glicose acoplada a sódio (Sodium Glucose Cotransporter) SGLT1 e SGLT2, e no túbulo proximal renal é capaz de inibir a reabsorção de glicose causando glicosúria (Josephson et al., 1992).

Em ratos diabéticos, o tratamento intraperitoneal com florizina é capaz de induzir redução da glicemia de maneira tão eficiente quanto o tratamento com insulina. Este tratamento com florizina é uma importante estratégia para distinguir os efeitos decorrentes da redução glicêmica, per se, dos efeitos diretos da insulina (Freitas et al., 2007, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A EHNA caracteriza-se por acúmulo de gordura hepática, frequentemente associada à resistência à insulina, o que deve envolver aumento no efluxo hepático de glicose. Nesse processo, o transportador de glicose GLUT2 desempenha papel chave, além de contar com a participação de enzimas do metabolismo da glicose como a PEPCK, G6Pase e GK. No controle dos genes dessas proteínas os fatores transcricionais HNFs desempenham importante papel. Entretanto, a associação entre EHNA e aumento do efluxo de glicose, assim como a associação entre as alterações moleculares patognomônicas dessas duas condições, nunca foram clara e concomitante demonstradas.

Assim, é fundamental estabelecer a regulação do gene *Slc2a2* e dos genes relacionados ao metabolismo da glicose em fígado de animais com EHNA, assim como potenciais fatores reguladores, para que se estabeleçam mecanismos que possam controlar estas alterações, contribuindo para o controle da homeostasia glicêmica nessa condição.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações moleculares relacionadas ao metabolismo da glicose em fígado de camundongos obesos portadores de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), assim como determinar o provável envolvimento da hiperglicemia nessas alterações.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 INVESTIGAR EM CAMUNDONGOS OBESOS (TRATADOS COM MSG) ALIMENTADOS OU NÃO COM DIETA HIPERLIPÍDICA:

1. o *score* de esteatose e inflamação no fígado (histologia);
2. o conteúdo das citocinas inflamatórias (TNFA, IL6 e IL1B) no tecido hepático (PCR em tempo real e ELISA);
3. a expressão dos mRNAs: *Scd2a2*, *Hnf1a*, *Foxa2*, *Hnf4a*, *Tnfa*, *Il1b*, *I66* e *Rela* (PCR em tempo real);
4. a atividade de ligação dos fatores transcripcionais na região promotora do gene *Scd2a2* (EMSA);
5. a expressão do mRNA das enzimas *Gk*, *G6pc* e *Pck1* (PCR em tempo real).

3.2.2. INVESTIGAR EM CAMUNDONGOS OBESOS (MSG) O EFEITO DA REDUÇÃO DA GLICEMIA PELO TRATAMENTO COM FLORIZINA SOBRE AS ALTERAÇÕES OBSERVADAS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS MSG (GLUTAMATO MONOSSÓDICO)

Para acasalamento, foram utilizados camundongos CD1. Os animais foram acondicionados no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, nas seguintes condições: a) ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, luzes acesas às 7 h; b) temperatura ambiente 23 ± 2 °C; e c) oferta plena de água e ração para roedores, que tem como composição média 20,5% de proteína, 7% de gordura e 62,7% de carboidratos (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após período de adaptação os animais foram colocados para acasalamento.

Depois do acasalamento, as fêmeas prenhes ficaram em gaiolas individuais do 18º dia de gestação até o desmame das ninhadas (os filhotes foram desmamados no 20º dia, após o nascimento). Logo após o nascimento, os filhotes receberam injeção subcutânea de 2 mg/ g de peso corpóreo de glutamato monossódico (Sigma-Aldrich Chemicals, Steinhein, Germany), (grupo obeso - MSG) ou mesmo volume de 0,9% NaCl (grupo controle) durante 5 dias consecutivos; e, no sétimo dia, uma injeção de 4 mg/ g de peso (151). Após desmame, os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz controlado de 12 horas claro/12 horas escuro, e temperatura constante de 23 ± 2 °C, com livre acesso a água e alimento.

O protocolo experimental de obtenção e tratamento dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e está registrado sob o número 82, nas folhas 105 do livro 02 para uso de animais em experimentação.

4.2 TRATAMENTO COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Após o desmame, todos os animais receberam dieta padrão (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) durante uma semana. Após esse período, os animais (MSG e controle) passaram a receber dieta normolipídica (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil); adicionalmente, um grupo de animais MSG recebeu dieta hiperlipídica (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil). A composição de ambas as dietas está na Tabela 1. Desta forma, temos 3 grupos experimentais:

- Controle - dieta normolipídica
- MSG - dieta normolipídica
- MSG - dieta hiperlipídica

Tabela 1. Composição das dietas normolipídica e hiperlipídica.

Ingredientes	Dieta normolipídica	Dieta normolipídica	Dieta hiperlipídica	Dieta hiperlipídica
	(g)	(kcal)	(g)	(kcal)
Caseína	20,2	80,8	20,0	80,0
Sacarose	10,0	40,0	10,0	40,0
Amido de milho	39,7	158,8	11,55	46,2
Maltodextrina	13,05	52,2	13,2	52,8
Banha de porco	--	--	31,2	288
Óleo de soja	7,0	63,0	4,0	36
Celulose	5,0	0	5,0	0
Mix mineral	3,5	0	3,5	0
Mix vitamina	1	4,0	1,0	4,0
L-Cistina	0,3	1,2	0,3	1,2
Colina	0,25	0	0,25	0

Total	100	400	100	548,2
% de gordura	7,0	15,75	35,2	59,1

As dietas foram adquiridas de Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil.

Com o intuito de avaliar o estabelecimento da EHNA, os animais foram estudados em 4 grupos em diferentes períodos de ingestão das dietas: 4, 8, 12 e 16 semanas. Após cada período, o *score* de EHNA foi avaliado por histologia.

Para avaliar o grau de obesidade, foi utilizado o índice de Lee calculado pela raiz cúbica do peso corporal do animal (g), dividido pelo comprimento naso-anal (cm), e multiplicado por 100 [peso corporal (g)^{1/3}/ comprimento naso-anal (cm)] x 100 (Papa et al., 2002).

4.3 TRATAMENTO COM FLORIZINA

A florizina foi utilizada durante 6 dias nos animais MSG com 16 semanas de vida (grupo MSG-FL), em solução de 0,4 g/ml de propilenoglicol, na dose de 0,4 g/Kg de peso corporal (duas vezes ao dia), via subcutânea, de acordo com o previamente descrito (Freitas et al., 2007) como suficiente para normalizar a hiperglicemia de animais diabéticos.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Antes de cada experimento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50 mg/kg peso corpóreo). Apenas após a abolição dos reflexos corneanos e retirada da pata ao estímulo da dor que foram iniciados os procedimentos.

4.4.1 COLETA DE AMOSTRAS

Em animais anestesiados entre as 8:00 e 9:00, após 4 horas de privação alimentar, amostra de sangue foi coletada em tubos heparizados, e mantida a 4 °C até centrifugação (1000 g, 4 °C, 10 minutos). O plasma foi separado e armazenado a -80 °C para posterior dosagem de vários substratos Imediatamente após a coleta do sangue, amostras do fígado foram coletadas para análise histológica e de expressão proteica e gênica, sempre da mesma região.

4.4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (IPITT)

Os animais foram previamente submetidos a uma privação alimentar de 4h. As amostras de sangue foram coletadas, a partir de secção caudal, aos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 40 e 60 minutos após a sobrecarga intraperitoneal de insulina regular (Iolin, Biobrás, Montes Claros, Brasil), 0,75 U/Kg de peso corpóreo. A concentração de glicose sanguínea foi determinada com o auxílio de um glicosímetro (Accu-check, Roche, Basileia, Suíça). A constante de decaimento de glicose (Kitt) foi calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores glicêmicos obtidos de 10 a 50 minutos no teste (baseado em Bonora et al., 1989).

4.4.3 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO INTRAPERITONEAL (IPPTT)

O teste de tolerância ao piruvato foi realizado com a finalidade de estimar a capacidade de realizar gliconeogênese hepática a partir do substrato piruvato, em animais submetidos a um jejum de 16 horas. Conforme descrito por Miyake (2002), as amostras de sangue foram coletadas, a partir de secção caudal, aos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção intraperitoneal de piruvato (Sodium pyruvate, Sigma Aldrich, Missouri, EUA), 2 g/kg de peso corporal. A concentração de glicose sanguínea foi determinada com o auxílio de um glicosímetro (Accuchek, Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA). O piruvato foi utilizado porque é o metabólito intermediário comum nas diversas vias gliconeogênicas. O piruvato pode ser formado tanto a partir do lactato como também de aminoácidos ou glicerol.

4.4.4 DOSAGEM DO CONTEÚDO HEPÁTICO DE GLICOGÊNIO

Considerando que as deficiências de efluxo hepático de glicose acompanham-se, em geral, de acúmulo de glicogênio hepático, o que ainda envolve o balanço entre síntese e degradação desse substrato, avaliou-se o conteúdo de glicogênio hepático por método enzimático desenvolvido por Keppler and Decker (1974), que se baseia na hidrólise do glicogênio em glicose pela amiloglicosidase; a glicose resultante foi dosada por método enzimático-colorimétrico, com o kit de Glicose Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS NO PLASMA

A concentração de glicose plasmática (referente ao sangue coletado no momento do sacrifício) foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico, com o kit de Glicose Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil); a concentração de colesterol total plasmático, com o kit de Colesterol Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil); e atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), a alanina

aminotransferase (ALT) com os kits GOT e GPT (Laborlab, SP, Brasil) respectivamente.

A concentração de triglicerídeos foi avaliada em sangue total, por meio de fitas dosadoras de triglicerídeos, Accutrend GCT (Roche, Mannheim, Alemanha). Ainda no plasma foi avaliada a concentração de insulina plasmática por ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*- Millipore, Missouri, USA).

4.4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS – ELISA

As citocinas TNFA, IL1B e IL6 foram dosadas a partir de homogenato de fígado. Aproximadamente 100 mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em 1 ml de tampão de lise TX-100 (100mM de Tris-HCL pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100, 150mM de NaCl, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA). As dosagens foram feitas por ELISA, com o kit DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Tabela 2. Identificação do kit “DuoSet ELISA Development System”.

Citocina	Descrição
IL6	Mouse IL6 DuoSet
TNFA	Mouse TNFAlpha DuoSet
IL1B	Mouse IL1 beta/IL1F2 DuoSet

4.4.7 WESTERN BLOTTING

Amostras de fígado foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA ® (BRINKMAN) a 20.000 rpm, em tampão de homogeneização (Tris

10 mM; EDTA 1,0 mM; sacarose 250 mM), na proporção de 1:4 (peso: volume), e centrifugadas a 2.000 rpm, a 4 °C, e durante 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior análise. A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Duodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), utilizando o método desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin (1990). A eletroforese foi realizada em tampão Tris HCL 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3. Posteriormente, a transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), foi realizada em tampão Tris HCL 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo: 1) anti-GLUT2 (código: 07-1402, Milipore); 2) anti-G6Pase (código: ab-83690, Santa Cruz Biotechnology) ou 3) anti-PEPCK (código: ab-28455, Santa Cruz Biotechnology). As bandas foram reveladas por quimioluminescência e a membrana foi imediatamente exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham, Buckinghamshire, UK), durante 1 a 15 minutos. Para normalização dos resultados foi utilizada a beta-actina.

A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica (software Image Quant TL, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SW) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA). Após correção pela beta-actina, a média do grupo controle em cada membrana foi considerada como 100 e cada valor individual foi normalizado em relação à média dos controles. Os conteúdos de GLUT2, G6Pase e PEPCK, calculados com base nestes valores, foram expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ug).

4.4.8 PCR – TEMPO REAL

Fragmentos de cerca de 0,1 g dos tecidos foram congelados em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA total pela técnica do Trizol (GIBCO, Gaithersburg, USA), conforme instruções do fabricante. Um μ L da amostra

solubilizada de RNA total foi retirado e adicionado a 79µL de água DEPC para leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, PHARMACIA BIOTECH - Biochrom, Cambridge, UK), e avaliação da concentração de ácido nucléico e da pureza da amostra.

A reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA, foi feita a partir da adição, à 1 µg de RNA total da amostra, de 1 µL de ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, USA), 1 µL *primers* Random Primer (0,5 µg) (Life Technologies, USA), 1 µL nucleotídeos dNTP mix (0,5 mM) (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,4 µL MgCl₂ (3 mM) (Promega, USA), 4 uL de Improm-II 5XTM reaction buffer (1X) (Promega, USA) e água deionizada 0,01%, para volume final de 20 µL.

Após transcrição reversa, os cDNAs sintetizados foram utilizados para realização da PCR em tempo real utilizando-se o sistema Taqman (Invitrogen Life Technologies, USA). As sondas inventoriadas foram selecionadas de acordo com sequências disponíveis no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health (NIH)*.

Tabela 3. Identificação das sondas para PCR

Genes	Número de acesso	Tamanho do fragmento	Sonda Taqman
<i>Slc2a2</i>	NM_031197.2	61	Mm00446229_m1
<i>Hnf4a</i>	NM_008261	63	Mm01247712_m1
<i>Hnf1a</i>	NM_009327.3	134	Mm00493434_m1
<i>Foxa 2</i>	NM_010446.2	73	Mm01976556_s1
<i>Gapdh</i>	NM_008084.2	107	Mm99999915_g1
<i>G6pc</i>	NM_008061.3	116	Mm00839363_m1
<i>Gck</i>	NM_010292.4	69	Mm00439129_m1
<i>Pck1</i>	NM_011044.2	61	Mm01247058_m1
<i>Tnfa</i>	NM_013693.3	61	Mm00443260_g1
<i>Il1b</i>	NM_008361.3	90	Mm00434228_m1

<i>Ilg</i>	NM_031168.1	78	Mm00446190
<i>Rela</i>	NM_009045.4	67	Mm00501346_m1

A quantidade de cDNA para cada gene foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação. Para essa finalidade, foi utilizadas as diluições (1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) de cDNA de amostras usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct foi colocados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos foram detectados pelos equipamentos Step One Plus Instrument (Applied Biosystems, Forest City, CA, EUA). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene alvo foi registrado e comparado com o Ct do gene de referência (*Gapdh*), cuja estabilidade foi previamente confirmada.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para calcular a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno. Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt):

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}})$$

Com objetivo de avaliar a variação de expressão entre os grupos foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) que é calculado utilizando o Delta Ct da média dos controles, usando a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}})$$

Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados entre os grupos. A expressão é interpretada pelo aumento ou diminuição após o tratamento.

4.4.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY- EMSA) OU GEL DE RETARDO (GEL SHIFT)

Este ensaio foi utilizado especificamente para avaliar a ligação de fatores transcricionais ao promotor do gene *Slc2a2*. Consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear a uma sequência de nucleotídeos específica para cada fator de transcrição na região promotora do *Slc2a2*, sendo estas marcadas com ^{32}P .

O ensaio inicia com a extração das proteínas nucleares das amostras, baseado no descrito por Andrews e Faller (1991). As amostras de fígado foram pulverizados em nitrogênio líquido, utilizando-se suporte de cerâmica, colocadas em tubos de 1,5 ml, lavadas com 1 ml de tampão fosfato-salina gelado (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,27 mM; Na_2HPO_4 8,06 mM), e centrifugadas (1.000 g, 4 °C, 10 min). O precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de tampão de lise (HEPES-KOH pH 7,9 10 mM; MgCl_2 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5 µg/mL; aprotinina 15 µg/mL), e incubado em gelo por 10 min, seguido de agitação vigorosa por 30 s. Após centrifugação (12.000 g, 4 °C, 30 s), o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado em 100 µl de tampão de extração (HEPES-KOH pH 7,9, 20 mM; MgCl_2 1,5 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 0,2 mM; NaCl 420mM; Glicerol 25%; PMSF 0,2 mM; leupeptina 5 µg/ml; aprotinina 15 µg/ml), e incubado 20 minutos em gelo. O extrato foi centrifugado (12000 g, 4 °C, 2 min) e o sobrenadante recolhido. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad Laboratories, CA) e as amostras estocadas a -70 °C.

Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (com sequências específicas do promotor do *Slc2a2*) como sondas:

- HNF1A: 5' AGGGTGTATTGATTGGATTACC 3' (-125/ -103) (Cha et al., 2000)
- HNF3B: 5' GTGTATTGATTGG 3' (-120/ -107) (Cha et al., 2000)
- HNF4A: 5' CTATCTACTGAGAACTTTTCTG 3' (-717/ -694) (Bartoov-Shifman et al., 2002; Cheng et al., 2003)

- NFkB: 5'GTCACAGGGTTTGACTCGCTTAAG 3' (-858/ -834) (Furuya et al., 2012).

Vale ressaltar que as sondas HNF4A e NFkB foram desenhadas com base nas respectivas referências citadas acima, mas baseadas no promotor do *Slc2a2* de camundongo (Waeber, 1994).

As sondas foram obtidas a partir da incubação do oligonucleotídeo em 4 µl γ -³²P ATP (3Ci/mmol), numa solução contendo 1 µl de Tampão de reação (5 X), T₄ polimerase quinase (1U/µl), em 20 µl de volume de reação. Após incubação à 37 °C por 1 hora e meia, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina YM-3 (Millipore). A atividade de ligação da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 10⁵ cpm/µl.

A reação de ligação da sonda ao fator transcricional foi feita em um tubo de microcentrífuga contendo 6 µl de tampão de ligação 3X (HEPES 60 mM pH 7,6; glicerol 10%; KCl 150 mM; EDTA 0,6 mM); BSA 1,93 mg/ml; DTT 2,3 mM; Poly dIdc 0,25 µg/µL; 10 µg de proteína de extrato nuclear, sonda marcada (1µl) e água para 15 µl de volume final, durante 30 min em temperatura ambiente. O conteúdo total do meio de reação foi então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 4% [acrilamida/bisacrilamida (30,8/1)], não desnaturante, durante 3 horas a 170V. Ao final da corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um filtro de papel Whatman, seco a vácuo por 1 hora e exposto a filme RX (-70 °C). A fim de confirmar a especificidade da banda, foram realizados ensaios de competição onde oligonucleotídeo frio foi adicionado em excesso.

4.4.10 ENSAIO DE SUPER SHIFT (COMPETIÇÃO ESPECÍFICA)

Para confirmação da identidade do fator transcricional presente no complexo nuclear detectado foi realizado o ensaio de competição no qual anticorpos específicos contra os fatores transcricionais foram adicionados à reação. A identidade do fator transcricional é confirmada quando a adição do anticorpo retarda ainda mais a banda (supershift por ter aumentado o peso molecular do complexo), ou quando a banda desaparece/diminuiu (pelo fato da ligação do anticorpo interferir na ligação da sonda).

Os anti-corpos utilizados são: 1) anti-HNF1A (código: sc-6547, Santa Cruz Biotechnology), 2) anti-HNF3B (código: 07-633, Millipore), 3) anti-HNF4A (código: ab-41898, Santa Cruz Biotechnology), 4) NFkB (código: ab-7970-1, Santa Cruz Biotechnology).

4.4.11 ESTUDO HISTOLÓGICO

As amostras de fígado foram fixadas por imersão em solução fixadora de paraformaldeído 4% durante 24 horas. Em seguida o material foi desidratado em etanol 70%, diafanizado em xilol, infiltrado e incluído de modo a permitir a obtenção de cortes com espessura de 5 µm. Parte das amostras foram submetidas à coloração convencional em hematoxilina e eosina (HE) para estudo histológico.

Para avaliação histopatológica da esteato-hepatite não alcólica foi utilizada a classificação padronizada pelo “Pathology Committee of the NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) Clinical Research Network”, que designou um escore final definido pela soma dos graus de esteatose, inflamação lobular e balonização (**Tabela 4**). Os escores variam de 0 a 8; valores ≥ 5 indicam presença de EHNA, valores < 3 indicam ausência de EHNA, e os valores 3 e 4 são considerados como presença provável de EHNA. As análises foram realizadas em campos microscópicos com aumento de 20x.

Tabela 4. Escores para avaliação da EHNA

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Escore
<i>Esteatose</i>	<5% (dos hepatócitos)	5-33%	34-66 %	>66%	0-3
<i>Inflamação lobular</i>	0/	<2 focos	2-4 focos	>4 focos	0-3
<i>Balonização</i>	0	Pouca	Facilmente notada	-	0-2
<i>Somatório</i>					0-8

4.4.12. ESTEREOLOGIA DOS HEPATÓCITOS

A estereologia é um método quantitativo baseado em condições geométricas e estatísticas que permite a obtenção de estimativas de volume, superfícies e comprimento das estruturas de interesse. Os sistemas testes empregados na estereologia são constituídos de linhas, pontos e áreas pré-delimitados que permitem a contagem de estruturas. Este sistema é empregado para a obtenção de estimativas de variáveis estereológicas como a densidade de volume (Tschanz, 2011).

As imagens dos fígados obtidas em aumento de 60 x foram analisadas após sobreposição de área teste pelo programa Stepanizer. Assim, a deposição de gordura e a quantidade de hepatócitos foram contadas dentro de uma área conhecida, com auxílio de um sistema de 16 linhas e 32 pontos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. Múltiplas comparações serão realizadas por ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias seguida de *Bonferroni*. Quando apenas dois grupos foram comparados, o Teste “t” de Student foi utilizado. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

Todos os resultados que serão descritos estão apresentados em um quadro resumo ao final desse capítulo.

SEÇÃO 1 – EFEITO DA OBESIDADE E DO TRATAMENTO COM DIETA HIPERLIPÍDICA

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA (EHNA)

Com o intuito de avaliar o estabelecimento da EHNA, os animais foram avaliados após diferentes períodos de dieta (4, 8, 12 e 16 semanas), iniciadas uma semana após o desmame (4ª semana de vida).

Na **figura 2**, podemos observar imagens histológicas de fígado de camundongos controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, em todos os períodos (4, 8, 12 e 16 semanas).

Figura 2 - Análise histológica (HE – aumento 20X) de fígado de animais controle (C) e obesos (MSG), alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 4, 8, 12 e 16 semanas.

Para melhor análise do desenvolvimento da EHNA todos os períodos foram individualmente avaliados nas **figuras 3 a 6**.

Na **figura 3** observam-se resultados de 4 semanas de tratamento. Observa-se que animais MSG já apresentam balonização de hepatócitos, independentemente da dieta.

Figura 3 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA (B) para cada animal avaliado, e a média ± EPM do score de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 4 semanas. Valores são médias ± EPM de 2 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*.

Na **figura 4** observa-se que após 8 semanas de tratamento os animais MSG apresentam balonização dos hepatócitos e inflamação grau 1, independentemente da dieta. Nenhum animal apresentou alterações suficientes para diagnóstico de EHNA.

Figura 4 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA para cada animal avaliado (B) e a média ± EPM do score de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 8 semanas. Valores são médias ± EPM de 2 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*.

A **figura 5** mostra o efeito de 12 semanas de tratamento. Observa-se que os animais controles continuam com hepatócitos normais. Porém, os animais MSG possuem esteatose (grau 2 a 3), balonização dos hepatócitos (*grau 2*) e inflamação (*grau 0 a 2*); desta forma, no grupo MSG-DN 4 animais, dentre 5, têm EHNA, e no grupo MSG-DH 2 animais, dentre 6, têm. Porém, devido a uma ocorrência inversa de “provável EHNA” fez com que a média dos escores em cada grupo não fosse significativamente diferente.

Figura 5 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (**A**), o score de EHNA para cada animal avaliado (**B**) e a média ± EPM dos scores de EHNA (**C**) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM de 2 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. ** $P < 0,01$ vs C-DN, *** $P < 0,001$ vs C-DN.

Na **figura 6** verifica-se que o efeito de 16 semanas de tratamento. Os animais controles alimentados com dieta normolipídica ainda não apresentam EHNA, embora 4 animais já apresentem alguma alteração incipiente. Observa-se que 5 dentre 7 animais MSG-DN e 4 dentre 6 MSG-DH apresentam EHNA (scores 5 e 6); destacando que o escore médio entre os grupos MSG-DN e MSG-DH não variou significativamente.

Figura 6 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (A), o score de EHNA para cada animal avaliado (B) e a média $\pm$ EPM dos scores de EHNA (C) de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 8 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. *** $P < 0,001$ vs C-DN.

Em imagens mais detalhadas de um animal MSG-DH, podemos nitidamente observar os principais componentes da EHNA: macro-esteatose, micro-esteatose, balonização evidente e grande foco inflamatório (**figura 7**).

Figura 7 - As imagens mostram análise histológica de fígado (HE - aumento 40x) de animais MSG alimentados durante 16 semanas com dieta hiperlipídica: A) presença de foco inflamatório (setas pretas), macro-esteatose (seta vermelha), micro-esteatose (seta verde) e balonização (seta laranja); e B) foco inflamatório (setas pretas).

Destaca-se que os animais que receberam dieta durante 16 semanas apresentaram balonização de hepatócitos mais evidente. A classificação de balonização possui apenas dois graus, definidos pela pouca presença ou pela presença facilmente notada de hepatócitos balonizados, e assim essa classificação não nos permite diferenciar animais que possuem evidências maiores de balonização.

Resumimos essa análise destacando que animais obesos por MSG apresentam EHNA após 15 semanas de vida, o que persiste invariável até 19 semanas de vida. O tratamento dos animais MSG com dieta hiperlipídica não alterou significativamente o desenvolvimento/evolução da EHNA.

Assim, para prosseguimento do presente estudo, utilizaremos apenas animais com 16 semanas de tratamento (20 semanas de vida).

5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA OBESIDADE

A **figura 8** mostra camundongos controle e MSG após receberam 16 semanas de dieta. Observamos que a obesidade é evidente em ambos os animais tratados com MSG. A pelagem do animal que recebeu dieta hiperlipídica reflete o seu engorduramento, pelo contato com o *pelet* que possui alto teor de gordura.

Figura 8 - Vista dorsal de camundongos controle e MSG alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, durante 16 semanas. Camundongos controle normolipídica (A), camundongos MSG dieta normolipídica (B) e camundongo dieta hiperlipídica (C).

A **Figura 9** mostra a massa corporal no momento do desmame (**Figura 9 A**), e após 16 semanas de consumo das dietas (**Figura 9 B**). Podemos verificar que no desmame, os animais MSG, que serão designados para consumir DN ou DH, possuem peso corporal significativamente menor quando comparados aos animais controles (DN) ($P<0,001$), conforme esperado para esta condição. Após as 16 semanas de consumo das dietas, observa-se um maior peso dos animais MSG-DN e MSG-DH quando comparados ao grupo C-DN ($P<0,05$).

Figura 9 - Massa corporal no momento do desmame (A) e após 16 semanas de consumo das dietas(B), de animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH). Valores são médias $\pm$ EPM de 13 a 15 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN; *** $P<0,001$ vs C-DN.

Na **figura 10 A** observa-se o ganho de peso corporal dos animais ao final das 16 semanas tratamento, o que foi maior nos animais MSG-DN e MSG-DH quando comparados ao grupo C-DN ($P<0,001$). A **Figura 10 B** ilustra a evolução do ganho de peso corporal dos animais em cada período de tratamento. Até a oitava semana, os animais não apresentaram diferença de peso significativa. Porém a partir de 12 semanas, os animais MSG-DN e MSG-DH passaram a mostrar maior peso, quando comparados ao grupo C-DN ($P<0,001$).

Figura 10 - Delta de peso corporal após 16 semanas de tratamento (A) e evolução do peso corporal (B) dos animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH). **A:** ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B:** ANOVA de duas vias seguida de *Bonferroni*. Valores são médias $\pm$ EPM de 13 a 15 animais. *** $P<0,001$ vs C-DN.

A **Tabela 5** mostra comprimento naso-anal, índice de Lee e peso do tecido adiposo periepídidimo. Os animais MSG possuem comprimento naso-anal inferior aos controles ($P < 0,01$), e isto reflete de forma significativa no índice de Lee, o que corresponde ao IMC (índice de massa corporal) avaliado em humanos. Após 16 semanas de dieta, observamos que os animais MSG-DN apresentam índice de Lee e o peso do tecido adiposo periepídidimo significativamente maiores que os de animais C-DN ($P < 0,01$). O consumo de dieta hiperlipídica exacerbou a alteração desses parâmetros ($P < 0,01$ vs MSG-DN).

Tabela 5 - Parâmetros morfométricos dos grupos controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica, durante 16 semanas.

Parâmetro	C-DN	MSG-DN	MSG-DH
Comprimento naso-anal	11 ± 0,088	9,6 ± 0,187**	9,3 ± 0,133**
Índice de Lee	33,8 ± 0,352	37,1 ± 0,476**	39,5 ± 0,547 ^{§§}
Peso do adiposo (periepídidimo)	1,494 ± 0,087	2,10 ± 0,113**	2,70 ± 0,147 ^{§§}

** $P < 0,01$ vs C-DN; ^{§§} $P < 0,01$ vs MSG-DN e C-DN. Valores são médias ± EPM de 7 a 10 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*.

5.3 INGESTÃO ALIMENTAR

O gráfico abaixo mostra a ingestão de ração em gramas (**Figura 11 A**) e em kcal (**Figura 11 B**) dos animais controle e MSG. Podemos observar que os animais MSG alimentados com dieta hiperlipídica consomem menor quantidade de ração em gramas, quando comparados aos MSG-DN e C-DN ($P<0,001$), e os animais MSG-DN consomem menor quantidade de dieta que os C-DN ($P<0,001$). Por outro lado, a ingestão de ração em kcal (**Figura 11 B**) dos grupos controle e MSG revelou que animais MSG alimentados com DN consomem menos caloria que os C-DN ($P<0,05$); entretanto, animais MSG-DH apresentaram maior ($P<0,001$) ingestão calórica quando comparados aos MSG-DN, assemelhando ao consumo de C-DN.

Figura 11 - Ingestão diária média de ração, em gramas (A) e kcal (B), dos camundongos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 7 a 10 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN; *** $P<0,001$ vs C-DN; &&& $P<0,001$ vs MSG-DN; §§§ $P<0,001$ vs C-DN e MSG-DN.

5.4 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO

O peso do fígado, mostrado na **figura 12**, revela que a massa hepática aumenta em camundongos MSG, sejam tratados com dieta hiperlipídica ($P<0,01$) ou não ($P<0,05$).

Figura 12 - Peso do fígado dos camundongos dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 12 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN; ** $P<0,01$ vs C-DN.

5.5 ANÁLISE DE SUBSTRATOS NO PLASMA

5.5.1 TRIGLICÉRIDES, GLICEMIA E COLESTEROL TOTAL

A concentração de triglicérides (**figura 13 A**) foi maior nos animais MSG-DN e MSG-DH comparados aos C-DN ($P<0,01$). A **figura 13 B** mostra que a glicemia (privação alimentar de 4 horas, coleta de sangue entre 11 e 13 horas do dia) dos animais MSG-DN ($P<0,05$) e MSG-DH ($P<0,01$) é significativamente maior que a dos animais C-DN. Na **figura 13 C**, a concentração plasmática de colesterol total é maior nos animais MSG-DH, quando comparados aos demais ($P<0,01$).

Figura 13 - Concentração plasmática de triglicérides (**A**), glicose (**B**) e colesterol total (**C**) dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 12 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN; ** $P<0,01$ vs C-DN; §§ $P<0,01$ vs C-DN e MSG-DN.

5.5.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ALT E AST

A atividade das enzimas plasmáticas aspartato aminotransferase (AST, **figura 14 A**) e alanina aminotransferase (ALT, **figura 14 B**) foi significativamente maior nos grupos MSG, independentemente da dieta.

Figura 14 - Concentração de ALT (**A**) e AST (**B**) em animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P < 0,05$ vs C-DN; ** $P < 0,01$ vs C-DN; *** $P < 0,001$ vs C-DN.

Ainda, a razão entre as médias de ALT/AST maior que 1, que está associada com fibrose e progressão da doença hepática (**Tabela 6**) foi observada nos animais MSG independentemente da dieta.

Tabela 6 - Razão ALT/AST dos grupos controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica, durante 16 semanas.

C-DN	MSG-DN	MSG-DH
0,76 $\pm$ 0,099 (6)	1,05 $\pm$ 0,088 (6)	1,06 $\pm$ 0,080 (6)

5.5.3 CONCENTRAÇÃO DE INSULINA PLASMÁTICA

A **figura 15** mostra a insulina plasmática de animais controles e obesos (MSG) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH). Os animais obesos (MSG-DN e MSG-DH) se mostraram hiperinsulinêmicos ($P < 0,05$) independentemente da dieta.

Figura 15 - Valores de insulinemia dos grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 8 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P < 0,05$ vs C-DN.

5.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (IPITT)

A **figura 16** mostra os valores da constante de decaimento da glicose (kITT), obtidos a partir da análise da glicemia de 10 a 50 minutos durante o teste, realizado após 4 horas de privação alimentar. Observa-se que a constante de decaimento da glicose (kITT) dos camundongos obesos (MSG) foi significativamente menor, independentemente da dieta.

Figura 16 - Teste de Tolerância à Insulina **A**. Valores da constante de decaimento da glicose (Kitt). **B**. Curva de decaimento da glicose. O Teste de Tolerância à Insulina foi realizado em grupos controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 5 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. ** $P < 0,01$ vs C-DN; *** $P < 0,001$ vs C-DN.

5.7 DOSAGEM DO CONTEÚDO HEPÁTICO DE GLICOGÊNIO

O conteúdo hepático de glicogênio está mostrado na **Figura 17**. Observa-se que o conteúdo do substrato aumentou nos animais obesos MSG ($P<0,001$), independentemente da dieta.

Figura 17 - Conteúdo de glicogênio no fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 5 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*; *** $P<0,001$ vs C-DN.

5.8 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO FÍGADO

As citocinas IL1B, IL6 e TNFA foram dosadas em homogenato de fígado. Apenas a concentração de IL6 mostrou-se significativamente maior ($P < 0.01$) nos animais MSG independentemente da dieta.

Tabela 7 - Concentração hepática de citocinas pro-inflamatórias em animais controle e MSG, alimentados com dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica, durante 16 semanas.

	C-DN	MSG-DN	MSG-DH
IL1B	70,5 ± 5,93 (7)	70,7 ± 2,91 (8)	63,1 ± 4,805 (6)
(pg/mg)			
IL6	176,2 ± 6,52 (7)	235,2 ± 13,46 (6) ***	259,7 ± 5,297 (6) ***
(pg/mg)			
TNFA	270,2 ± 15,68 (7)	255,4 ± 13,99 (8)	256,1 ± 17,43 (7)
(pg/mg)			

Valores são médias ± EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*; *** $P < 0,001$ vs C-DN.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE MRNAS ESPECÍFICOS EM FÍGADO

A **figura 18** mostra que o conteúdo dos mRNAs *Slc2a2* (A) *G6pc* (B) e *Pck1* (C) aumentou ($P<0.05$ a $P<0.001$), enquanto o mRNA do gene *Gck* (D) reduziu ($P<0.01$) em fígado de animais MSG, independentemente da dieta.

Figura 18 - Quantificação dos mRNAs *Slc2a2* (A), *G6pc* (B), *Pck1* (C) e *Gck* (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN, ** $P<0,01$ vs C-DN, *** $P<0,001$ vs C-DN.

Na **figura 19** observa-se a análise dos mRNAs *Hnf4a* (A), *Foxa2* (B) e *Hnf1a* (C), que codificam fatores transcricionais potencialmente reguladores de genes relacionados ao metabolismo da glicose. Observa-se que houve aumento ($P<0.05$ a $P<0.001$) na expressão de todos esses genes no fígado de animais MSG, independentemente da dieta.

Figura 19 - Quantificação dos mRNAs *Hnf4a* (A), *Foxa2* (B) *Tnfa* (C) e *Hnf1a* (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 7 a 10 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C-DN, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs C-DN.

Finalmente, a **figura 20** mostra a expressão dos mRNAs *Il6* (A), *Il1b* (B), *Tnfa* (C) e *Rela* (D). Observou-se aumento na expressão dos mRNAs *Il6*, *Tnfa* e *Rela* ($P < 0,05$ a $P < 0,001$) no fígado de animais MSG, independentemente da dieta. Não houve alteração no mRNA *Il1b*.

Figura 20 - Quantificação dos mRNAs *Il6* (A), *Il1b* (B), *Tnfa* (C) e *Rela* (D) em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Valores são médias $\pm$ EPM de 5 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs C-DN.

5.10 ENSAIOS DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

5.10.1 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS SONDAS E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS

As sondas utilizadas foram primeiramente testadas quanto a sua especificidade de ligação em proteínas nucleares, adicionando-se excesso do oligonucleotídeo não marcado. As **figura 21 e 22** mostram a especificidade de ligação das sondas para HNFs. Ainda, a adição de anticorpo específicos, resultou em redução da banda, comprovando a presença dos fatores transcricionais no complexo molecular.

Figura 22 - Autoradiografia do ensaio de competição. Proteínas nucleares foram extraídas de fígado e incubadas com oligonucleotídeo radioativo contendo o domínio de ligação HNF3B (lanes 1-4), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lane 1: 0X, lane 2: 10X, lane 3: 20X) ou anti-corpo anti-HNF3B (lane 4).

A **Figura 23** mostra a sonda para NF κ B, e a adição de anticorpo específico também comprovou a especificidade da sonda.

Figura 23 - Autoradiografia do ensaio de competição. Proteínas nucleares foram extraídas de fígado e incubadas com oligonucleotídeo radioativo contendo o domínio de ligação do NF κ B (lanes 1-10), com adição do respectivo oligonucleotídeo não marcado em excesso (lane 1, 6 e 9: 0X, lane 2 e 7: 10X, lane 3 e 8: 50X, lane 4: 100X) ou anti-corpo (lane 5 e 10).

5.10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DOS FATORES TRANSCRICIONAIS AO PROMOTOR DO SLC2A2

A **figura 24** mostra que a atividade de ligação do HNF1A aumentou nos animais MSG ($P<0,01$ a $P<0,001$), independentemente da dieta.

Figura 24 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Os valores de densidade óptica do HNF1A foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média $\pm$ EPM de 6 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2*. ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs C-DN.

A **figura 25** mostra que a atividade de ligação do HNF4A aumentou nos animais MSG ($P<0,01$ e $P<0,001$), independentemente da dieta.

Figura 25 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Os valores de densidade óptica do HNF4A foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média $\pm$ EPM de 8 a 11 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2*. ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs C-DN.

A **figura 26** mostra que a atividade de ligação do HNF3B aumentou nos animais MSG ($P<0,05$ e $P<0,01$), independentemente da dieta.

Figura 26 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Os valores de densidade óptica do HNF3B foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média $\pm$ EPM de 3 a 5 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2*. * $P<0,05$ vs e ** $P<0,001$ vs C-DN.

A **figura 27** mostra que a atividade de ligação do NFKB aumentou nos animais MSG ($P<0,01$ e $P<0,001$), independentemente da dieta.

Figura 27 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do NFKB no promotor do *Slc2a2* em fígado de animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Os valores de densidade óptica do NFKB foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média $\pm$ EPM de 3 a 5 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do NFKB no promotor do *Slc2a2*. ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs C-DN.

5.11 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO FÍGADO

A **figura 28** mostra que a quantidade das proteínas GLUT2 (A) G6Pase (B) e PEPCK (C) aumentou ($P<0.05$ a $P<0.10$) em fígado de animais MSG, independentemente da dieta.

Figura 28 - I. Imagem representativa das proteínas avaliadas. II. Quantificação da análise da proteína GLUT2 (A), G6PASE (B) e PEPCK (C) no fígado dos animais controle ou MSG, alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (DH), durante 16 semanas. Os valores de densidade de cada proteína foram corrigidos pelos da respectiva B-actina, e normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,1$ vs C-DN; ** $P<0,01$ vs C-DN.

SEÇÃO 2 - TRATAMENTO COM FLORIZINA

A florizina é um inibidor dos co-transportadores de sódio-glicose, que inibe a reabsorção renal de glicose, aumentando a excreção urinária de glicose e reduzindo a glicemia. Este tratamento foi empregado com o objetivo de determinar a participação da alteração da homeostasia da glicose nas alterações que acompanharam a EHNA. Considerando que a dieta hiperlipídica não alterou os efeitos induzidos pela obesidade MSG, esse tratamento foi aplicado apenas nos animais MSG-ND durante 7 dias, antes de completar as 16 semanas de acompanhamento (grupo MSG-FL).

Desta forma, 3 grupos foram estudados: controle (C), MSG que recebeu dieta normolipídica (MSG) e MSG que recebeu dieta normolipídica e foi tratado com florizina (MSG-FL).

5.12. EFEITO DA FLORIZINA NA ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

A **figura 29** mostra cortes histológicos de fígado dos camundongos controle, MSG e MSG-FL. A Tabela (dentro da figura) mostra a quantificação da EHNA tratados com florizina. Observa-se que enquanto no grupo MSG temos 4 animais com EHNA e 1 animal com quadro provável de EHNA, no grupo MSG-FL nenhum animal apresentou score para EHNA, todos apresentando o score mínimo de quadro provável de EHNA.

Figura 29 - A figura mostra a análise histológica (HE - aumento 20x) de fígado (**A**), o score de EHNA para cada animal avaliado (**B**) e a média ± EPM dos scores de EHNA (**C**) de animais controle, MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias ± EPM de 4 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. *** $P < 0,001$ vs C-DN; §§ $P < 0,01$ vs C-DN e MSG-DN.

A **figura 30** mostra a análise de esterológica feita nos hepatócitos, que revela que o volume de tecido hepático ocupado por hepatócitos é semelhante entre os grupos estudados (33 A), porém o volume de tecido hepático ocupado por gordura é significativamente maior nos animais MSG ($P<0,001$), tanto em relação aos C como aos MSG-FL.

Figura 30 - Estereologia do fígado de animais controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **A.** Volume de tecido hepático ocupado pelos hepatócitos. **B.** Volume de tecido hepático ocupado por gordura. Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. $\Delta\Delta\Delta P<0,001$ vs C e MSG-FL.

5.13 EFEITO DA FLORIZINA EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DOS ANIMAIS

A **tabela 8** mostra que o tratamento com florizina não foi capaz de alterar os indicativos de obesidade (peso corporal e índice de Lee) dos animais MSG.

Tabela 8 - Comprimento naso-anal, índice de Lee e peso corporal dos animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL).

Parâmetro	C	MSG	MSG-FL
<i>Comprimento naso-anal</i>	11 $\pm$ 0,0882	9,6 $\pm$ 0,1871***	9,4 $\pm$ 0,133***
<i>Índice de Lee</i>	33,8 $\pm$ 0,3524	37,1 $\pm$ 0,4760***	36,9 $\pm$ 0,3116***
<i>Peso corporal final</i>	44,85 $\pm$ 1,454	51,25 $\pm$ 1,799*	50,86 $\pm$ 1,595*

Valores são médias $\pm$ EPM de 7 a 10 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. * $P<0,05$ vs C e *** $P<0,001$ vs C.

Diferentemente, observa-se na **figura 31** que o tratamento com florizina reverteu o aumento de peso do fígado observado nos animais obesos MSG ($P<0.01$).

Figura 31 - Peso do fígado dos animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 11 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. ^{ΔΔ} $P<0,01$ vs C e MSG-FL.

5.14 ANÁLISE DE SUBSTRATOS PLASMÁTICOS

A **figura 32** mostra que o tratamento com florizina restaurou a concentração plasmática de triglicerídeos (A) e de glicose (B). Nenhuma alteração significativa foi observada na concentração de colesterol (Figura 32 C).

Figura 32 - Concentração plasmática de triglicérides (A), glicose (B) e colesterol total (C) dos animais dos grupos controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 12 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. $\Delta P < 0,05$ vs C; $\Delta\Delta\Delta P < 0,001$ vs C e MSG-FL.

5.15 QUANTIDADE DE mRNAs ESPECÍFICOS NO FÍGADO

A **figura 33** mostra que o aumento induzido pela obesidade nos mRNAs *Slc2a2* (A), *G6pc* (B) e *Pck1* (C) foi revertido pelo tratamento com florizina. Da mesma forma, a florizina reverteu a redução observada no mRNA *Gck* (35 D).

Figura 33 - Quantificação dos mRNAs *Slc2a2* (A), *G6pc* (B), *Pck1* (C) e *Gck* (D) em fígado de animais controle, MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. ^Δ $P < 0,1$ vs C e MSG-FL; ^{ΔΔ} $P < 0,01$ vs C e MSG-FL.

Ao analisar os fatores transcricionais reguladores de genes do metabolismo observa-se (**figura 34**) que os mRNAs *Hnf4a* (A), *Foxa2* (B) e *Hnf1a* (C) reduziram significativamente ($P < 0.05$) em resposta ao tratamento com florizina, retornando a valores semelhantes aos observados em animais controles.

Figura 34 - Quantificação do mRNA do *Hnf4a* (A) *Foxa2* (B) e *Hnf1a* (C) em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. ^Δ $P < 0,05$ vs C e MSG-FL.

A **figura 35** mostra a análise dos mRNAs *Il6*, *Il1b* (B) *Tnfa* (C) e *Rela* (D). Mais uma vez não foram observadas alterações significativas no mRNA *Il1b*. Em relação ao aumento dos mRNAs *Il6*, *Tnfa* e *Rela* observado nos animais MSG ($P<0.05$ a $P<0,001$), nenhuma alteração importante foi observada em resposta ao tratamento com florizina.

Figura 35 - Quantificação dos mRNAs *Il6* (A), *Il1b* (B), *Tnfa* (C) e *Rela* (D) em fígado e animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 5 a 9 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*; * $P<0,05$ vs C; ** $P<0,01$ vs C e *** $P<0,001$ vs C.

5.16 QUANTIDADE DAS PROTEÍNAS GLUT2, G6PASE E PEPCK NO FÍGADO

A **figura 36** mostra que a quantidade das proteína GLUT2, G6Pase e PEPCK, aumentada no fígado de animais obesos MSG, reduziu significativamente ($P<0.01$) em resposta ao tratamento com florizina, retornando aos valores observados nos animais controles.

Figura 36 - I. Imagem representativa das proteínas avaliadas. II. Quantificação da análise da proteína GLUT2 (**A**), G6PASE (**B**) e PEPCK (**C**) no fígado dos animais controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Os valores de densidade do GLUT2 foram corrigidos pelos da respectiva B-actina, e normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são médias $\pm$ EPM de 6 a 11 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. $\Delta\Delta P<0,01$ vs C e MSG-FL.

5.17 ENSAIOS DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

As **figuras 37, 38 e 39** mostram a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A, HNF3B e HNF4A do gene do *Slc2a2*, respectivamente. Pode-se verificar que os aumentos observados nos animais obesos MSG foram completamente revertidos ($P < 0.05$) pelo tratamento com florizina.

Figura 37 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Os valores de densidade óptica do HNF1A foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média ± EPM de 5 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF1A no promotor do *Slc2a2*.
^{ΔΔ} $P < 0,01$ vs C e MSG-FL.

Figura 38 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Os valores de densidade óptica do HNF3B foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média ± EPM de 5 a 6 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2*. ^Δ $P < 0,05$ vs C e MSG-FL.

Figura 39 - A. Quantificação da atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2* em fígado dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). Os valores de densidade óptica do HNF4A foram normalizados considerando-se o grupo C-DN como 100. Valores são média $\pm$ EPM de 5 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. **B.** Imagem representativa da ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do HNF4A no promotor do *Slc2a2*. ^{ΔΔ} $P < 0,01$ vs C e MSG-FL.

5.18. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE

A **figura 40** mostra que o conteúdo hepático de glicogênio, aumentado na obesidade ($P<0,001$), reduziu completamente em resposta ao tratamento com florizina ($P<0,001$).

Figura 40 - Conteúdo de glicogênio no fígado de animais controle (C), obesos (MSG) e obesos tratados com florizina (MSG-FL). Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 5 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*; ^{ΔΔΔ} $P<0,001$ vs C e MSG-FL.

Finalmente, visando avaliar o efluxo hepático de glicose in vivo, realizou-se o teste do piruvato. A **figura 41** mostra que os animais obesos (MSG) apresentam maior produção de glicose em resposta à injeção do piruvato (gliconeogênese) quando comparados aos grupos C ($P<0,001$), o que foi revertido pelo tratamento com florizina.

Figura 41 - Teste de tolerância ao piruvato para verificar os níveis de gliconeogênese hepática dos grupos controle, controle (C), MSG e MSG tratados com florizina (MSG-FL). **A.** Curva de glicemia obtida pelo teste. **B.** Área sob a curva referente ao teste. Valores são médias $\pm$ EPM de 4 a 7 animais, ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls*. $\Delta\Delta\Delta P<0,001$ vs C e MSG-FL.

Abaixo, apresentamos um quadro resumo com os resultados que acompanharam a EHNA. O efeito da obesidade (MSG) é sempre comparado ao observado em camundongos controles; os efeitos da dieta hiperlipídica e do tratamento com florizina são sempre comparados ao observado em camundongos MSG.

Quadro 1. Alterações que acompanham a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) em camundongos obesos (MSG) tratados com dieta hiperlipídica (DH) ou florizina (FL).

Parâmetro	MSG	MSG + DH	MSG + FL
Score de EHNA	4,8	5,2	3,0 #
Peso do fígado	↑	-	↓
Área fígado ocupada por gordura	↑	ND	↓
Peso corporal	↑	-	-
Índice de Lee	↑	—	-
Ingestão calórica	↓	↑ *	ND
Colesterol plasmático	-	↑ *	-
Triglicéride plasmático	↑	-	↓
AST e ALT plasmáticas	↑	-	ND
ALT plasmática	↑	-	ND
Glicose plasmática	↑	-	↓
Insulina plasmática	↑	-	ND
Decaimento da glicose no ITT	↓	-	ND
Glicogênio hepático	↑	-	↓
Secreção glicose no teste do piruvato	↑	ND	↓
IL1B e TNFA hepáticos	-	-	ND
IL6 hepática	↑	-	ND
GLUT2, G6Pase e PEPCK no fígado	↑	-	↓
mRNAs <i>Slc2a2</i> , <i>G6pc</i> e <i>Pck1</i>	↑	-	↓

mRNA <i>Gck</i>	↓	-	↑
mRNAs <i>Il6</i> , <i>Tnfa</i> e <i>Rela</i>	↑	-	-
mRNA <i>Il1b</i>	-	-	-
mRNAs <i>Hnf4a</i> , <i>Foxa2</i> e <i>Hnf1a</i>	↑	-	↓
Ligação de HNF4A, HNF3B e HNF1A	↑	-	↓
Ligação do NFκB	↑	-	ND

As alterações em obesos (MSG) são em relação aos controles; as alterações de 16 semanas de dieta hiperlipídica (DH) são em relação aos obesos; as alterações de 1 semana de florizina são em relação aos obesos. ND: não determinado; *: diferente também em relação ao controle; #: P<0.001 vs MSG, Student t test.

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar alterações no metabolismo hepático da glicose, que acompanhassem a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) induzida pela obesidade, visando contribuir para o conhecimento da fisiopatologia hepática de indivíduos obesos portadores de resistência insulínica e/ou EHNA. Por isso, dois importantes pontos precisam ser inicialmente comentados.

Primeiro, o tratamento com dieta hiperlipídica (DH) foi proposto como uma alternativa de determinar e/ou exacerbar o desenvolvimento da EHNA, caso o modelo experimental de obesidade utilizado não fosse suficiente para tal. Assim, a DH não foi objetivo de estudo, mas sim ferramenta experimental, razão pela qual não o foi oferecida a camundongos não obesos. De fato, o efeito da dieta hiperlipídica na doença hepática tem sido bastante estudado (a busca pelos termos “high fat diet and liver disease” revela no PubMed 3809 ocorrências), e recentemente foi detalhadamente investigado em camundongos (van der Heijden et al., 2015).

Segundo, não foi objetivo do presente estudo determinar relações causa-efeito entre as alterações no metabolismo hepático da glicose e o desenvolvimento da EHNA. Para tal, o desenho experimental deveria ser completamente distinto, envolvendo, no mínimo, uma cuidadosa evolução temporal de todas as alterações.

O glutamato monossódico (MSG), administrado em altas doses no período neonatal, induz um quadro de obesidade conhecido há mais de meio século MSG (Blood et al., 1969). Essa obesidade decorre de lesões no núcleo arqueado e em partes do hipotálamo ventro-medial (Besancon et al., 2008; Coyle et al., 1981), que determinam alterações variáveis de alguns eixos neuroendócrinos (Himms-Hagen, 1989; Lorden, Caudle, 1986; Maiter et al., 1991; Macho et al., 2000), à semelhança do que se pode observar em humanos obesos. É importante ressaltar que a obesidade MSG também induz reduzida atividade termogênica do tecido adiposo marrom, o que tem sido relacionado à redução no tônus simpático local (Saito et al., 1985), e considerado principal fator indutor da obesidade. Assim, um reduzido gasto energético está envolvido no acúmulo de gordura (Blood et al., 1969; Morris et al., 1985; Tokuyama et al., 1986), caracterizando um quadro de obesidade independente de aumento na ingestão calórica.

Nos últimos 20 anos, ficou bem caracterizado, em camundongos, que a obesidade MSG pode evoluir para um quadro de resistência à insulina grave com hiperinsulinemia e valores médios de glicemia basal na ordem de 180 a 190 mg/dL (Machado et al., 1994; Papa et al., 1997), caracterizando um diabetes mellitus tipo 2. Além disso, na obesidade MSG, já foi demonstrado um aumento na atividade inflamatória tanto local (tecido adiposo) como sistêmica (plasma) (Furuya et al., 2010), também reproduzindo características da obesidade e do DM2.

Conforme esperado, os animais MSG apresentaram um menor crescimento, com maior acúmulo de massa adiposa, o que se refletiu em obesidade. Apesar de mostrarem peso corporal menor que o dos controles na 4ª semana de vida, com a evolução o peso corporal excedeu o dos animais controles (detectado na 16ª semana de vida), conforme já foi amplamente demonstrado por nosso grupo (Papa, 2002; Furuya et al., 2010). Ainda, a obesidade foi reforçada pela observação de maior índice de Lee e maior massa adiposa, tudo independente da dieta hiperlipídica.

O consumo de alimento, em caloria, foi menor nos animais MSG, refletindo a conhecida hipofagia desse modelo, conforme discutido acima. Entretanto, a ingestão calórica dos animais MSG-DH foi maior que a dos animais MSG-DN, devido a maior densidade calórica da dieta (Bell et al., 1997; Herberg et al., 1974), fato esse que induziu pequena exacerbação na obesidade (maior índice de Lee e massa adiposa periepididimal).

Para avaliação do desenvolvimento da EHNA, analisou-se o fígado de animais MSG com 8, 12, 16 e 20 semanas de vida, tratados ou não com DH desde a 4ª semana de vida. Utilizaram-se os parâmetros propostos para determinação de EHNA, que avaliam a presença de esteatose, inflamação lobular e balonização. Observou-se que o desenvolvimento da obesidade evoluiu com o aparecimento de alterações hepáticas progressivas, e a presença de EHNA (escore ≥ 5) já foi predominante nos animais de 16 semanas de vida (12 semanas de dieta), o que não se exacerbou nos animais de 20 semanas de vida (16 semanas de dieta). Destaca-se que esta evolução foi independente da ingestão de dieta hiperlipídica, com médias de escores semelhantes entre MSG-DN e MSG-DH em cada etapa, indicando que o fator etiológico preponderante foi a obesidade MSG, apesar da hipofagia. Semelhantemente, já foi demonstrado quadro de EHNA em

camundongos MSG com 24 (Nakanishi et al., 2008) e 54 (Sasaki et al., 2009) semanas de idade.

Foi bastante interessante a observação de que a dieta hiperlipídica não foi capaz de exacerbar o efeito da obesidade (hipofágica) sobre o desenvolvimento da EHNA. A EHNA é uma doença inflamatória com acúmulo de gordura nos hepatócitos (McCullough, 2006), o que pode decorrer de aumento da ingestão de gordura (dieta hiperlipídica) e/ou de aumento da lipólise no tecido adiposo (obesidade + resistência à insulina) (Brunt 2005; Diraison et al., 2003; Johnson et al., 2008). Em uma investigação sobre o desenvolvimento de inflamação em camundongos normais (C57BL/6j) suplementados com dieta hiperlipídica, foi demonstrado que a inflamação no tecido adiposo antecedeu claramente o desenvolvimento da inflamação hepática e o aparecimento de escore ≥ 5 para EHNA (van der Hijden et al., 2015). Nesse estudo, a inflamação hepática antecedeu a própria esteatose, contrariando a “teoria dos 2 passos” que propõe primeiro o acúmulo de gordura e subsequentemente a inflamação (Johnson et al., 2008). Adicionalmente, em humanos obesos, já foi demonstrado que a expressão de IL6 é 100 vezes maior no tecido adiposo que em fígado (Sabio et al., 2008), reforçando o papel do tecido adiposo, e permitindo a hipótese de que a inflamação possa anteceder a esteatose no fígado (Tilg, Moschen, 2010).

Essas observações ressaltam a importância do desenvolvimento da massa adiposa para o desenvolvimento/evolução da EHNA, e contribuem para explicar porque nos animais obesos MSG, que desenvolvem intensa atividade inflamatória no tecido adiposo (Furuya et al., 2010), a oferta de dieta hiperlipídica não alterou de forma significativa o desenvolvimento da EHNA.

Por outro lado, em uma análise mais detalhada, nos animais MSG-DH de 12 e 16 semanas de vida, a quantidade de hepatócitos balonizados foi visivelmente maior que nos animais MSG-DN. Entretanto, nos critérios de avaliação de EHNA (Brunt et al., 2004, 2005), não se gradua a % de hepatócitos balonizados, apenas avalia-se “pouca presença” (grau 1) ou “presença facilmente notada” (grau 2). Desta forma, não é possível classificar um grau maior de balonização nos animais MSG-DH, o que poderia, talvez, refletir-se em maior escore para EHNA.

Em suma, observou-se que animais obesos MSG de 20 semanas de idade, alimentados ou não com dieta hiperlipídica durante 16 semanas, desenvolveram todos os componentes da EHNA (Farrell, Larter 2006; Ludwig et al., 1980), incluindo focos inflamatórios. A partir desses resultados, determinamos a continuidade da investigação, focada no metabolismo da glicose, apenas em animais de 20 semanas de idade, o que discutiremos a seguir.

Tanto a obesidade quanto o consumo de dieta hiperlipídica podem induzir alterações na sensibilidade insulínica, com repercussões na homeostasia glicêmica, e por isso imaginou-se que a associação de ambas as injúrias poderia exacerbar as alterações do metabolismo da glicose. Nesse sentido, observou-se nos animais obesos a presença de resistência insulínica grave (menor decaimento da glicose durante teste de tolerância à insulina, hiperinsulinemia e hiperglicemia), independentemente da dieta. Mais do que isto, a média de glicemia desses animais alcançou 300 mg/dL, o que foi avaliado após 4 horas de privação alimentar. Isso é suficiente para caracterizar um estado de diabetes mellitus tipo 2, conforme já foi demonstrado em camundongos MSG (Machado et al., 1993, 1994, Papa et al., 1997). Não se pode excluir que, mais tarde, estes animais desenvolvam exaustão de células B pancreáticas, e, conseqüentemente, hipoinsulinemia, agravando o diabetes (Muoio, Newgard, 2008). Além disso, os animais MSG desenvolveram hipertrigliceridemia, mais um indicador de resistência insulínica (Parhofer et al., 2015), que já foi descrito em camundongos MSG de 23 semanas de vida (Furuya et al., 2010).

Além das alterações morfológicas características da EHNA já comentadas, em animais MSG-DN, observou-se aumento do volume hepático ocupado por gordura (na análise estereológica) e aumento da massa hepática total, o que reitera a esteatose e revela a hepatomegalia. Adicionalmente, o comprometimento funcional do fígado envolveu elevação das enzimas ALT e AST no plasma dos animais MSG, independentemente da dieta, o que é uma anormalidade laboratorial frequente em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), incluindo a EHNA (Ângulo, 2002). Os indivíduos com DHGNA podem apresentar concentrações 1 a 4 vezes maiores que o normal, embora existam aqueles que apresentam níveis normais de transaminases. Ainda, em nosso estudo, os animais MSG (DN e DH) mostraram a razão ALT/ AST maior que 1, o que, segundo estudos em animais e

humanos, associa-se a fibrose e progressão da doença (Abdelmalek et al., 2001; Adams et al., 2005; Bayard et al., 2006; Wu et al., 2008).

Em adição aos parâmetros histológicos de inflamação detectados, outros sinais de inflamação foram observados nos camundongos MSG (DN e DH) como aumento da expressão dos mRNAs *Il6* e *Tnfa* e aumento da proteína IL6 no fígado, o que já foi demonstrado em fígado de animais obesos (Lin et al., 2000; Masaki et al., 2004; Park et al., 2010; van der Hijden et al., 2015). No momento, não temos explicação para o fato de o mRNA do *Tnfa* estar aumentado no fígado, sem aumento local na concentração da proteína TNFA. Frente a essa observação, podemos sugerir a ocorrência de alteração pós-transcricional, que reduza a tradução do mRNA, e/ou aumento na secreção da proteína sintetizada; ressalta-se que aumento da proteína TNFA já foi descrito em plasma de camundongos obesos MSG de 23 semanas de vida. A expressão de IL1 β não foi encontrada alterada no presente estudo, o que já foi observado em camundongos obesos (Juge-Aubry et al., 2003).

É importante reiterar que obesidade com resistência à insulina tem sido caracterizada como um estado de inflamação crônica, com comprometimento inflamatório extra-hepático (Farrell et al., 2012; Shoelson et al., 2007). Nesse sentido, aumento dos mRNAs *Il6* e *Tnfa* e/ou de suas proteínas IL6 e TNFA no tecido adiposo e no plasma de camundongos MSG (Furuya et al., 2010) e de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (van der Hijden et al., 2015) já foi descrito, evidenciando o caráter sistêmico do processo inflamatório, proposto iniciar-se no tecido adiposo (van der Hijden et al., 2015).

O fígado exerce importante papel na manutenção da homeostasia glicêmica, com destaque para o efluxo de glicose durante o jejum. Em situação de resistência à insulina e/ou falta de hormônio, exacerba-se a liberação de glicose, o que contribui para a hiperglicemia (DeFronzo, 1992). Esse processo depende fundamentalmente da gliconeogênese, e envolve:

1. aumento da expressão do GLUT2 (transportador de glicose), permitindo maior efluxo celular da glicose;
2. aumento da expressão da PEPCK (enzima chave da gliconeogênese), permitindo maior síntese de novo de glicose;
3. aumento da expressão da G6Pase (enzima que desfosforila a glicose-6P), gerando a glicose livre capaz de ser efluída pelo GLUT2;

4. redução da GK (enzima que fosforila a glicose), diminuindo a utilização/reutilização da glicose livre, contribuindo para o gradiente de efluxo.

No presente estudo, nos animais obesos MSG, independentemente da dieta, observou-se aumento na expressão dos mRNAs *Slc2a2*, *Pck1* e *G6pc* e redução no mRNA *Gck*, com regulação paralela nas respectivas proteínas.

Aumento de mRNA *Slc2a2* e proteína GLUT2 já foi descrito em ratos obesos e/ou diabéticos (Ahn, 1995; David-Silva et al., 2013; Oka et al., 1990; Seino et al., 1992). Também aumento da expressão e/ou atividade das enzimas G6Pase e PEPCCK já foi descrito em humanos e ratos com obesidade acompanhada por resistência insulínica ou diabetes (Beale 2004; Burchell, Cain, 1985; Clore et al., 2000; Yang, 2005). Por outro lado, redução na expressão/atividade da GK já foi descrita em humanos portadores de DM2 (Clore et al., 2000; Iynedjian, 1993; Printz et al., 1993). Essas regulações enzimáticas foram relacionadas com redução na secreção ou ação da insulina (Belfiore 1974; Liu 1994), e aumento na secreção de glucagon (Christ, 1996). Em conjunto, essas alterações favorecem o efluxo hepático de glicose, contribuindo para a hiperglicemia (Clore et al., 2000; DeFronzo, 1992; Gerich, 1991; Michael et al., 2000). Entretanto, em todos esses estudos, a presença de EHNA nunca foi investigada.

Visando melhor caracterizar a repercussão funcional das alterações metabólicas acima discutidas, investigamos a capacidade do fígado de realizar gliconeogênese e exportar glicose para a circulação, utilizando como ferramenta o teste do piruvato, no qual injeta-se esse precursor gliconeogênico e mede-se a elevação glicêmica ao longo do tempo. Os resultados mostraram que os animais MSG de 20 semanas de idade apresentam aumentado efluxo hepático de glicose, o que confirma as alterações funcionais esperadas em consequência das alterações moleculares observadas. Embora aumento no efluxo hepático de glicose seja esperado nas situações de resistência insulínica e/ou diabetes (Clore et al., 2000; DeFronzo, 1992; Gerich, 1991), esta alteração funcional nunca foi demonstrada junto com as alterações enzimáticas e de transportador de glicose relacionadas, e em situação de EHNA. Isso permite que se proponha definitivamente uma associação entre essas variáveis, e ratifica a participação da resistência insulínica hepática na perda da homeostasia glicêmica.

A regulação do estoque hepático de glicogênio está longe de ser bem conhecida, apesar de ser classicamente conhecida como importante na manutenção da homeostasia glicêmica (Greenberg et al., 2006). Aumento e redução de glicogênio hepático são observados, respectivamente, nos estados pós-prandial e jejum; e resultam do balanço entre síntese e degradação do substrato. Essa regulação é atribuída à ação conjunta dos hormônios insulina e glucagon, na qual o aumento da relação insulina/glucagon favorece o estoque do glicogênio e vice-versa (Greenberg et al., 2006). Com base nessa premissa, era de se esperar que os animais obesos MSG, que evoluem com redução na ação da insulina e com aumento da glucagonemia (Sartin et al., 1985), apresentassem reduzido estoque hepático de glicogênio. Entretanto, observou-se aumento importante no estoque de glicogênio nos animais MSG, independentemente da dieta, indicando a presença de mecanismos regulatórios que se sobrepuseram ao binômio insulina/glucagon. Nesse sentido é bem conhecido que o aumento de precursores gliconeogênicos, gerando maior concentração intracelular de glicose-6P, inibe a degradação e ativa a síntese do glicogênio (Greenber et al., 2006). Ainda, a própria elevação extracelular da glicose, levando a maior conteúdo intracelular de glicose-6P, também pode aumentar a síntese e diminuir a degradação do glicogênio (Agius, 2008). De fato, a glicose-6P já foi claramente demonstrada como um ativador alostérico da enzima glicogênio sintase (von Wilamowitz-Mollendorff et al., 2013). Em concordância, aumento de glicogênio hepático já foi demonstrado em camundongos db/db portadores de DM2 (Sullivan, 2015). Assim, na presente condição fisiopatológica, observa-se a quebra de um paradigma fisiológico, que determina que o conteúdo hepático de glicogênio varia inversamente com o efluxo hepático de glicose, uma vez que o glicogênio aumentou, concomitantemente com aumento no efluxo da glicose.

Ainda, é importante salientar que não investigamos as enzimas chaves da síntese e, principalmente, da degradação do glicogênio, porque tanto o chamado “ciclo do glicogênio” (atividade concomitante de síntese/degradação) como a atividade glicogeniolítica são considerados insuficientes para alterar, cronicamente, a glicemia (Greenberg et al., 2006, Roden, Bernroider, 2003). Indubitavelmente, aumento crônico no efluxo hepático de glicose, contribuindo para desbalanço

glicêmico, tem sido associado apenas a aumento da atividade gliconeogênica (Greenberg et al., 2006; Roden and Bernroider, 2003).

Um importante foco deste estudo foi a investigação de fatores transcricionais potencialmente envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose; com destaque para o *Slc2a2*, uma vez que o transportador GLUT2 é molécula chave na secreção da glicose pelo hepatócito. Ainda, além de regular *Slc2a2*, os fatores transcricionais estudados também já foram descritos como reguladores dos genes das enzimas hepáticas estudadas. Finalmente, essa investigação é fundamental, pois, uma vez definido o papel desses fatores transcricionais, eles passarão a representar potenciais alvos para desenvolvimento de terapia gênica no futuro.

No fígado dos animais MSG, independentemente da dieta, observou-se aumento na expressão do mRNA *Hnf4a*. Além disso, a maior atividade transcricional do HNF4A foi confirmada pelo aumento de sua ligação na região promotora do *Slc2a2*. Nesse sentido, a ativação da AMPK (proteína cinase ativada por AMP), que é estimulada pela insulina, induz degradação do HNF4A, reduz o seu conteúdo e prejudica sua homodimerização, diminuindo sua ligação em sítios do DNA (Hardie, 2007; Hong et al., 2003; Leclerc et al., 2001). Logo, em situações de baixa ação/secreção da insulina, como acontece na resistência com DM2, a ativação da AMPK está reduzida (Hardie 2004, 2007), favorecendo a atividade transcricional do HNF4A. Isso está de acordo com o observado no promotor do *Slc2a2*, e supõe-se esteja ocorrendo também nos genes *Pck1* e *G6pc*. Em concordância com o proposto, já demonstramos, em rim e fígado de ratos diabéticos insulino-pênicos, que o aumento de expressão do *Slc2a2* relaciona-se com aumento da atividade do HNF4A, o que é revertido pela insulino-terapia (David-Silva et al, 2013).

Adicionalmente, foi proposto que a atividade transcricional do HNF4A seja modulada por meio de interação física com o FOXO1, no sítio de ligação do HNF4A, com efeitos transcricionais opostos conforme o gene, e sob modulação da insulina (Hirota et al., 2008). Por exemplo, a redução na ação insulínica diminui a fosforilação do FOXO1, que permanece retido no núcleo associado ao HNF4A; isso aumenta a transcrição dos genes *Pck1* e *G6pc*, porém, reduz a do gene *Gk* (De Souza et al., 2010; Hirota et al., 2008). Essa regulação está em concordância com as alterações gênicas aqui observadas, ressaltando que se trata de um estado de resistência à

insulina. Outros estudos já confirmaram a ativação da transcrição dos genes da *G6pc* e *Pck1* pelo HNF4A (Roth et al., 2002; Yamagata et al., 2004).

A expressão do mRNA do *Foxa2* e a atividade de ligação do HNF3B no promotor do *Slc2a2* também se mostraram aumentadas nos animais MSG, independentemente da dieta. A insulina, por meio da via PI3K-AKT, fosforila o HNF3B que aumenta no citoplasma (exclusão nuclear), o que resulta em inibição da sua atividade transcricional (Wolfrum et al., 2003). Assim, é compreensível que nos animais obesos MSG, com resistência à insulina, a atividade inibitória da via PI3K-AKT sobre o HNF3B esteja reduzida, e, consequentemente, contribuindo para aumentar a transcrição de genes alvos como o *Slc2a2*. Nesse sentido, já foi demonstrado, em ratos diabéticos insulino-pênicos, que a expressão do *Slc2a2* tanto em rim como em fígado aumenta em paralelo a aumento na atividade de ligação do HNF3B, efeito esse que é revertido após 6 dias de insulino-terapia (David-Silva et al., 2013; Freitas et al., 2009).

Também, já foi proposto que a atividade do HNF3B estimularia a expressão dos genes das enzimas *Pck1* e *G6pc*. Esse efeito se amplificaria em condições de reduzida atividade biológica da insulina, como foi demonstrado na resistência induzida por glicocorticoide (Vander Kooi et al., 2003; Wang et al., 1996). Assim, podemos propor a participação do HNF3B nos aumentos de *Pck1* e *G6pc* aqui observados.

Finalmente, tanto a expressão gênica, quanto a atividade de ligação do HNF1A ao promotor do *Slc2a2*, também aumentaram nos animais MSG, independentemente da dieta. Já foi demonstrado que o promotor do gene *Hnf1a* possui elemento responsivo para HNF4A e HNF3B (Duncan, 1997; Gragnoli et al., 1997; Kuo et al., 1992), que agem positivamente nesse gene (Ben-Shushan et al., 2001; Duncan et al., 1998; Kuo et al., 1992; Tian, Schibler 1991; Xanthopoulos et al., 1991), explicando o resultado de aumento do mRNA do *Hnf1a* observado.

Quanto à atividade transcricional induzida pelo HNF1A, um efeito estimulatório exercido no promotor do *Slc2a2* já foi claramente demonstrado (Cha et al., 2000). Além disso, já descrevemos que o aumento na expressão do mRNA do *Slc2a2* acompanha-se de aumento na atividade de ligação do HNF1A, tanto em fígado como em rim de ratos diabéticos insulino-pênicos, o que é revertido pela insulino-terapia (David-Silva et al., 2013; Freitas et al., 2009).

Adicionalmente, ainda em relação ao fator transcricional HNF1A, devemos sugerir sua participação na regulação aqui observada nos genes *G6pc* e *Pck1*, uma vez que já foi demonstrado que o HNF1A ativa a expressão desses genes (Lin et al., 1997).

Algumas citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a expressão e ativar a via dos NFKBs. Isso pode induzir aumento de TNFA, fechando assim um círculo vicioso, que contribui para exacerbar o quadro inflamatório. No fígado dos animais MSG, independentemente da dieta, observamos aumento na expressão dos mRNAs *Tnfa*, *Il6* e *Rela*, este último responsável por codificar uma das principais subunidades do NFKB, conhecida como p65 (Shao-Cong, 2011). Esses dados reforçam do ponto de vista molecular o aumento da atividade inflamatória local, revelada na análise morfológica do fígado dos animais MSG; ressaltando-se que a origem celular desses marcadores inflamatórios é difícil de ser estabelecida no presente desenho experimental. Há inúmeras vias de ativação do NFKB, sendo a mais comum, a via ativada, entre outros fatores, pelo TNFA (Baeuerle, 1991; Baud, Karin 2001), cuja expressão estava aumentada nos animais MSG. Semelhantemente ao observado neste estudo, já foi evidenciado aumento do NFKB em fígado de camundongos obesos (Cai et al., 2005; Yuan et al., 2001) e obesos com EHNA (Jaeschke et al., 1996; Xiong et al., 2004).

Em células B pancreáticas, o NFKB foi descrito como estimulador da expressão de genes envolvidos na secreção de insulina, com destaque para o *Slc2a2* (Norlin et al., 2005). Ainda, em células B pancreáticas manipuladas para superexpressar IKBA (inibidor do NFKB), a expressão do *Slc2a2* foi reduzida em 80%, confirmando o papel estimulador do NFKB no gene *Slc2a2* (Norlin et al., 2005). Assim, é plausível que o aumento da atividade inflamatória local, via NFKB, participe da superexpressão do *Slc2a2* observada no presente estudo.

Nada encontramos na literatura relacionando, direta e claramente, a regulação dos genes *Pck1*, *G6pc* e *Gck* pelo NFKB.

A interleucina 6, outro importante marcador pró-inflamatório, também contribui para a resistência à insulina (Bastard et al., 2002). Embora sua ação biológica não ocorra via NFKB (Senn et al., 2003), o aumento de seu mRNA/proteína nos animais MSG reforça a presença de inflamação no território hepático.

Pelo discutido acima, podemos propor que a EHNA, observada em fígado de camundongos MSG, acompanha-se de importantes alterações no metabolismo hepático da glicose, as quais favorecem um excessivo efluxo do substrato, contribuindo para a hiperglicemia. Entretanto, como já apontado no início dessa discussão, nas condições investigadas não se pode estabelecer uma relação causa-efeito entre a EHNA e a alteração de homeostasia da glicose. Então, visando contribuir na busca de relações causa-efeito entre as alterações observadas, investigamos as consequências da redução da glicemia em resposta a tratamento com florizina, independentemente, portanto, de elevação adicional na insulinemia. A florizina é um inibidor dos co-transportadores de sódio-glicose (SGLT1 e SGLT2), que em resposta a tratamento injetável inibe a reabsorção renal de glicose, sendo capaz de reduzir a hiperglicemia em ratos diabéticos insulino-pênicos (Freitas et al., 2007).

Uma vez que as alterações hepato-metabólicas aqui avaliadas não foram alteradas pela dieta hiperlipídica, o que apontou a obesidade *per se* como indutora dessas das alterações, o tratamento com florizina foi imposto apenas em animais obesos alimentados com dieta normolipídica.

O tratamento com florizina não foi capaz de alterar o peso corporal e o índice de Lee, indicando que, pelo menos nesse período de 7 dias, a obesidade não se alterou. Entretanto, importantes alterações hepáticas reverteram nos animais tratados com florizina (MSG-FL).

Em relação à EHNA, o tratamento com florizina reduziu o peso do fígado, a área ocupada por gordura, e os índices de esteatose e de balonização (de grau 2 para grau 1); o que fez com que o escore final da EHNA diminuísse significativamente (de escore 4,8 para escore 3,0). Apesar destas melhorias, os animais MSG-FL ainda receberam a classificação de “prováveis portadores de EHNA”, pois 3,0 é o escore mínimo para essa classe. Isso ocorreu devido à redução apenas parcial no grau de balonização/esteatose, e, principalmente, à permanência do mesmo grau de inflamação. Esta carência de efeito sobre o quadro inflamatório hepático foi reiterada pelo fato de que a elevada expressão dos mRNAs *Il6*, *Tnfa* e *Rela* não se alterou em resposta à florizina. Lamentavelmente, não foi possível determinar a atividade de ligação de proteínas nucleares ao sítio de ligação do

NFKB no gene *Slc2a2* em fígado de animais MSG-FL, devido a restrições na importação de radioisótopos.

Conforme já discutido, a obesidade envolve aumento de citocinas pró-inflamatórias, provenientes do tecido adiposo, o que participa do desenvolvimento da inflamação hepática. Portanto, compreende-se que a presença da obesidade garanta a manutenção da inflamação hepática. Por outro lado, não se deve descartar a possibilidade de que os sinais inflamatórios hepáticos possam reverter em resposta a um tratamento mais prolongado.

Já foi discutido que a resistência insulínica hepática envolve redução no influxo e aumento no efluxo da glicose, o que decorre de uma regulação orquestrada das enzimas chaves do metabolismo de carboidrato e do transportador de glicose; as mais importantes claramente demonstradas nesse estudo. Admiravelmente, a redução da glicemia decorrente do tratamento com florizina (retorno a valores semelhantes aos de controles não obesos) acompanhou-se de reversão completa das alterações induzidas pela obesidade. Isto é, a florizina reduziu: a expressão (gênica e proteica) das enzimas gliconeogênicas e do transportador GLUT2, o conteúdo de glicogênio hepático, o efluxo hepático de glicose (teste do piruvato), e os níveis plasmáticos de triglicérides; e aumentou a expressão gênica da glicocinase. Lembrando que o efeito primário do tratamento com florizina é reduzir a glicemia, independentemente de alteração (primária) na secreção e/ou ação da insulina, essa resposta revela o poderoso papel etiopatogênico da hiperglicemia (glicotoxicidade) sobre as alterações de metabolismo hepático, nunca antes demonstrado por meio das ferramentas experimentais aqui utilizadas in vivo.

Especificamente, em relação à regulação de *Slc2a2*/GLUT2, um estudo de nosso grupo já demonstrou, em rim de ratos, que o aumento de expressão induzido pelo diabetes (aloxana) revertia em resposta ao tratamento com florizina aqui utilizado (Freitas et al, 2007).

Estendemos a investigação dos efeitos do tratamento com florizina para a análise dos fatores transcripcionais, demonstrados como envolvidos na regulação dos genes do metabolismo da glicose aqui estudados. Nesse sentido, os aumentos induzidos pela obesidade MSG tanto na expressão dos genes *Hnf4a*, *Foxa2* e *Hnf1a*, como na atividade de ligação de suas proteínas HNF4A, HNF3B e HNF1A no

promotor do *Slc2a2* foram completamente revertidos, reforçando suas participações na regulação não apenas do *Slc2a2*, mas também das enzimas *G6cp*, *Pck1* e *Gck*.

Não é de nosso conhecimento estudo em fígado com EHNA, mostrando o efeito da redução da glicemia por florizina na atividade dos fatores HNF1A, HNF3B e HNF4A sobre genes do metabolismo da glicose. Entretanto, nosso grupo já demonstrou redução da atividade de ligação desses fatores no promotor do gene *Slc2a2*, tanto em rim como em fígado de ratos diabéticos, em resposta à queda glicêmica induzida por insulino-terapia (Freitas et al., 2009, David-Silva et al., 2013).

7 CONCLUSÕES

Conclui-se em fígado de camundongos obesos que a esteato-hepatite não alcoólica acompanha-se de aumento na expressão do transportador *Slc2a2*/GLUT2, das enzimas gliconeogênicas *Pck1*/PEPCK e *G6pc*/G6Pase, e da expressão e atividade dos fatores transcricionais *Hnf1a*/HNF1A, *Foxa2*/HNF3B, *Hnf4a*/HNF4A e *Rela*/NFKB. Essas alterações levam a aumento no efluxo hepático de glicose, contribuindo para hiperglicemia. Além disso, essas alterações revertem em resposta à queda glicêmica induzida por florizina, revelando a hiperglicemia como potente fator etiopatogênico.

REFERÊNCIAS*

Abdelmalek M F, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *American Journal Gastroenterology*. 2001;96(8):2711-17.

Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 2005; 172:899-905.
Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochemistry Journal*. 2008; 414(7):1-18.

Ahn YH; Kim JW, Han GS, Lee BG, Kim YS. Cloning and characterization of rat pancreatic beta-cell/liver type glucose transporter gene: a unique exon/intron organization. *Archives Biochemistry Biophysics*. 1995;16(1):387-96.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal Medicine*. 2002; 346(6):1221-31.

Argaud D, Zhang Q, Pan W, Maitra S, Pilkis SJ, Lange, A. J. Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence." *Diabetes*. 1996; 45(12): 1563-71.

Ayala, JE, Streeper RS, Desgrosellier JS, Durham SK, Suwanichkul A, Svitek CA, Goldman JK, Barr FG, Powell DR, O'Brien RM. Conservation of an insulin response unit between mouse and human glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoters: transcription factor FKHR binds the insulin response sequence. *Diabetes*. 1999; 48(7): 1885-9.

Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(14):63-80.

Barzilai N, Rossetti L. "Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin." *Journal of Biological Chemistry*. 1993;46(9):28-33.

Bastard JP, Maachi M, Nhieu JT. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." *Journal Clinical Endocrinol Metabolism*. 2002; 87(5):2084–2089.

Baud V, Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biology*. 2001;11:(4)372-77.

Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *American Fam Physician*. 2006;73(9): 1961-68.

Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2004; 5(192):249-5.

Belfiore F, Romeo F, Napoli E, Vecchio LL. Enzymes of glucose metabolism in liver of subjects with adult-onset diabetes. *Diabetes*. 1974;23(3):32-9.

Bell RR, Spencer MJ, Sherriff JL. Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *The Journal of nutrition*. 1997;27(6):37-42.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal Food Science Nutrition*. 1996;47(3):233-261.

Besancon E, Gui S, Lok J, Tymianski M, Lo EH. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;2(5):268-75.

Blood FR, Oser BL. Monosodium glutamate. *Science*. 1969;165(3897):1028-9.

Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M, Condamine H. Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development*. 1991;113(2): 589-99.

Borgius LJ, Steffensen KR, Gustafsson JA, Treuter E. Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *Journal Biology Chemistry*. 2002;277(51): 49761-6.

Boron WF, Boulpaep EL. (2009). *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2009. 348p.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal Clinical Investigation*. 2004;114(2):147-152.

Brunt, EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Disease*. 2004;24(1):3-20.

Brunt, EM. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. *Semin Diagnosis Pathology*. 2005;22(4):330-338.

Brunt, EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatol Res*. 2005;33(2): 68-71.

Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Oliver D, Wehmeier KR, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Humam Pathology*. 2004;35(9):1070-82.

Burchell A, Cain DI. Stabilization of glucose-6-phosphatase activity by a 21 000-dalton hepatic microsomal protein. *Biochemistry Journal*. 1985;230(2):489-495.

Burchell A, Cain DI. Rat hepatic microsomal glucose-6-phosphatase protein levels are increased in streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 1985;28(11):852-6.

Cai D, Yuan M, Minsheng Y, Frantz D, Melendez PA. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature Medicine*. 2005;11(2):183-190.

Caldwell SH, Oelsner DH. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*. 1999; 29(3): 664-669.

Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Cooperative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *Journal Biology Chemistry*. 2000; 275(24):18358-65.

Chang J, Kim S, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine*. 2004; 10 (7): 65-71.

Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. (2002). NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002;35(2):373-9.

Christ B, Nath A. Impairment by interleukin 1b and tumour necrosis factor a of the glucagon-induced increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes. *Biochem Journal*.1996;320:161–6.

Clore JN, Stillman J, Sugerman H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(6):969-74.

Costa, RH, Grayson DR. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Molecular Cell Biology*. 1989;9(4):1415-25.

Coyle JT, Bird SJ, Evans RH, Gulley R, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW. Excitatory amino acid neurotoxin: selectivity, specificity and mechanisms of action. *Neuroscience Research Program Bulletin*. 1981;19(4):331-427.

Cross DA, Alessi P, Cohen M. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(5):785–789.

Das, UN. Obesity, metabolic syndrome X, and inflammation. *Nutrition*. 2002;18(5):430-432.

David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM., Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF. (2013). Hepatocyte nuclear factors 1alpha/4alpha and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. *Life Science*. 2013; 93(22): 805-13.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845.

De Simone V, Cortese R. Transcriptional regulation of liver-specific gene expression. *Current Opin Cell Biology*. 1991;3(6):960-965.

De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *Journal Physiology*. 2010;588(12):2239-53.

DeFronzo, R. A. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia*; 1992;35(4):389-397.

Dickens M, Svitek CA, Svitek CA, Culbert AA, O'Brien R, Tavares JM. Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *Journal Biology Chemistry*. 1998; 273(32): 20144-20149.

DiDonato JA, Hayakawa M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*. 2002; 388(6642): 548-54.

Draaisman F, Moulin P, Beylot M. (2003). "Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease." *Diabetes Metabolism*. 2003;29(5):478-85.

Duncan SA, Nagy A, Chan W. "Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos." *Development*. 1997; 124(2): 279-87.

Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science*. 1998;281(5377):692-95.

Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metabolism Res Rev*. 2005; 21(1):31-38.

Efendic S, Karlander S. Mild type II diabetes markedly increases glucose cycling in the postabsorptive state and during glucose infusion irrespective of obesity. *Journal Clin Investigation*. 1988;81(6):1953-1961.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2):S99-S112.

Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*. 2012;6(2):149-71.

Frain M, Swart G, Guido S, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R, Cortese R. The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell*. 1989;59(1):145-157.

Freitas HS, Schaan BD, David-Silva A, Sabino-Silva R, Okamoto MM, Alves-Wagner AB, Mori RC, Machado UF. SLC2A2 gene expression in kidney of diabetic rats is regulated by HNF-1alpha and HNF-3beta. *Molecular Cell Endocrinology*. 2009;305(1-2):63-70.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." *Physiology Rev*. 2008;88(1):125-72.

Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors." *Journal Clin Investigation*. 1989;84(6):1780-1785.

Furuya DT, Poletto AC, Favaro RR, Martins JO, Zorn TM, Machado UF. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. *Metabolism*. 2010;59(3):395-399.

Gabbay RA, Sutherland C. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal Biology Chemistry*. 1996;271(4):1890-1897.

Gerich, JE Is muscle the major site of insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus? *Diabetologia*. 1991;34(8):607-610.

Gerich JE Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetologia Med*. 2010;27(2):136-142.

Gidh-Jain, M. Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proceedings National Academy Sciences*. 1993;90(5):1932-36.

Gragnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gragnoli F, Marozzi G, Bell GI. "Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene." *Diabetes* 1997;46(10):1648-1651.

Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ. Pathobiology of Human Disease. *American Journal Physiology*. 2006;291(9):E1–E8.

Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *Journal Hepatology*. 1995; 22(2):28-36.

Guillemain G, Loizeau M, Pinçon-Raymond M, Girard J, Leturque A. The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *Journal Cell Science*. 2000;113(5):841-847.

Haber BA, Chin S, Chuang E, Buikhuisen W, Naji A, Taub T. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. *Journal Clin Investigation*. 1995;21(3):832–841.

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann International Medicine*. 2005;143(10):722-728.

Hanke S, Mann M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Molecular Cell Proteomics*. 2009;8(3):518-524.

Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Pharmacology Toxicol* 2004;14(3):185–210.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Molecular Cell Biology*. 2007;8(2):774–785.

Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Medicine*. 1998;15(1):15-24.

Hattersley AT, Beards F. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat Genet*. 1998;19(3):268-270.

Herberg L, Döppen W, Major E, Gries FA. Dietary-induced hypertrophic–hyperplastic obesity in mice. *Journal of Lipidic Research*. 1974;12(3):35-42.

Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Progress in Lipid Research*. 1989;28(2):67-115.

Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, Fukamizu A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding." *Journal Biology Chemistry*. 2008;283(47):32432-41.

Hong U, Wenbo Y, Todd L. AMP-activated Protein Kinase Regulates HNF4 Transcriptional Activity by Inhibiting Dimer Formation and Decreasing Protein Stability. *Journal Biology Chemistry*. 2003;278(30):27495-501.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science*. 1993;259(5091):87-91.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal Clin Investigation*. 1995;95(5):2409-415.

Hughes DE, Stolz DB. Elevated hepatocyte levels of the Forkhead box A2 (HNF-3 β) transcription factor cause postnatal steatosis and mitochondrial damage. *Hepatology*. 2003;37(6):1414-1424.

Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*. 2006;291(2):E358-364.

Isomaa B, Henricsson M. Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia*. 1998;41(4):467-473.

Iynedjian PB. Mammalian glucokinase and its gene. *Biochemistry Journal*. 1993;293(1):1-13.

Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation." *Diabetes*. 2003;52(5):1104-10.

Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, Thompson CH, Smith K, Ruell PA, Stannard SR, George J. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology*. 2008;47(5):1513-23.

Josephson IR, Sperelaks N. Kinetic and steady-state properties of Na⁺ channel and Ca²⁺ channel charge movements in ventricular myocytes of embryonic chick heart. *Journal Gen Physiology*. 2005;100(2):195-216.

Kaestner KH, Lee KH. Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *Proceedings National Academy Science*. 1993; 90(16):7628-31.

Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocrine Journal*, 2006;53(3):267-293.

Koivisto VA, Pelkonen R, Cantell K. "Effect of interferon on glucose tolerance and insulin sensitivity." *Diabetes*. 1989;38(5):641-647.

Kreutner W, Springer SC, Sherwood, JE. Resistance of gluconeogenic and glycogenic pathways in obese-hyperglycemic mice. *American Journal Physiology*. 1975;228(2):663-671.

Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Crabtree GR. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature*. 1992;355(6359):457-61.

Lai E, Prezioso VR. NF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally." *Genes Dev*. 1990;4(8):1427-1436.

Lai E, Prezioso VR. Hepatocyte nuclear factor 3 α belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev*. 1991;5(3):416-427.

Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A. (2002) American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism. 2002;283(4), E682–91.

Lange AJ, Argaud D. Isolation of a cDNA for the catalytic subunit of rat liver glucose-6-phosphatase: regulation of gene expression in FAO hepatoma cells by insulin, dexamethasone and cAMP." Biochem Biophys Res Commun. 1994;201(1):302-309.

Lazzaro D, De Simone V. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. Development. 1992;114(2):469-479.

Leclerc I, Lenzner C, Gourdon L, Vaulont S, Kahn A, Viollet B. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. Diabetes. 2001;50(7):1515-1521.

Leclercq IA, Farrell GC. "CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis." Journal Clin Investigation. 2000;105(8):1067-1075.

Lehninger AL. Lehninger Princípios de Bioquímica. 6ªed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298.

Levy E, Chouraqui JP, Roy CC. Steatorrhea and disorders of chylomicron synthesis and secretion. Pediatric Clinic North America. 1988;35(1):53-67.

Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. Nature Medicine. 2000;6(9):998-1003.

Lindner T, Gagnoli C. Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. Journal Clinical Investigation. 1997;100(6):1400-05.

Liu ZQ, Barrett EJ, Dalkin AC, Zwart AD, Chou JY. Effect of acute diabetes on rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1994;5(2):23-27.

Lorden JF, Caudle A. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. Neurobehav Toxicol Teratol. 1986;8(5):509-9.

Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: nonalcoholic steatohepatitis." Journal of Gastroenterol and Hepatology. 1997;12(5):398-403.

Ludwig J, Owen CA, Barham SS, McCall JT, Hardy RM. The liver in the inherited copper disease of Bedlington terriers." Laboratory Investigation. 1980;43(1):82-87.

Ludwig J, Viggiano TR. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clinic Proceeds. 1980;55(7):434-38.

Machado UF, Shimizu I, Saito M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT4) in white adipose tissue of obese mice. Physiol Behav. 1994;55(4):621-625.

Machado, UF, Shimizu Y, Saito M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. Hormone and Metabolic Research. 1993;25(9):462-465.

Macho L, Fickova M. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. Physiology Research. 2000;49(1):S79-85.

Madan K, Bhardwaj P. (2006). Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal Clinic Gastroenterology*.2006;40(10):930-35.

Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JL. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*. 1991;128(2):1100-06.

Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004;40(1):177-184.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-19.

McCullough AJ. Thiazolidinediones for nonalcoholic steatohepatitis--promising but not ready for prime time." *The New England Journal of Medicine*. 2006;355(22):2361-63.

McPherson CE, Shim EY. An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array." *Cell*. 1993;75(2):387-8.

Meier CA, Bobbioni E. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin?" *Journal Clinic Endocrinology Metabolism*. 2002;87(3):1184-1188.

Michael MD, Kulkarni RN. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular Cell*. 2000;6(1):87-97.

Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M., Kahn A. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *Journal Biology Chemistry*. 1994;269(12):8944-51.

Miura N, Tanaka K. Analysis of the rat hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 gene promoter: synergistic activation by HNF4 and HNF1 proteins. *Nucleic Acids Research*. 1993;21(16):3731-36.

Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E, Schutz G. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*. 1993;119(3):567-578.

Morris MJ, Tortelli CF, Filippis A, Proietto J. "Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat." *Regulatory Peptides*. 1998;25(75):441-7.

Moscatiello S, Manini R. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovascular Disease*. 2007;17(1):63-70.

Muoio DM; Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and -cell failure in type 2 diabetes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9:193-205.

Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, Salunga TL, Nomoto K, An JL, Takano Y, Iizuka S, Nagata M, Suzuki W, Shimada T, Aburada M, Nakano M, Selmi C, Gershwin M. E.

Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *Journal of Autoimmunity*. 2008;30(2):42-50.

Nordlie RC, Lardy HA. Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Journal of Biology and Chemistry*. 1963;238(4):2259-63.

Norlin S, Ahlgren U, Edlund H. Nuclear factor-kappaB activity in beta-cells is required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2005;54(1):125-32.

O'Doherty RM, Lehman DL. Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *Journal Biology and Chemistry*. 1996;271(34):20524-30.

Oka Y, Asano T, Shibasaki Y, Lin JL, Tsukuda K, Akanuma Y, Takaku F. Increased liver glucose-transporter protein and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats." *Diabetes*. 1990;39(4):441-6.

Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. *Hepatology Research*. 2002;23(2):138-144.

Oliveira CP, Faintuch J. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) - preliminary findings." *Obesity Surgery*. 2005;15(4):502-5.

Ott MO, Rey-Campos J, Cereghini S, Yaniv M. vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression." *Mechanism of Development*. 1991;36(2):47-58.

Owen K; Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;15(4):309–323.

Papa PC, Seraphim PM, Machado UF. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. *International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders*. 1997;21(11):1065-70.

Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Development*. 1998;12(8):2488–98.

Parhofer KG. Interaction between Glucose and Lipid Metabolism: More than Diabetic Dyslipidemia. *Diabetes Metabolism*. 2015;39(5):353-62.

Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208.

Pickup JC, Mattock MB. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*. 1997;40(11):1286-92.

Powell EE, Cooksley WG. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11(1):74-80.

Powell EE, Jonsson JR. Dangerous liaisons: the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Internal Medicine*. 2005;143(10):753-754.

Printz RL, Koch S. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *Journal of Biology and Chemistry*. 1993;268(7):5209-19.

Printz RL, Magnuson MA. Mammalian glucokinase. *Annual Review of Nutrition*. 1993;13:463-496.

Rausa FM, Tan Y. Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3beta in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(21):8264-82.

Reshef L, Hanson RW. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue." *Journal of Biology and Chemistry*. 1970;245(22):5979-84.

Riu E, Ferre T, Hidalgo A, Mas A, Franckhauser S. Overexpression of c-myc in the liver prevents obesity and insulin resistance. *FASEB J*. 2003;17(12):1715-17.

Roden M., Bernoier E. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;17(3):365-83.

Roth U, Jungermann K. Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *Biochem*. 2002;365(1):223-8.

Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko H J. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008;322(8):1539-43.

Saito M, Minokoshi Y, Shimazu T. Brown adipose tissue after ventromedial hypothalamic lesions in rats. *American Journal of Physiology*. 1995;248(1):E20-E25.

Sartin JL, Lamperti AA, Kemppainen RJ. Alterations in insulin and glucagon secretion by monosodium glutamate lesions of the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology Research*. 1985;11(3):145-55.

Sasaki Y, Suzuki W, Shimada T, Iizuka S, Nakamura S, Nagata M, Fujimoto M, Tsuneyama K, Hokao R, Miyamoto K, Aburada M. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice." *Life Science*. 2009;85(13):490-98.

Seino Y, Yamamoto T, Koh G. Insulin and glucose transporter gene expression in obesity and diabetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1992;200(2):210-3.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biology and Chemistry*. 2003;278(16):13740-6.

Seoane J, Gomez-Foix, AM. Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *Journal of Biology and Chemistry*. 1996;271(39):23756-60.

Seoane J, Trinh K. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(43):26972-7.
Shao-Cong S. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research*. 2011;21:71-85.

Shen W, Searce LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast." *Journal of Biology and Chemistry*. 2001;276(46):42812-42817.

Sher T, Yi HF. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor." *Biochemistry*. 1993;32(21):5598-604.
Shim EY, Woodcock C. Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes & Development*. 1998;12(1):5-10.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2169-80.

Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily." *Genes and Development*. 1990;4(12):2353-65.

Sloop KW, Showalter AD. Specific reduction of hepatic glucose 6-phosphate transporter-1 ameliorates diabetes while avoiding complications of glycogen storage disease. *Journal of Biology and Chemistry*. 2007;282(26):19113-21.

Stoffel, M. and Duncan, S. A. (1997). "The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism." *Proceedings of National Academy of Sciences*. 94(24): 13209-13214.

Streeper RS, Eaton EM, Ebert DH, Champman SC, Svitek CA. Hepatocyte nuclear factor-1 acts as an accessory factor to enhance the inhibitory action of insulin on mouse glucose-6-phosphatase gene transcription. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 1998;95(16):9208-13.

Streeper, R. S., Svitek, C. A., Champman, S., Greenbaum, L. E., Taub, R.. (1997). "A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin." *Journal of Biology and Chemistry*. 272(18): 11698-11701.

Streeper RS, Svitek CA, Goldman JK. Differential role of hepatocyte nuclear factor-1 in the regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by cAMP in liver- and kidney-derived cell lines. *Journal of Biology and Chemistry*. 2000;275(16):12108-18.

Stumvoll, M. Thiazolidinediones - some recent developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2003;12(7):1179-87.

Sullivan MA, Harcourt BE, Xu P, Forbes JM, Gilbert RG. Impairment of Liver Glycogen Storage in the db/db Animal Model of Type 2 Diabetes: A Potential Target for Future Therapeutics? *Current Drug Targets*. 2015;10:1088-93.

Thorens B, Sarkar HK. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*. 1988;55(2):281-90.

Tian JM, Schibler U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes & Development*. 1991;5(12):2225-34.

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.

Tokuyama K, Himms-Hagen, J. "Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice." *American Journal of Physiology*. 1986;251(4):407-15.

Tomura H, Nishigori H, Sho K, Yamagata K, Inoue I, Takeda J. Loss-of-function and dominant-negative mechanisms associated with hepatocyte nuclear factor-1 β mutations in familial type 2 diabetes mellitus. *Journal of Biology and Chemistry*. 1999;274(19):12975-8.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*. 2004;92(3):347-55.

Valera A, Bosch F. Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *European Journal of Biochemistry*. 1994;222(2):533-9.

Van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, Bruin A, Hofker MH, Kleemann R, Koonen DP, Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015;7(4):256-68.

Vander Kooi BT, Onuma H, Oeser JK, Svitek CA, Allen SR, Vander Kooi CW, Chazin WJ, O'Brien RM. The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Molecular Endocrinology*. 1995;19(12):3001-22.

Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR, O'Brien RM. The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *Journal of Biology and Chemistry*. 2003;278(14):11782-93.

Van Schaftingen E, Gerin I. (2002).The glucose-6-phosphatase system. *Biochemistry Journal*. 2002;362(3):513-32.

Vaxillaire, M.,Boccio, V. (1995). "A gene for maturity onset diabetes of the young (Yang) maps to chromosome 12q." *Nature Genetics*. 9(4): 418-423.

Verma IM. Nuclear factor (NF)- κ B proteins: therapeutic targets. *Annals of Rheumatic Disease*. 2002;63(2):ii57-61.

Viollet B, Kahn A, Raymondjean M. Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(8):4208-19.

von Wilamowitz-Moellendorff A, Hunter RW, Gárica-Rocha M, Kang L, López-Soldado I, Lantier L, Patel L, Pegg K, Mastínez-Pons C, Calbó J, Cohen P, Wasserman DH, Guinovart J, Sakamoto K. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. *Diabetes*. 2013;62(12):4070-82.

Wang JC, Stromstedt PE, O'Brien RM, Granner DK. Hepatic nuclear factor 3 is an accessory factor required for the stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Molecular Endocrinology*. 1996;10(7):794-800.

Wang H, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Maechler P, Wollheim CB. Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. *The EMBO Journal*. 2000;19(16):4257-64.

Wang H, Maechler P, Kurowska M, Formstecher P, Laine B. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *Journal of Biology Chemistry*. 2000;275(46):35953-9.

Way JM, Görgün CZ, Tong, Q, Uysal TK, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Willson TM; Steven A, Gökhan S. Adipose Tissue Resistin Expression Is Severely Suppressed in Obesity and Stimulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonists. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;28(3):12-8.

Weinhouse S. Role of the liver in blood glucose homeostasis. *The Journal of the Medical Society of New Jersey*. 1962;59(4):535-40.

Weinstein DC, Ruiz I, Altaba A. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*. 1994;78(4):575-88.

Wiese TJ, Lambeth DO. The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1991;100(2):297-302.

Wu WC, Zhao W, Li S. Small intestinal bacteria overgrowth decreases small intestinal motility in the NASH rats. *World Journal of Gastroenterol*. 2008;14(2):313-7.

Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proceeds of the National Academy of Sciences*. 2003;100(20):11624-29.

Yamagata K, Daitoku H. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *Journal of Biololgy and Chemistry*. 2004;279(22):23158-65.

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 1996;384(6608):458-60.

Yamamoto T, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Yasuda K. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. *Biochem Biophys Research Communication*. 1991;175(3):995-1002.

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. (2005). "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." *Nature*. 2005;3(2):356-62.

Yang, S.,Zhu, H. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 378(2): 259-268.

Yudkin JS, Stehouwer CD. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler, Thrombosis and Vasc Biology*. 1999;19(4):972-8.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001;293(5535):1673-7.

Xanthopoulos KG, Prezioso VR, Chen WS, Sladek FM, Cortese R. The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-3, and HNF-4, protein factors that govern liver-specific transcription. *Proceeds of the National Academy of Sciences*. 1992;88(9):3807-1.

Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Archives*. 2004;444(1):3-12.

Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine*. 2003;31(1):S105-11.