ISABEL VELOSO ALVES PEREIRA

**Efeito do *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) no metabolismo
lipídico na esteatohepatite experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de: Gastroenterologia Clínica

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Isabel Veloso Alves

Efeito do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) no metabolismo lipídico na esteatohepatite experimental / Isabel Veloso Alves Pereira. -- São Paulo, 2010.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Gastroenterologia Clínica.

Orientadora: Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira.

Descritores: 1.Fígado gorduroso/metabolismo 2.Camundongos obesos
3.Medicamentos de ervas chinesas 4.Expressão gênica 5.Fígado gorduroso/genética

USP/FM/DBD-146/10

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cláudia Pinto Marques de Souza Oliveira pelo exemplo de dedicação, perseverança e prazer em fazer pesquisa.

Ao pesquisador José Tadeu Stefano pelos ensinamentos, orientação e amizade.

À Vicência Mara Rodrigues de Lima por tornar possível a realização deste trabalho e pela companhia.

Ao técnico José Edson Pereira pela relevante participação neste trabalho.

À Márcia Kubrusly, Marta Privato, Michele Tomitão e Nilza Molan pela ótima companhia diária e boas idéias científicas.

Aos alunos Gian Fatobene e Nathália Halla por me permitirem ensinar um pouco e aprender muito.

Aos médicos Daniel Mazzo e Fabíola Rabelo pelo espírito de equipe.

Ao biólogo Victor Debbas pela presteza na realização do Western Blot, bom humor e dedicação.

Às amigas Tatiana Iunes e Natacha Leal pelos inúmeros cafés com ciência, bobagens e aflições em decidir por uma carreira acadêmica.

A todos do Departamento de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por auxiliarem em minha formação.

À minha família pelo apoio incondicional, afeto e desejo de que minhas realizações sejam alcançadas.

A todos meus amigos pela paciência, companheirismo e distrações.

Ao Leopoldo Prado que acrescentou um pouco de música em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

"Ver um mundo num grão de areia

E um céu numa flor silvestre

Capturar o infinito na palma da mão

E a eternidade em uma hora. "

Willian Blake

Auguries of Innocence - 1803

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria R. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journal Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 - Introdução..... 1

1.1 Contextualização e Fisiopatogênese.....2

1.2 Metabolismo de lipídeos no fígado8

1.2.1 Síntese *de novo* de lipídeos.....8

1.2.2 Oxidação e Excreção de ácidos graxos.....9

1.2.3 Armazenamento de lipídeos.....11

2 - Objetivos 14

3 - Materiais e Métodos 16

3.1 Local 17

3.2 Animais 17

3.3 Dietas 18

3.4 Delineamento experimental 20

3.5 Expressão gênica 21

3.5.1 Extração do RNA tecidual	21
3.5.2 Quantificação e Análise da integridade do RNA total.....	22
3.5.3 Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa quantitativa relativa (RT-qPCR).....	25
3.5.3.1 Curva de eficiência de amplificação dos genes-alvo e do controle Interno.....	27
3.5.3.2 Método de análise da expressão gênica.....	32
3.6 Expressão protéica - Western Blot	33
3.7 Análise histopatológica	34
3.8 Análise estatística	35
4 - Resultados.....	36
4.1 Animais.....	37
4.2 Análise histológica	37
4.3 SREBP1c	39
4.4 FASn.....	42
4.5 SCD1	43
4.6 MTP.....	44
4.7 CPT1	47
4.8 ADFP	48
4.8 Perilipina.....	49
5 - Discussão.....	50

6 - Conclusões.....	59
7 – Referências Bibliográficas	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	<i>acetil-coa carboxilase</i>
ADRP	<i>adipocyte differentiation-related protein</i>
AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
ALT	alanina aminotransferase
ApoB	apolipoproteína b
ATP	adenosina trifosfato
ChREBP	<i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CPT1	<i>carnitine palmitoyl transferase 1</i>
CTRL	grupo controle
DAG	diacilglicerol
DCM	dieta deficiente em colina e metionina
DGAT	diacil-glicerol-aciltransferase
DH	dieta hiperlipídica
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DNL	síntese <i>de novo</i> de lipídeos
ENA	esteatohepatite
EROS	espécies reativas de oxigênio
FASn	ácido graxo sintetase
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FXR	<i>fanosoid x receptor</i>
GPAT	glicerol-fosfato-aciltransferase
LIM	laboratório de investigação médica
L-PK	<i>liver-specific piruvate kinase</i>

LXR	receptor hepático x
MCD	<i>deficient diet in choline and methionine</i>
MDA	malonaldeído
min	minutos
MTP	<i>microsomal triglyceride protein</i>
NAFLD	<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>steatohepatitis</i>
PAT	perilipina, adrp e tip47
PPARS	proliferators activated receptor
PXR	<i>pregnane x receptor</i>
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	ácido ribonucléico ribossomal
s	segundos
SCD-1	<i>stearoyl-coa desaturase</i>
SNAC	s-nitroso-acetilcisteína
SREBP	<i>sterol element binding protein</i>
TA	temperatura ambiente
TG	triglicérides
TZDs	tiazolineodionas
VLDL	lipoproteínas de densidade muito baixa
YHK	<i>yo jyo hen shi ko</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
=	igual a
$\pm$	mais ou menos que
<	menor que
>	maior que
$\leq$	menor que ou igual a
$\geq$	maior que ou igual a
p	significância estatística
°C	graus Celsius
%	por cento
μ	micro
g	grama
kg	quilograma
L	litro
m	mili
m	metro
M	molar
mg	miligrama
mg/dia	miligrama por dia
mm	milímetro
ng	nanograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo lipídico no fígado, mostrando os mecanismos envolvidos no acúmulo de lipídeos na DHGNA.....	4
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando a integridade de alguns dos RNAs totais extraídos de amostras de tecido hepático com visualização das bandas 28 e 18 S.....	23
Figura 3	Eficiência de amplificação dos genes MTP e β -actina.....	28
Figura 4	Eficiência de amplificação dos genes SREBP1c e β -actina.....	29
Figura 5	Eficiência de amplificação dos genes ADFP e β -actina.....	29
Figura 6	Eficiência de amplificação dos genes CPT1a e β -actina.....	30
Figura 7	Eficiência de amplificação dos genes SCD-1 e β -actina.....	30
Figura 8	Eficiência de amplificação dos genes FASn e β -actina.....	31

Figura 9	Curva de dissociação dos genes SREBP1c, MTP, FASn, SCD1, CPT1, ADRP e β -actina.....	31
Figura 10	Corte histológico de tecido hepático de camundongos ob/ob. Coloração Hematoxilina Eosina (HE). A e D - Grupo controle (aumento 40 X; 100x); B e E - Grupo DCM (aumento 40 X; 100x); C e F - Grupo DCM + YHK (aumento 40 X; 100x).....	38
Figura 11	Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene SREBP1c no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).....	39
Figura 12	Representação gráfica das médias da expressão protéica do SREBP1c no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).	40
Figura 13	Expressão da proteína do SREBP1c pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X.....	41

Figura 14 Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene FASn no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK)..... 42

Figura 15 Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene SCD-1 no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK)..... 43

Figura 16 Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene MTP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada..... 44

Figura 17 Representação gráfica da expressão protéica da MTP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada..... 45

- Figura 18** Expressão da proteína do MTP pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X..... 46
- Figura 19** Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene CPT1a no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada..... 47
- Figura 20** Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene ADFP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada..... 48
- Figura 21** Expressão da proteína Perilipina pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X..... 49

Figura 22	Possível mecanismo de ação do YHK na redução da ENA.....	58
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta deficiente em colina e metionina.....	19
Tabela 2	Composição da Dieta Padrão - Nuvilab CR1.....	20
Tabela 3	Identificação, concentração, absorbância e relação $A_{260/280}$ dos 22 RNAs totais extraídos de amostras do tecido hepático dos animais.....	24
Tabela 4	Peso inicial e final dos animais controle (CTRL), submetidos à dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e submetidos à DCM + solução de YHK (DCM+YHK).....	37

RESUMO

Pereira IVA. Efeito do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) no metabolismo lipídico na esteatohepatite experimental [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 97 pag.

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é atualmente uma das formas mais comuns de doença hepática, e está diretamente relacionada com a obesidade. Estudos indicam uma prevalência por volta de 30% na população ocidental e 11% na população oriental. A DHGNA possui um largo espectro abrangendo desde casos de esteatose simples sem inflamação, até casos com esteatohepatite e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. A fisiopatogênese da DHGNA é baseada em múltiplos eventos: resistência insulínica, aumento da lipólise periférica, aumento da síntese *de novo* de lipídeos, estresse oxidativo, endotoxemia crônica no desencadeamento da inflamação e fibrose entre outros. A etapa inicial caracteriza-se pelo acúmulo de ácidos graxos no hepatócito, suplantando sua capacidade de metabolização e exportação conseqüente à ação lipogênica da insulina, desta forma o metabolismo de ácidos graxos está intimamente ligado ao desenvolvimento da DHGNA. O *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) é um composto natural usado na medicina japonesa para tratamento de doenças hepáticas e apresenta propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e hipolipemiantes. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do YHK no metabolismo hepático de lipídeos. Para tanto, foram utilizados camundongos obesos (ob/ob) com esteatohepatite não alcoólica (ENA) induzida por dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e foram analisados no tecido hepático, genes relacionados com a síntese *de novo* de lipídeos (SREBP1c, FASN), genes relacionados com a oxidação e exportação de lipídeos (CPT1a e SCD-1, MTP), assim como genes relacionados com o armazenamento de lipídeos (Perilipina e ADFP). O YHK apresentou um efeito citoprotetor hepático com melhora dos parâmetros histológicos neste modelo experimental de ENA. Associadamente, houve

redução na expressão de genes relacionados à síntese *de novo* como SREBP e da FASn, quando se comparou o grupo tratado com DCM+YHK com o grupo não tratado DCM. Em contrapartida, houve aumento na expressão da MTP e da SCD-1 ocasionando uma maior exportação de triglicerídeos hepáticos nos animais que utilizaram o YHK. Ainda, o YHK modulou as proteínas Perilipina e ADFP. Por outro lado, não houve modificação na oxidação de lipídeos.. Conclui-se que o YHK pode ser uma droga promissora no tratamento da DHGNA, já que age modulando genes envolvidos na síntese e exportação de lipídeos hepáticos, reduzindo o acúmulo de gordura no hepatócito.

Palavras chave: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), Esteatohepatite Não Alcoólica (ENA), Camundongos ob/ob, *Yo Jyo Hen Shi Ko* - YHK.

SUMMARY

Pereira IVA. Evaluation of Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) in hepatic lipid metabolism in experimental steatohepatitis [dissertation]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2010. 97 pg.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently one of the most common forms of liver disease, related directly to the increase of obesity in the world. Previous studies indicate a prevalence of around 30% in the western population and 11% in the eastern. This disease covers cases from simple steatosis without inflammation to cases of steato hepatitis (NASH) and fibrosis and it may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The pathophysiology of NAFLD is based on multiple events: insulin resistance, increased peripheral lipolysis, increased *de novo* lipogenesis, oxidative stress, endotoxemia in triggering chronic inflammation and fibrosis and others. The initial stage of the disease is characterized by the accumulation of fatty acids in hepatocytes caused by the lipogenic action of insulin. This condition results in the surpassing of the cells ability to metabolize and export. This way, the metabolism of fatty acids is closely linked to the development of NAFLD. The Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) is a natural compound used in Japanese medicine for the treatment of liver disease and it has antioxidant, anti-inflammatory and lipid lowering properties. This study aimed to evaluate the effect of YHK in the hepatic metabolism of lipids. An experimental model was designed using obese mice (ob/ob) affected by NASH induced by a deficient diet in choline and methionine (MCD). Then, genes from its hepatic tissue related to *de novo* lipogenesis (SREBP1c, FASN), to lipid oxidation and exportation (CPT1A and SCD-1, MTP) as well as genes related to lipid storage (Perilipin and ADFP) were analyzed. The YHK presented a cytoprotective effect, improving the hepatic histological parameters in this experimental model. Additionally, when comparing the group treated with MCD + YHK (diet + YHK) to the untreated MCD group (diet) there was a reduction in the expression of genes

related to *de novo* synthesis like SREBP1c and FASN. However, an increased expression of MTP and SCD-1 were observed leading to a greater liver exportation of fatty acids in animals that were treated with YHK. Moreover, the YHK modulated the proteins Perilipin and ADFP. On the other hand, there was no changing in lipid oxidation. In summary, the YHK can be a promising drug for the treatment of NAFLD, as it acts by modulating genes involved in the synthesis and exportation of hepatic lipids, reducing the accumulation of fat in hepatocytes.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), Mice, ob / ob, Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK).

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Contextualização e Fisiopatogênese

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é, atualmente, uma das formas mais comuns de doenças hepáticas, relacionada primordialmente ao aumento progressivo da obesidade no mundo¹. Nos Estados Unidos é estimado que de 6 a 17% da população possua DHGNA, isto se deve ao alto índice de obesidade e sobrepeso e tem sido considerada uma grande epidemia². Em outros países ocidentais a prevalência de DHGNA varia de 17% a 33% na população geral, sendo que em indivíduos obesos ela sobe para 75%³. Em países orientais ainda não existem estudos conclusivos sobre os dados epidemiológicos da DHGNA, estima-se um valor de 11%⁴.

A DHGNA abrange desde casos de esteatose simples sem inflamação, até casos com esteatohepatite (ENA) e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular^{5, 6}. A ENA propriamente dita é caracterizada por esteatose macro/microgoticular, infiltrado inflamatório, balonização hepatocelular em zona III, podendo apresentar fibrose, corpúsculos de Mallory e cirrose⁷.

Embora já se conheça os fatores predisponentes como a síndrome cardiometabólica (obesidade, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia,

adiposidade visceral e hipertensão arterial), “bypass” jejuno-ileal, desnutrição calórico-proteica, nutrição parenteral prolongada ou uso de drogas; sua possibilidade de evolução para cronicidade; sua patogênese assim como a terapêutica são ainda pouco conhecidas.

A fisiopatogênese da DHGNA é baseada em múltiplos eventos: resistência insulínica^{8, 9}, aumento da lipólise periférica, aumento da síntese *de novo* de lipídeos, estresse oxidativo, endotoxemia crônica no desencadeamento da inflamação e fibrose (ENA),¹⁰ entre outros.

A etapa inicial caracteriza-se pelo acúmulo de ácidos graxos (AG) no hepatócito, suplantando sua capacidade de metabolização e exportação conseqüente à ação lipogênica da insulina^{11, 12}. A deposição de triglicérides (TG) no interior do hepatócito (esteatose) decorre principalmente da disponibilidade (síntese) e mobilização de ácidos graxos livres (AGL), e do decréscimo da exportação hepática de TG sob a forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Os AGL têm dois destinos após entrada nos hepatócitos: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP) ou são convertidos novamente TG, acoplados às VLDL e exportados do fígado para o tecido adiposo (Figura 1).

Figura 1 - Metabolismo lipídico no fígado, mostrando os mecanismos envolvidos no acúmulo de lipídeos na DHGNA.

Provavelmente, na DHGNA exista uma combinação destes fatores intensificados por alterações na lipólise pós-prandial relacionada à insulina, a qual provoca aumento de AG liberados para o fígado; excesso de carboidratos na dieta que resulta em nova síntese de AG hepáticos; falha na β -oxidação mitocondrial e depleção de ATP; produção de citocinas proinflamatórias e um complexo mecanismo deficiente de transporte de TG^{13, 14}.

O estresse oxidativo, por sua vez, apresenta evidências bem fundamentadas que relacionam este, na evolução de esteatose para ENA e

fibrose^{10, 15}. Desta forma, o excessivo aporte de AG ao fígado, conseqüente a distúrbios na exportação de TG, pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), bem como ativação de outras vias de oxidação lipídica (via peroxissomal e microssomal) que geram por sua vez mais EROS, aumentando o estresse oxidativo hepático. Este aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as células de estreladas favorecendo à fibrogênese^{16, 17}.

Devido ao largo espectro da DHGNA não existe um tratamento considerado padrão, ele se baseia na severidade da doença, bem como nas suas comorbidades. As mudanças de hábitos de vida devem ser indicadas em qualquer fase da doença e incluem: dieta para redução de peso, exercícios, cessão do uso de álcool, tabaco e, ou também, drogas ilícitas. O transplante de fígado é indicado para pacientes que apresentam cirrose descompensada e hepatocarcinoma^{18, 19}.

Ainda é possível aliar medicamentos como o Orlistat e a cirurgia bariátrica para ajudar na redução de peso nos casos que possuem indicação. Alguns estudos relatam que uma mudança dos macronutrientes da dieta acompanhada de suplementação de antioxidantes (Vitamina E, Betína, S-adenosilmetionina, Zinco) mesmo com a ausência de redução de peso possa modular a DGHNA²⁰.

A síndrome cardiometabólica é a comorbidade com maior relação com a DGHNA, uma das suas principais características é a resistência a insulina. Devido a isso medicamentos hipoglicemiantes como as tiazolidinedionas (TZDs) e metiformina tem sido amplamente estudadas como possíveis estratégias terapêuticas²¹. Estudos demonstraram que a Pioglitazona melhora a resistência a insulina, os níveis de ALT e a biopsia hepática, porém a interrupção do tratamento leva a um aumento de ALT e resistência a insulina^{22, 23}. Todavia, o uso indiscriminado de TZDs apresenta um risco de potencial hepatotoxicidade. Alguns achados relatam disfunção hepática devido ao uso de Troglitazona^{24, 25}. A metiformina é utilizada para tratar pacientes diabéticos que apresentam sobrepeso e, ou também, obesidade e reverte a resistência à insulina, melhorando a esteatose hepática devido à redução da enzima Acetil CoA Carboxilase (ACC) e do fator de transcrição *Sterol Element Binding Protein* (SREBP1c)²⁶.

A medicina tradicional chinesa baseia-se no uso de fitoterápicos no processo de cura. Alguns compostos foram descritos para o tratamento de inúmeras disordens do sistema digestivo. O *Honokiol* e *Magnolol* são isômeros estruturais derivados da raiz do barbatimão e apresentaram resultados no tratamento da esteatohepatite experimental com redução da deposição de gordura no hepatócito, devido a inibição da maturação do SREBP1c²⁷. Outros como *Qushi Huayu Decoction* (QHD) e a fórmula *YiQi Sanju* podem melhorar o nível de aminotransferases, e parecem auxiliar na redução de peso e diminuir a inflamação na ENA^{28, 29,30}.

O composto natural denominado *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) (Kyotsujigyo Inc., Japão) é utilizado na medicina chinesa há muitos anos, sendo derivado do *Henshiko* e composto por 4 ingredientes: *Panax pseudo ginseng*, *Eucommia ulmoides*, *Polygonati rhizoma* e *Licorice root*. Seus compostos apresentam propriedades farmacêuticas e são utilizados no tratamento de várias doenças hepáticas³¹. O *Panax ginseng* foi descrito como composto hipoglicemiante e antioxidante³², assim como a *Eucommia* que também apresenta efeitos antiinflamatórios³³. Já o *Polygonati* e a *Licorice* são conhecidos antioxidantes³⁴.

Baseados na fisiopatogênese da DGHNA e nas propriedades apresentadas por estes compostos poderíamos considerar esses efeitos benéficos em seu tratamento. Chande e colaboradores (2006) realizaram um estudo piloto duplo cego randomizado em pacientes com ENA e persistência de alto nível de aminotransferase e demonstraram que o YHK levou à redução da ALT sugerindo um papel anti-inflamatório deste composto³⁵. Em um modelo de ENA induzida por dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e hiperlipídica (DH) em camundongos ob/ob, o YHK promoveu inibição da ENA nas duas dietas, reduziu as aminotransferases e o estresse oxidativo hepático verificado pelo malonaldeído (MDA) e glutathiona reduzida. Observou-se também redução da gordura visceral e do peso desses animais³⁶.

1.2 Metabolismo de lipídeos no fígado

1.2.1 Síntese *de novo* de lipídeos

A síntese *de novo* de AG (DNL) é o mecanismo metabólico de conversão do excesso de carboidratos em AG, que são esterificados com glicerol-3-fosfato para formar TG (lipogênese). A atividade deste mecanismo está relacionada à condição nutricional, uma dieta rica em carboidratos e pobre em gordura leva a uma mudança no metabolismo celular de oxidação de lipídeos para esterificação de TG¹⁴.

A glicose da dieta é convertida em acetil-CoA pela L-PK (*liver-specific pyruvate kinase*) e em seguida em *Malonyl CoA* e subsequentemente em AG pela atividade da *acetil-CoA carboxilase* (ACC) e ácido graxo sintetase (FASn). Após são alongados e desaturados pelas enzimas *Elovl6* e *Stearoyl-CoA desaturase 1* (SCD-1). A regulação da lipogênese hepática envolve uma complexa rede de fatores nucleares que regulam as enzimas envolvidas no processo. Em indivíduos saudáveis a DNL só ocorre no período pós-prandial, porém os que apresentam DHGNA ela também está ativada no jejum³⁷.

Dentre os fatores nucleares podemos destacar o *sterol element binding protein* (SREBP), o *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP), o *peroxisome proliferators-activated receptor-gamma* (PPAR- γ), o LXR, o *Pregnane X Receptor* (PXR) e o *Farnesoid X Receptor* (FXR).

O SREBP faz parte da família de fatores de transcrição envolvidos na viabilidade celular de colesterol e apresentam três membros descritos: SREBP1a, SREBP1b e SREBP1c^{38, 39}. Essas proteínas são sintetizadas em forma de precursores no retículo endoplasmático e sofrem posterior clivagem para sua ativação^{40, 41}.

Para que aconteça o aumento da lipogênese o SREBP1c ativa genes envolvidos na síntese de AG e TG como os que codificam ACC, FASN, Elovl-6 e SCD-1. O SREBP1c está elevado em animais obesos, resistentes a insulina e hiperinsulinêmicos (ob/ob)⁴².

1.2.2 Oxidação e exportação de ácidos graxos

A oxidação de AG hepáticos ocorre na mitocôndria, peroxissomos e microsossomos. Em indivíduos saudáveis a oxidação mitocondrial é o mecanismo dominante de disposição de AG sobre condições fisiológicas normais, vários estudos sugerem que na DGHNA a função mitocondrial está diminuída, devido a alterações ultra-estruturais⁴³. Essas alterações resultam em uma oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória gerando um aumento de EROS. Quando ocorre um desbalanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes as EROS podem iniciar mecanismos como a peroxidação lipídica que resulta na formação de moléculas de grande duração e causar danos em outros locais. Na depleção da oxidação mitocondrial mecanismos alternativos de oxidação são ativados como a β -

oxidação nos peroxissomos e a ω -oxidação microsomal resultando na formação adicional de EROS^{44, 45}. A *Carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT1a) é responsável pela primeira etapa da β -oxidação dos AG, está localizada na membrana mitocondrial e faz o transporte de AG para o interior da organela⁴⁶.

A exportação de AG é feita através de VLDL, sua formação é dependente apoB e mediada pela *microsomal triglyceride protein* (MTP). Os TG são adicionados à apoB por dois passos. No primeiro uma pequena quantidade de TG é transferida para apoB no retículo endoplasmático pela MTP. No segundo esta vesícula é secretada e fundida com outras gotículas de TG para formar pequenas e grandes partículas de VLDL⁴⁷.

Alguns trabalhos sugerem que a depleção de MTP é suficiente para a ocorrência de esteatose. Em humanos, alterações genéticas na apoB ou na MTP levam ao acúmulo de gordura hepática, como na abetalipoproteinemia. Em Japoneses e ocidentais existe um polimorfismo no promotor da MTP -493 G/T que leva a um aumento na suscetibilidade a esteatose hepática⁴⁸.

Oliveira e colaboradores (2007) demonstraram que a inibição da ENA com o S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) está associada à modulação da MTP⁴⁹. Por outro lado, o excesso de AG nos hepatócitos é direcionado para a mitocôndria e oxidado aumentando a geração de EROS⁵⁰.

Estudos recentes demonstraram que a taxa de secreção hepática de VLDL nas condições de resistência a insulina está aumentada em termos absolutos, contudo é incapaz de lidar com o aumento excessivo de TG

intrahepático⁵¹. Comparando indivíduos insulino-resistentes sem acúmulo de gordura hepática com indivíduos com DGHNA, os segundos apresentam menor aumento na secreção de VLDL quando a infiltração de gordura é maior do que 10%, sugerindo que estes apresentam capacidade limitada de secretar VLDL⁵².

1.2.3 Armazenamento de lipídeos

Os lipídeos são armazenados como TG em forma de vesículas dentro do tecido hepático ("lipid droplets"). Essas vesículas são formadas por uma membrana rica em proteínas da chamada família PAT (*Perilipina*, *Adipophilin*/*Adipocyte Differentiation-Related Protein*- ADFP, S3-12, OXPAT e TIP47). Essas proteínas além de darem estabilidade à gotícula estão envolvidas nos mecanismos de acúmulo e degradação de lipídeos⁵³.

As proteínas das gotículas lipídicas são responsáveis por uma mudança nas gotículas durante a biogênese e são dependentes de múltiplos fatores, incluindo expressão específica no tecido e estado metabólico (basal *vs* lipogenico *vs* lipolítico). O seqüestro de lipídeos em gotículas fornece um depósito de energia armazenada que pode ser acessado de uma forma regulamentada de acordo com a necessidade metabólica. Os lipídeos armazenados podem também ser utilizados como substrato para a síntese de outras importantes moléculas celulares, tais como fosfolipídeos de membrana e eicosanóides⁵⁴.

Os produtos da hidrólise do TG, diacilglicerol (DAG) e AGL, podem influenciar a sinalização celular, ora diretamente ora através de um metabolismo subsequente, por exemplo, para ACC. Os AGL podem influenciar a expressão gênica, atuando como ligantes para receptores nucleares, tais como o *receptor peroxisome proliferator* (PPARs). O excesso intracelular de AGL pode prejudicar a integridade da membrana, alterar vias de sinalização lipídica, e induzir a apoptose. A esterificação de AG com glicerol e embalagem do TG em gotículas revestidas podem assim fornecer um meio para que as células possam regular a disponibilidade de substratos para a utilização de energia e de lipídeos moléculas de sinalização, bem como de metabólitos potencialmente tóxicos.

A formação e a maturação das gotículas lipídicas e da participação de membros da PAT família nestes processos têm sido mais estudados em adipócitos cultivados. Em condições de repouso, a maioria das gotículas lipídicas é revestida por Perilipina. No entanto, quando as células são incubadas com AG de cadeia longa, um novo “pool” de pequenas gotículas lipídicas revestido com S3-12 e TIP47, mas não Perilipina, surge na periferia da célula. Com o tempo, mais centralizado, com gotas maiores podem adquirir adipofilina/ADRP em seus revestimentos, além de TIP47 e S3-12. A heterogeneidade do revestimento de gotículas lipídicas durante o carregamento dos adipócitos sugere um processo coordenado de maturação de gotículas lipídicas e circulação periférica dos locais de síntese para sites perinuclear de armazenamento⁵⁵.

Cada membro da família PAT tem uma função específica. A perilipina fosforila em resposta a proteína “kinase” A e abre um sítio para que ocorra a lipólise pela lipase hormônio sensível. Em animais “knockout” para perilipina o revestimento das gotículas é substituído pela ADFP, demonstrando que elas possuem funções análogas de forma que recentemente a ADFP foi chamada de Perilipina 2^{56 57 58}.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do YHK no metabolismo de lipídeos hepáticos na DGHNA. Para tanto, foram estudados: genes relacionados à síntese *de novo* de lipídeos (SREBP1c, FASn), genes relacionados à oxidação e exportação (CPT1a e SCD-1, MTP) além de genes relacionados ao armazenamento (Perilipina e ADFP).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

Esse estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM/07), Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25), Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado (LIM/37) e Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (INCor). As preparações experimentais foram realizadas conforme normas publicadas pelo "US National Institute of Health-Guide for care and use of laboratory animals" (NIH Publication, nº 85-25, revisada em 1985). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP, sob protocolo de pesquisa nº 0137/08.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos ob/ob provenientes de uma colônia de matrizes da Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA), com 8 semanas de vida. Os animais foram mantidos em microisoladores (Alesco Ind. e Com. Ltda, SP, BR), com temperatura controlada 22 °C e ciclos de 12 horas de luz

e 12 horas de noite. Os animais receberam dieta e água *ad libitum* por um período de 4 semanas.

Após este período, os animais foram sacrificados sob anestesia intraperitoneal com cloridrato de ketamina (0,1 mg/ Kg) e Xilazina (0,1 mg/ Kg) e uma laparotomia foi realizada para retirada do fígado. Amostras de tecido hepático foram coletadas para análise histopatológica, reações de imunohistoquímica e para análise de expressões gênica e protéica.

3.3 Dietas

A esteatohepatite foi induzida por uma dieta em pó, produzida artesanalmente, deficiente em colina e metionina (tabela 1). Os animais controles receberam uma dieta padrão Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, BR) (tabela 2). Ambas as dietas possuem quantidades semelhantes de carboidratos, minerais, gorduras e fibras.

Tabela 1- Composição da Dieta deficiente em Colina e Metionina produzida artesanalmente.

Ingredientes	DCM (g/kg)
Carboidratos	625,0
Caseína (79% de proteína)	214,0
Lipídeos	180,0
Gordura de coco	-
Óleo	66,0
Colesterol	-
Fibras	50,0
Vitaminas	10,0
Minerais	35,0
L-Cistina	-
Metionina	-
Bitartarato de colina	-
Tertbutilhidroquinona	0,014

Tabela 2- Composição da Dieta Padrão- Nuvilab CR1.

Composição	Padrão (% / Kg)
Umidade (máx)	12,5
Proteína Bruta (min)	22
Extrato Etéreo (min)	4,5
Matéria Mineral (máx)	10
Matéria Fibrosa (máx)	8
Cálcio (máx)	1,4
Fósforo (min)	0,8

3.4 Delineamento experimental

Os animais, com 8 semanas de vida, foram distribuídos aleatoriamente por meio de tabela de classificação seqüencial randomizada em 3 grupos com 6 animais cada:

1- Grupo CTRL (n=6): camundongos obesos ob/ob submetidos à dieta padrão NUVILAB CR1 (alimentos completo para camundongo e rato) da NUVITAL Indústria Brasileira, por um período de 4 semanas + 0,3 mL de solução fisiológica diariamente por meio de gavagem.

2- Grupo DCM (n=6): receberam diariamente 0,3 mL de solução fisiológica por meio de gavagem e dieta em pó deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas.

3- Grupo DCM tratado com YHK (n=6): submetidos à dieta deficiente em colina e metionina por um período de 4 semanas + solução de YHK (Kyotsu, Yokyo, Japan) (20mg/kg/dia diluída em 0,3mL H₂O) administrados diariamente por gavagem.

3.5 Expressão Gênica

3.5.1 Extração do RNA Tecidual

O material recebido em nitrogênio líquido foi fragmentado em pulverizador de tecidos (Mikro-Dismembrenator II B. Braun. Melsugen, RFA). Após a pulverização, foi adicionado 1,0 mL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e essa mistura foi incubada por 5 min à TA. À solução, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck), e a mesma foi agitada vigorosamente por 15 s, seguido de incubação por 5 min à TA e centrifugada durante 15 min, 12.000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5417-R, Hamburg, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol (Merck).

A mistura foi deixada em repouso durante 10 min e centrifugada por 15 min, 12.000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi removido e o botão de RNA lavado com 1,0 mL de etanol (Merck) 70%, centrifugado novamente e ressuspenso em um volume apropriado de água estéril [UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)].

3.5.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total

A concentração dos RNAs totais extraídos foi determinada por espectrofotometria [NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)]. A preparação do RNA foi considerada livre de proteínas quando a relação $A_{260/280}$ encontrava-se entre 1,8 e 2,0 (Tabela 3). Para as amostras que não atingiram estes valores, foram realizadas purificações utilizando-se o *kit* RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A integridade e a pureza dos RNAs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Somente foram utilizadas as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal (RNAr) 18 e 28 S mostraram-se íntegras à análise sob luz ultravioleta (Figura 2). Os RNAs foram mantidos a -80 °C até sua utilização.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando a integridade de alguns dos RNAs totais extraídos de amostras de tecido hepático com visualização das bandas 28 e 18 S.

Tabela 3 - Identificação, concentração, absorbância e relação $A_{260/280}$ dos 22 RNAs totais extraídos de amostras do tecido hepático dos animais.

Amostra	Conc. (ng/ mL)	Absorbância	Relação $A_{260/280}$
DCM 1	835,39	4,29	2,00
DCM 2	554,92	3,61	1,99
DCM 3	1662,29	6,26	1,84
DCM 4	1138,06	5,13	1,85
DCM 5	447,02	5,15	1,90
DCM 6	1276,43	4,92	1,90
DCM+ YHK 1	1897,05	4,41	2,00
DCM+ YHK 2	2059,49	5,71	1,98
DCM+ YHK 3	1183,63	5,34	1,90
DCM+ YHK 4	1180,31	3,24	1,97
DCM+ YHK 5	1711,28	3,49	2,00
DCM+ YHK 6	1183,63	5,34	1,83
Controle 1	1953,06	9,00	1,82
Controle 2	1072,39	7,81	1,82
Controle 3	1484,32	10,79	1,80
Controle 4	1440,35	11,82	1,83
Controle 5	1433,25	4,26	1,83
Controle 6	1182,42	5,40	1,81

3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa Quantitativa Relativa (RT-qPCR)

Foi realizada RT-qPCR em amostras de tecido hepático, onde a intensidade de expressão foi medida pela quantidade de fluorescência do produto amplificado.

Os oligonucleotídeos para os genes do SREBP1c, MTP, FASn, SCD1, CPT1, ADRP e β -actina foram desenhados no programa *Primer3 Input* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno. As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados para cada um dos genes estão apresentadas abaixo:

SREBP1c - NM_011480.3

Sense: GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA

Antisense: GGA TGT AGT CGA TGG CCT TG

FASn - NM_007988.3

Sense: TCC ACC TTT AAG TTG CCC TG

Antisense: TCT GCT CTC GTC ATG TCA CC

SCD-1 - NM_009127

Sense: AAA CAC ACG CCG ACC CTC AC

Antisense: CCG CCC TTC TCT TTG ACA GC

CPT1a - NM_013495.2

Sense: TGC CTC TAT GTG GTG TCC AA

Antisense: TCA AAC AGT TCC ACC TGC TG

MTP - NM_008642

Sense: CCT CTT GGC AGT GCT TTT TC

Antisense: ATT TTG TAG CCC ACG CTG TC

ADFP - NM_007408.3

Sense: GGG CAG TCA AGC GAT ATT TT

Antisense: AGG TTG GCC ACT CTC ATC AC

***β*-actina - NM_007393**

Sense: TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA

Antisense: GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Austrália), utilizando-se o conjunto de reagentes SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme recomendação do fabricante.

A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelo valor de *threshold cycle* (CT) ou limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado

à fase exponencial de amplificação do fragmento começa a ser detectada. A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada com a finalidade de evitar qualquer amplificação inespecífica. A temperatura de *annealing* para a amplificação dos genes SREBP1c, CPT1a e MTP foi de 57°C, a do SCD-1 59°C, do FASn 53,5°C; enquanto a do ADFP foi de 59,5 °C . Todas as reações de RT-q PCR foram realizadas em duplicata para cada amostra de tecido hepático, tanto para o gene alvo quanto para o controle β -actina.

3.5.3.1. Curva de eficiência de amplificação dos genes-alvo e do controle Interno

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada gene alvo e controle interno, foram construídas curvas a partir de uma amostra referência de RNAm com diluições seriadas (seis concentrações de RNA em duplicata: 500, 100, 20, 4, 0,8 e 0,16 ng/ μ L).

A eficiência de amplificação foi calculada pela subtração entre os valores do CT dos genes alvos e do gene β -actina, e esse resultado foi plotado em um gráfico contra o logaritmo da quantidade da RNAm inicialmente colocada. Se a inclinação da reta, ou slope = y , é menor que 0,1 (positivo ou negativo), a eficiência de amplificação entre os genes é considerada similar.

As figuras de 3, 4, 5 6 7 e 8 demonstram as curvas de eficiência para os genes SREBP1c, MTP, FASn, SCD1, CPT1, ADRP e β -actina. Pode-se observar que as eficiências de amplificação dos genes alvo foram semelhantes à da β -actina.

Figura 3: Eficiência de amplificação dos genes MTP e β -actina

Figura 4: Eficiência de amplificação dos genes SREBP1c e β -actina

Figura 5: Eficiência de amplificação dos genes ADFP e β -actina

Figura 6: Eficiência de amplificação dos genes CPT1a e β-actina

Figura 7: Eficiência de amplificação dos genes SCD-1 e β-actina

Figura 8: Eficiência de amplificação dos genes FASn e β -actina

A Figura 9 demonstra a curva de dissociação para os genes. A presença de apenas um pico demonstra a especificidade da reação.

Figura 9: Curva de dissociação dos genes SREBP1c, MTP, FASn, SCD1, CPT1, ADRP e β -actina.

3.5.3.2 Método de Análise da expressão Gênica

Para análise da expressão gênica foi utilizado o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001). Este modelo utiliza os valores de eficiência obtidos nas curvas de expressão gênica e a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}}(\text{referência-amostra})}}{(E_{\beta\text{-actina}})^{\Delta CP_{\beta\text{-actina}}(\text{referência-amostra})}}$$

O valor do ponto de cruzamento (CP – *cross point*) representa a fluorescência do limiar da amostra na fase exponencial de amplificação, assim como o CT. Nessa análise também é considerado um RNA referência (RNAm de fígado de um animal ob/ob submetido a dieta padrão). Sendo que, a razão (R) descreve a expressão relativa entre o gene alvo e o gene controle (β -actina). A eficiência de amplificação (E) da reação, tanto do gene alvo como da β -actina é dada pela curva com diluições seriadas, conforme descrito anteriormente. O ΔCP do gene alvo, é a diferença entre o valor de CP do RNA referência e o CP da amostra, e o ΔCP da β -actina é a diferença do CP referência e o CP amostra. Em seguida, é calculada a razão entre o ΔCP gene alvo e ΔCP da β -actina.

3.6 Expressão protéica – Western Blot

Foi utilizado um homogenato total de fígado, os mesmos foram submetidos a extração de proteínas com tampão de lise contendo 20mM HEPES, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 1% Triton, 1mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 1μg/ml aprotinina, 1μg/ml leupeptina e 1mM PMSF; 50 μg dos extratos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a uma corrente de 25mA a 250 volts.

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi obtida pelo sistema de transferência semi-seco por uma hora, a uma corrente de 200mA a 250 volts. A eficiência da transferência foi analisada pela detecção de proteínas na membrana com o reagente Ponceau. A membrana foi submetida a bloqueio com TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite desnatado, por 3 horas. Após lavagem com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo anti-MTP (Bristol-Meyers), anticorpo anti-SREBP1c - H160(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,CA) Plin (Abcam, Cambridge, Inglaterra) ou ainda anticorpo anti β-Actina (Sigma) por aproximadamente 16 horas a 4°C. Decorrido esse período, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti rabbit-HRP (Calbiochem) por uma hora e submetida à reação quimioluminescente com ECL (Calbiochem) e expostos a filmes autoradiográficos.

A densitometria das bandas foi obtida pelo software *Scion Image*.

3.7 Análise Histopatológica

Fragments de tecido hepático foram fixados em formol salino a 4% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE). A avaliação histopatológica baseou-se na classificação padronizada por meio da revisão pelo Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network, que designou e validou as características histológicas e um sistema de escore de atividade para DGNHA para estudos clínicos. As variáveis histopatológicas para atividade foram graduadas de acordo com o escore da atividade da DGHNA – “NAFLD Activity Score (NAS)”: recentemente definida pelo Pathology Committee of the “NASH Clinical Research Network”, que inclui apenas características da lesão ativa e que reverte em curto espaço de tempo. O escore é definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), e balonização (0 a 2). Os valores variam de 0 a 8. Os valores NAS ≥ 5 correlacionam-se com o diagnóstico de NASH e o escore menor 3 não é considerado ENA, e os valores de 3 e 4 podendo ser variáveis alocadas nas categorias de presença ou prováveis ENA. A fibrose não está inclusa no escore. A separação da fibrose das outras variáveis histológicas facilita a compreensão quanto ao estadiamento (grau de fibrose) e o que indica a atividade necro-inflamatória (escore) na esteatohepatite não alcoólica. Além disso, este modelo não apresenta fibrose, sendo o escore bastante adequado para comparação entre os grupos.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Levene e Shapiro-Wilk, com o objetivo de avaliar a variância e a normalidade. Para os que apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a análise de variância com teste de Tukey. Os dados não normais foram avaliados por Kruskal- Wallis. Foi adotado um nível de significância de 5%. Todos os testes foram realizados no software SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Animais

Os pesos iniciais e finais dos animais estão apresentados na (Tabela 4), ao final do experimento observou-se uma manutenção do peso nos animais que receberam dieta DCM + YHK.

Tabela 4 - Peso inicial e final dos animais controle (CTRL), submetidos à dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e submetidos à DCM + solução de YHK (DCM+YHK).

Peso dos animais (g)		
	Inicial	Final
CTRL	45 ± 3,4	57, ± 4
DCM	42,3 ± 3,4	51,7 ± 8,5
DCM+YHK	51 ± 3,4	51 ± 3,1

4.2 Análise Histopatológica

A figura 10 mostra fotografias de tecido hepático de camundongos ob/ob em coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). No grupo DCM,

observou-se esteatose macrovacuolar e microvacuolar moderada, difusa em todo o lóbulo hepático, balonização hepatocelular e infiltração inflamatória difusa (Figura 10- B, E). No grupo DCM+YHK e CTRL observaram-se apenas esteatose microvacuolar e diminuta inflamação (Figura 10-A, C, D,F).

Figura 10 - Corte histológico de tecido hepático de camundongos ob/ob. Coloração Hematoxilina Eosina (HE). **A e D** - Grupo controle (aumento 40 X; 100x); **B e E** - Grupo DCM (aumento 40 X; 100x); **C e F**- Grupo DCM + YHK (aumento 40 X; 100x)

4.3 SREBP1c

Os dados obtidos na análise das médias da expressão do RNAm do gene SREBP1c estão apresentados na figura 11 e revelaram-se estatisticamente diferentes. Houve uma diminuição na expressão do gene quando se comparou CTRL *vs* grupo DCM ($p < 0,001$), e nas comparações dos grupos DCM e DCM+YHK ($p < 0,001$) e CTRL e DCM + YHK ($p < 0,001$).

Figura 11 - Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene SREBP1c no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).

A expressão da proteína SREBP1c está representada na figura 18 e apresentou-se diminuída no grupo DCM+YHK quando comparado aos grupos CTRL e DCM ($p < 0,05$). Quando se comparou o grupo CTRL com DCM a expressão mostrou-se aumentada ($p < 0,05$). A figura 17 apresenta as bandas reveladas por raio X.

Figura 12 - Representação gráfica das médias da expressão protéica do SREBP1c no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).

Figura 13 - Expressão da proteína do SREBP1c pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X.

4.4 FASn

As médias da expressão do gene FASn apresentaram diferenças estatísticas quando se comparou o grupo DCM com DCM + YHK ($p < 0,05$). Os resultados estão representados na figura 15.

Figura 14 - Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene FASn no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).

4.5 SCD-1

A expressão do gene SCD-1 apresentou diferenças estatísticas em suas médias quando se comparou o grupo DCM + YHK *vs* DCM e com o DCM *vs* grupo CTRL e ($p < 0,05$). Os resultados estão representados na figura 16.

Figura 15 - Representação gráfica das médias de expressão do RNAm do gene SCD-1 no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK).

4.6 MTP

A figura 16 mostra as medianas da expressão do RNAm do gene MTP.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 16- Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene MTP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada.

A expressão da proteína MTP apresentou-se diminuída no grupo DCM quando comparado aos grupos DCM+YHK e CTRL ($p < 0,05$) e está representada na figura 14. A figura 17 apresenta as bandas reveladas por raio X.

Figura 17 – Representação gráfica da expressão protéica da MTP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada.

Figura 18 - Expressão da proteína do MTP pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X.

4.7 CPT1a

As medianas da expressão do gene CPT1a apresentaram diferenças estatísticas quando se comparou o grupo DCM + YHK e DCM com o CTRL ($p < 0,05$). E estão representadas na figura 20.

Figura 19 - Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene CPT1a no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada.

4.8 ADFP

A expressão do Gene ADFP apresentou-se diminuída no grupo DCM quando comparada ao CTRL e DCM+YHK ($p < 0,05$).

Figura 20 - Representação gráfica das medianas da expressão do RNAm do gene ADFP no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). As medianas estão representadas pelas linhas contínuas e as médias pela linha tracejada.

4.9 Perilipina

A expressão de Plin mostrou-se aumentada no grupo DCM quando comparado ao DCM + YHK e CTRL.

Figura 21 - Expressão da proteína Perilipina pelo método de Western Blot no tecido hepático de camundongos ob/ob do grupo controle (CTRL), do grupo que recebeu a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e do grupo que recebeu a dieta a DCM + solução de YHK (DCM+YHK). Imagem da revelação do raio X.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Embora os fatores predisponentes já estejam bem estabelecidos, a fisiopatogênese e a terapêutica da DGHNA ainda são pouco conhecidas. Acredita-se que a esteatose origina-se de um excesso de AG e, ou também, glicose, lipotoxicidade e resistência à insulina. A expressão de genes envolvidos no metabolismo de AG está aumentada em pacientes com DHGNA quando comparados com controle, sendo mais significativa em pacientes com simples esteatose⁵⁹. Trabalhos prévios de nosso grupo reportaram uma ação protetora do YHK, tendo isto em vista, o presente estudo procurou avaliar a ação deste composto na síntese, exportação e armazenamento de lipídeos no fígado.

O YHK foi descrito, inicialmente, como antioxidante e anti-fibrogênico. Este efeito foi observado em um modelo experimental de hepatocarcinogênese por Marotta e colaboradores (2006), no qual, o YHK reduziu a incidência e o volume dos carcinomas⁶⁰; bem como, protegeu o dano no hepatócito em um modelo de isquemia e reperfusão⁶¹.

Trabalhos experimentais realizados anteriormente por nosso grupo relataram a inibição do desenvolvimento da ENA, redução dos marcadores de estresse oxidativo, menor escore de inflamação, melhora nas concentrações de aminotransferases, diminuição da gordura visceral. Mais recentemente, identificou-se um aumento da expressão do gene MTP e PPAR α bem como uma redução na expressão do PPAR- γ no mesmo modelo animal^{34, 62}. Em

humanos o YHK administrado por 3 meses reduziu o nível das aminotransferases e não apresentou efeitos adversos³⁵.

Embora não exista um modelo experimental que reproduza perfeitamente a DGHNA em humanos, determinados modelos com modificações genéticas, tais quais os animais “knockout” para enzimas chave na síntese de AG/Desaturação/Elongação/Estereificação como ACC, SCD-1, Elovl6, GPAT e DGAT, são utilizados para mimetizar alguns dos defeitos metabólicos relacionados com a DGHNA¹². Os animais ob/ob apresentam uma mutação espontânea no gene codificador da leptina e desenvolvem naturalmente esteatose, obesidade e resistência insulínica, muito embora, não desenvolvam uma séria lesão hepática devido à importância da leptina no desencadeamento da endotoxemia e fibrogênese⁶³. A associação de um segundo fator como dieta hiperlipídica ou deficiente em colina e metionina nestes camundongos ob/ob, reproduz a ENA com biopsia semelhante à forma humana.

A dieta deficiente em colina-metionina (DCM) é um modelo bem descrito na indução de ENA. Produz esteatose em função da diminuição na exportação de VLDL, pois a colina e a metionina são precursores da fosfatidilcolina o fosfolípido que reveste as VLDL. Esta dieta aumenta os níveis de aminotransferases, gera inflamação focal, necrose hepática e fibrose sem apresentar resistência à insulina⁶⁴. Animais submetidos à DCM geralmente apresentam redução de peso e gordura visceral, embora em animais db/db, que já possuem resistência insulínica, foram reportados

manutenção da gordura visceral, maior lesão tecidual e um perfil pró-inflamatório⁴³.

No presente estudo, como descrito anteriormente, observamos que a dieta DCM não reduziu o peso dos animais, e ainda que o peso inicial dos grupos seja diferente, não houve aumento de peso no grupo que recebeu YHK. Associadamente, o YHK reduziu os parâmetros histológicos de esteatose macrovesicular, balonização e inflamação, apresentando uma histologia próxima ao animal controle corroborando com os dados de nossos trabalhos anteriores³⁴.

A regulação da lipogênese hepática envolve uma complexa rede de fatores nucleares que modulam as enzimas envolvidas no processo. O SREBP1c é um fator nuclear responsável pela ativação de genes relacionados à lipogênese, sua expressão é dependente da ação da insulina e está aumentada no período pós-prandial e diminuída em condições de jejum⁶⁵. Camundongos ob/ob apresentam uma alta expressão do SREBP1c, mesmo na presença de uma severa resistência insulínica. Esta resistência ocorre devido a uma diminuição na expressão do IRS-2, porém o mecanismo pelo qual a insulina regula o SREBP1c é dependente de IRS-1 que não está alterado nestes animais. A inativação do SREBP1c leva a uma redução significativa na expressão hepática dependente de insulina de vários genes lipogênicos, impedindo a esteatose em animais ob/ob⁶⁶. Ainda o SREBP1c também contribuiu para a regulação da absorção e síntese de glicose pela indução da glucoquinase.

Neste estudo, verificou-se pela primeira vez que o YHK reduziu significativamente a expressão gênica e protéica do SREBP1c no tecido hepático. Estes dados, somados aos achados anteriores que reportaram uma diminuição na expressão de $\text{PPAR}\gamma^{62}$, fator regulado pelo SREBP1c, sugerem que o mecanismo de ação do YHK esteja centrado na diminuída expressão do SREBP1c e seus consequentes efeitos. Ahmed e colaboradores sugeriram que a manipulação farmacológica dos SREBPs pode ser benéfica no tratamento da DHGNA, no entanto, existe um problema em seu potencial terapêutico porque a regulação do SREBP1c tem tanto um efeito lipogênico como hipoglicemiante, o que pode ser útil apenas para portadores de diabetes tipo 2⁶⁷.

A FASn cataliza o último passo da DNL, o que é determinante na capacidade do fígado em metabolizar AG, e é regulada pelo SREBP1c. Animais "Knockout" para FASn apresentam um fenótipo similar ao controle quando recebem dieta padrão, contudo quando alimentados com uma dieta rica em carboidratos e pobre em gorduras, desenvolvem esteatose. Foi proposto que a esteatose desenvolvida pelos animais "Knockout" para FASn se deve em parte, pela diminuição da β -oxidação, já que produtos da FASn regulam a expressão de receptores nucleares entre eles o $\text{PPAR}\alpha$ que é responsável por alterações na β -oxidação. Os níveis de RNA de FASn acompanharam a redução do SREBP1c no grupo tratado, demonstrando um efeito anti-esteatótico resultado da diminuição da DNL^{59 69}.

Outra enzima importante no metabolismo lipídico, modulada pelo SREBP, é a SCD-1 que regula a partição de AG saturados (AGS), que são citotóxicos, em AG monosaturados (AGM). A expressão da SCD-1 está diminuída em animais que receberam DCM, o que não acompanha a expressão proteica do SREBP1c, sugerindo que outros mecanismos também estão envolvidos em sua regulação⁶⁸. Foi demonstrada neste estudo a diminuição da expressão da SCD-1 na dieta DCM e um aumento quando os animais receberam YHK.

Animais “knockout” para SCD-1 submetidos à DCM apresentam menor índice de desaturação, aumento da apoptose e lesão celular quando comparado ao animal selvagem⁶⁹. O YHK provavelmente produziu uma adaptação no metabolismo de AGL que leva ao aumento de AGM protegendo o fígado da lesão hepática causada por AGS.

No fígado a supressão de SCD-1 é provavelmente um mecanismo compensatório, destinado a reduzir a síntese de lipídios e aumentar a oxidação lipídica em condições em que a exportação de triglicérides é inativa. Em virtude de a fórmula DCM ser rica em sacarose, a DNL continua o que agrava os lipídios hepáticos inicialmente consequente ao bloqueio da secreção de VLDL. A metabolização hepática de ácidos graxos pela β -oxidação está aumentada em animais alimentados com DCM, que por sua vez aumenta o gasto energético e promove o desacoplamento mitocondrial.

Dentro deste contexto, observou-se neste estudo um aumento na expressão do gene da CPT1, enzima chave na β -oxidação mitocondrial, no

modelo animal de ENA induzido por dieta DCM. Serviddio e colaboradores (2008) sugerem um enfraquecimento da β -oxidação baseado no aumento da expressão gênica da CPT1 e na diminuição da expressão protéica, bem como, da atividade enzimática. Ratificando estes dados experimentais, foi observado em pacientes com ENA que inicialmente ocorre um aumento na β -oxidação mitocondrial e remoção hepática de AG devido ao grande aporte de AGL, e que posteriormente, há uma disfunção mitocondrial com redução da β -oxidação^{70 71}. A deficiência mitocondrial é proposta como um mecanismo comum no desenvolvimento de ENA; o aumento da atividade da CPT1 e consequente aumento do transporte de AG de cadeia longa à β -oxidação também deve ser considerado. O YHK não provocou mudanças na expressão da CPT1, porém a análise da atividade enzimática seria importante para maiores conclusões.

Como dito anteriormente o mecanismo pelo qual a dieta DCM induz ENA é baseado principalmente na diminuição da secreção de VLDL. A MTP é uma chaperona que participa da excreção de lipídeos na forma de VLDL, sua deficiência leva ao desenvolvimento da esteatose. Björkegren e colaboradores (2001) a fim de determinar a injúria hepática causada pela supressão de MTP demonstraram que o acúmulo de lipídeos hepáticos deve-se a uma redução da expressão de SCD-1⁷². Embora neste estudo a expressão do RNAm da MTP não se apresentou modificada, a expressão protéica da MTP no grupo YHK estava aumentada, sugerindo que o YHK promova algum mecanismo na transcrição da MTP podendo acarretar uma

maior exportação de lipídeos via VLDL. Esta dissociação entre expressão gênica e proteica pode ser explicada pelo fato da expressão gênica da MTP nem sempre refletir as alterações na atividade enzimática⁷³. Semelhantemente aos resultados de Björkegren e colaboradores (2001) a indução de ENA em ratos ob/ob por DCM parece ser devido a uma diminuição da expressão de SCD-1 e consequente injúria celular, redução da exportação via MTP, disfunção mitocondrial e alta taxa de síntese lipídica⁷⁰.

O armazenamento de TG intrahepático é feito em micro e macrovesículas, recentemente descritas como organelas celulares dinâmicas devido às proteínas responsáveis pela sua estrutura⁵³. As proteínas PAT são responsáveis pela estabilização e controle da lipólise. A distribuição dessas proteínas é dependente do tamanho da vesícula e zona hepática onde se encontra. Inicialmente, a perilipina foi reportada como sendo exclusiva de células esteroideogênicas e hepatócitos e a TIP47 e adipofilina de serem co-expressas em praticamente todos os tipos celulares^{54 55}. Recentemente, foi descrito a expressão *de novo* de perilipina em fígados esteatóticos. Esta estaria relacionada com o grau de esteatose encontrada⁵⁶.

Neste estudo observou-se uma diminuição na expressão gênica da ADFP no grupo DCM, do mesmo modo que exibiu um aumento na expressão protéica da Plin. O YHK provocou um aumento na expressão de ADFP e diminuição da Plin. Estes resultados estão de acordo com a histologia, que mostra uma diferente configuração das vesículas de gordura, bem como a diminuição no grau de esteatose.

As limitações deste trabalho devem-se ao modelo experimental partir de um animal geneticamente modificado de forma que já apresenta um fenótipo diferente do normal, podendo superestimar ou subestimar o efeito do composto natural; bem como a necessidade de verificar a atividade enzimática e expressão protéica de todas as enzimas aqui estudadas para uma maior fidelidade dos resultados.

Em resumo, o YHK promoveu a redução da ENA modulando a exportação e a síntese *de novo* de lipídios, através de uma melhoria nos níveis da expressão da MTP e SCD-1 e uma redução do SREBP1c e da FASn; além de modular a expressão de proteínas PAT nas vesículas lipídicas (Figura 22).

Figura 22 – Possível mecanismo de ação do YHK na redução da ENA.

6. CONCLUSÕES

1. O YHK diminuiu a expressão do SREBP1c e da FASn, modulando a lipogênese hepática.
2. O YHK aumentou os níveis da proteína MTP e a expressão da SCD-1 melhorando a exportação de lipídeos e oxidação mitocondrial.
3. O YHK modulou as proteínas PAT diminuindo a expressão de Plin e aumentando a ADFP.
4. O YHK reduziu a lesão hepática da esteatohepatite experimental induzida por dieta deficiente em colina e metionina em camundongos obesos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Farrell GC. Non-alcoholic Steatohepatitis: What is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? J Gastroenterol Hepatol. 2003; 18:124-38.

² Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. J Clin Gastroenterol. 2006 Mar;40 Suppl 1:S5-10.

³ Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies. Gastroenterology. 2003 Jan;124(1):248-50.

⁴ Leung, Chi Man; Lai, Lawrence Siu Wing; Wong, Wing Hang; Chan, Kam Hoi; Luk, Yiu Wing; Lai, Jak Yiu; Yeung, Yat Wah; Hui, Wai Mo. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanding problem with low levels of awareness in Hong Kong Journal of Gastroenterology and Hepatology, Volume 24, Number 11, November 2009 , pp. 1786-1790(5)

⁵ Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of Nonalcoholic Steatosis Syndromes. Seminars in Liver Disease. 2001; 21:17-26.

⁶ Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of Nonalcoholic Steatohepatitis: A follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990; 11:74-80.

⁷ Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic Steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980; 55:434-8.

⁸ Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001; 50:1844-50.

⁹ Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4):917-23.

¹⁰ Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology*. 1998; 114:842-5.

¹¹ Chituri S, Abeygunasekera S, Farrell GC et al. ENA and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2001; 35(2):373-9.

¹² Festa A, D'Agostino RB, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000; 201:42-7.

¹³ Oliveira CPMS, Alves VAF, Lima VMR, Stefano Jt, DebbasVSaV, WakamatsuA, Correa-Gianella ML, Mello ES, Tiniakos D, Oliveira MG, Gianella-Neto D, Caldwell Sh, Laurindo FRM, Carrilho FJ Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein induced by s-nitroso-n-acetylcisteine in ob/ob mice, *Biochemical Pharmacology*, V74, P290-297, 2007.

¹⁴ Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*. 2008 Dec;34(6 Pt 2):643-8. PubMed PMID: 19195625.

¹⁵ Chitturi S, Farrell G. Etiopathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*. 2001; 21(1): 27-41.

¹⁶ Lee KS, Buck M, Hougum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*. 1995; 96:2461-8.

-
- ¹⁷ Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tiss Reac.* 1985; 7:137-42.
- ¹⁸ Caldwell S, Lazo M. Is exercise an effective treatment for NASH? Knowns and unknowns. *Ann Hepatol.* 2009;8 Suppl 1:S60-6.
- ¹⁹ Neuschwander-Tetri BA. Lifestyle modification as the primary treatment of NASH. *Clin Liver Dis.* 2009 Nov;13(4):649-65.
- ²⁰ Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 2007 Mar;18(3):184-95.
- ²¹ Shifflet A, Wu GY. Non-alcoholic steatohepatitis: an overview. *J Formos Med Assoc.* 2009 Jan;108(1):4-12.
- ²² Lutchman G, Promrat K, Kleiner DE, et al. Durability of histological and biochemical improvement after stopping pioglitazone therapy for nonalcoholic steatohepatitis. Is long-term therapy needed? *Gastroenterology* 2005;128(4 Suppl 2):A695

²³ Belfort R, Harrison S, Brown K, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006;355:2297–307.

²⁴ Gitlin N, Julie NL, Spurr CL, et al. Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. *Ann Intern Med* 1998;129:36–8.

²⁵ Watkins PB, Whitcomb RW. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* 1998;338:916–7.

²⁶ Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008 Sep;60(3):311-57.
Review

²⁷ Yin HQ, Kim YC, Chung YS, Kim YC, Shin YK, Lee BH. Honokiol reverses alcoholic fatty liver by inhibiting the maturation of sterol regulatory element binding protein-1c and the expression of its downstream lipogenesis genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Apr 1;236(1):124-30. Epub 2009 Jan 24.

²⁸ Zhang H, Feng Q, Li HS, Chen SD, Wang XN, Peng JH, Zhang N, Hu YY. Effects of Qushi Huayu Decoction on cathepsin B and tumor necrosis factor- α

expression in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2008; 6(9): 928-933.

²⁹ Lou SY, Liu Y, Ma YY, Chen HY, Chen WH, Ying J, He YM, Wang WJ. Effects of Yiqi Sanju Formula on non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2008; 6(8): 793-798.

³⁰ He CY, Wang WJ, Li B, Xu DS, Chen WH, Ying J, He YM. Clinical research of Yiqi Sanju Formula in treating central obese men at high risk of metabolic syndrome. J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2007; 5(3): 263-267.

³¹ Borchers AT, Sakai S, Henderson GL, Harkey MR, Keen CL, Stern JS, Terasawa K, Gershwin ME. Shosaiko-to and other Kampo (Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. Journal of Ethnopharmacology. 2000 Nov;73(1-2):1-13.

³² Chan P, Tomlinson B. Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (Panax pseudoginseng). J Clin Pharmacol. 2000 May;40(5):457-61.

³³ Kim BH, Park KS, Chang IM. Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J Med Food*. 2009 Aug;12(4):764-9.

³⁴ Chen K, Li C. Recent advances in studies on traditional Chinese anti-aging materia medica. *J Tradit Chin Med*. 1993 Sep;13(3):223-6, contd.

³⁵ Chande N, Laidlaw M, Adams P, Marotta P. *Yo Jyo Hen Shi Ko* (YHK) improves transaminases in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a randomized pilot study. *Dig Dis Sci*. 2006 Jul;51(7):1183-9.

³⁶ Lima VMR, Oliveira CPMS, Sawada LY, Barbeiro HV, Mello ES, Soriano FG, Alves VAF, Caldwell SH, Carrilho FJ. *Yo Jyo Hen Shi Ko* (Yhk), a novel chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine-choline deficient diet. *Liver International*. 2007 27:227-34.

³⁷ Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Apr;116(7):539-64. PubMed PMID: 19243311

³⁸ Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Perrey S, Yoshikawa T, Osuga J, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K,

Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Oct 6; 275(40):31069-77.

³⁹ Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) promoter through SRE motifs. *Journal of Biochemistry*. 2006 Nov 15;400(1):179-88.

⁴⁰ Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11235-40.

⁴¹ Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31.

⁴² Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*. 2009 Jan;48(1):1-26. Epub 2008 Sep 9. PubMed PMID: 18824034.

-
- ⁴³ Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res*. 2008 May;49(5):1068-76. Epub 2008 Jan 28.
- ⁴⁴ Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 ;114(2):147-52. Review.
- ⁴⁵ Merriman RB, Aouizerat BE, Bass NM. Genetic influences in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* . 2006; Mar;40(3 Suppl 1):S30-3.
- ⁴⁶ Faye A, Esnous C, Price NT, Onfray MA, Girard J, Prip-Buus C. Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase 1 Forms an Oligomeric Complex within the Outer Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Sep 14;282(37):26908-16. Epub 2007 Jul 24.
- ⁴⁷ Hussain MM, Rava P, Pan X, Dai K, Dougan SK, Iqbal J, Lazare F, Khatun I. Microsomal triglyceride transfer protein in plasma and cellular lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):277-84.

⁴⁸ Bernard S, Personne I, Lapras V. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2000; 43:995-9.

⁴⁹ Oliveira CP, Alves VA, Lima VM, Stefano JT, Debbas V, Sá SV, Wakamatsu A, Corrêa-Giannella ML, de Mello ES, Havaki S, Tiniakos DG, Marinos E, de Oliveira MG, Giannella-Neto D, Laurindo FR, Caldwell S, Carrilho FJ. Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jul 15;74(2):290-7. Epub 2007 Apr 21.

⁵⁰ Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J*. 2003 Aug 1;22(15):3898-909.

⁵¹ Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem*. 2002 May 17;277(20):17377-80. Epub 2002 Mar 21.

⁵² Adiels M, Westerbacka J, Soro-Paavonen A, Häkkinen AM, Vehkavaara S, Caslake MJ, Packard C, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Taskinen MR, Borén

J. Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2356-65. Epub 2007 Sep 12.

⁵³ C. Londos, C. Sztalryd, J.T. Tansey, A.R. Kimmel Role of PAT proteins in lipid metabolism *Biochimie*, Volume 87, Issue 1, January 2005, Pages 45-49

⁵⁴ Olofsson SO, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Borén J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):448-58. Epub 2008 Aug 13.

⁵⁵ Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE 2006 A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 580:5484–5491

⁵⁶ Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):1936-46.

⁵⁷ Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Croce MA, Gropler MC, Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Kern PA, Finck BN, Bickel PE. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3418-28.

⁵⁸ Carmen GY, Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysisCell Signal. 2006 Apr;18(4):401-8. Epub 2005 Sep 22.

⁵⁹ Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2009 Apr;39(4):366-73. Epub 2008 Nov 25.

⁶⁰ Marotta F, Harada M, Goh K, Lorenzetti A, Gelosa F, Minelli E. Phytotherapeutic compound YHK exerts an inhibitory effect on early stage of experimentally-induced neoplastic liver lesions. Ann Hepatol. 2006 Oct-Dec;5(4):268-72.

⁶¹ Marotta F, Rouge A, Harada M, Anzulovic H, Idéo GM, Yanaihara N, et al. Beneficial effect of a controlled chinese herbal remedy, K-17.22, in CCl₄-induced liver toxicity: an in vivo and in vitro study. Biomed Res 2001; 22:167-174.

⁶² Stefano JT, de Oliveira CP, Corrêa-Giannella ML, de Lima VM, de Sá SV, de Oliveira EP, de Mello ES, Giannella-Neto D, Alves VA, Carrilho FJ. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in ob/ob mice treated with yo jyo hen shi ko (YHK): effects on peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Dig Dis Sci.* 2007 Dec;52(12):3448-54. Epub 2007 Mar 30.

⁶³ Leclercq, I. A., G. C. Farrell, R. Schriemer, and G. R. Robertson. 2002. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 37: 206-213.

⁶⁴ Rinella, M. E., and R. M. Green. 2004. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 40: 47-51.

⁶⁵ J.D. Horton et al., Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), pp. 5987–5992.

⁶⁶ Yahagi, N. : Shimano, H. : Hasty, A.H. : Matsuzaka, T. : Ide, T. : Yoshikawa, T. : Amemiya Kudo, M. : Tomita, S. : Okazaki, H. : Tamura, Y.
Citation: *J-biol-chem.* Bethesda, Md. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 2002. . 277 (22) p. 19353-19357.

⁶⁷ Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Drug Discov Today*. 2007 Sep;12(17-18):740-7. Epub 2007 Aug 27.

⁶⁸ Ntambi, J. M., M. Miyazaki, J. P. Stoehr, H. Lan, C. M. Kendzioriski, B. S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J. M. Friedman, and A. D. Attie. 2002. Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 11482–11486.

⁶⁹ Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*. 2009 Feb 27;284(9):5637-44. Epub 2009 Jan 1.

⁷⁰ Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med*. 2008 Feb-Apr;29(1-2):22-35. Epub 2007 Nov 1.

⁷¹ G. Serviddio, L. Siculella, A. Giudetti, F. Bellanti, A. Romano, F. Prigigallo, E. Altomare and G. Vendemiale CPT-1 is a key target of mitochondria nitrosylation during nash development *Journal of Hepatology* Volume 44, Supplement 2, April 2006, Page S263

⁷² Björkegren J, Beigneux A, Bergo MO, Maher JJ, Young SG. Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5476-83. Epub 2001 Dec 5.

⁷³ Letteron P., Sutton A., Mansouri A., Fromenty B., Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: Another mechanism for drug-induced steatosis in mice (2003) *Hepatology*, 38 (1), pp. 133- 140.