Wermerson Assunção Barroso

PGC-1 alfa como regulador inflamatório na esteato-hepatite não-alcoólica

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2016

Wermerson Assunção Barroso

PGC-1 alfa como regulador inflamatório na esteato-hepatite não-alcoólica

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2016

Aos meus pais amados, Loide e Paulo, por todo o suporte para a realização de todos os meus objetivos e por serem minhas maiores inspirações. E ao meu filho Paulo César por dá um novo sentido para as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir a realização de mais esse objetivo e por me dá forças em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, por ter aceitado ser meu orientador e por todas as oportunidades que proporcionou não só para mim. Muito obrigado pela orientação, paciência, ensinamentos e por sempre realizar todos os meus pedidos.

À Dra. Thais Martins de Lima, pela orientação, paciência, brilhantes ensinamentos e por toda a ajuda. Sou muito grato por tudo e todas as palavras que eu usar não seria suficiente para agradecê-la.

Aos meus pais amados, Loide e Paulo, por simplesmente tudo que representam na minha vida e por me darem todo o amor e apoio incondicionais para a realização de todos os meus objetivos.

Ao meu filho Paulo César, que representa um novo estímulo para todas as minhas conquistas e por me proporcionar sentir um amor tão puro.

À Roberta, por todo o amor, companheirismo, paciência, estímulo e por ter me dado à oportunidade de sentir um amor tão surpreendente, como é o de pai para filho.

Aos meus irmãos, Welkson e Francisco, por todo o amor, carinho e incentivos para eu buscar a realização de todos os meus objetivos.

À dona Célia e seu César, por todo o carinho, apoio, preocupação e por cuidarem maravilhosamente bem do Paulo César. Sou imensamente grato a vocês!

Ao Roberto, Rodrigo e José pelo carinho, brincadeiras e por todo o apoio ao longo desta caminhada.

À minha cunhada Livia pelo apoio e por ter me dado a sobrinha/afilhada Aysha que tanto amo.

Aos meus amigos e compadres, Elza e Igor, por todo companheirismo, carinho, apoio, incentivo e por encherem Paulo César de muito amor.

Ao meu primo Danuel por todo o carinho, apoio, companheirismo e pelos momentos que compartilhamos. E aos meus tios “Pedão” e Darcy pelo carinho de sempre.

A toda minha família materna por todo o amor, carinho, apoio e por estar presente em todas as minhas conquistas.

Aos amigos Anne Karine, Joleen, Vanessa, Isabela e Ricardo Petroni, pelo companheirismo, conversas, apoio e ajuda nos experimentos.

Ao Afonso por todo carinho, preocupação, amizade e suporte durante esta jornada.
Às minhas amigas Renata Ohana, Carol e Rafaella por todo o amor, companheirismo,
conversas, conselhos e tudo de mais maravilhoso em nossa amizade “daê”.

À minha amiga Nathalee por simplesmente tudo que representa para mim. Só tenho a
agradecer a Deus por nossa amizade.

Ao amigo e irmão Lucas França por todo o companheirismo, paciência, apoio, carinho e
parceria na vida científica.

Ao irmãozinho Flávio Soares por toda a amizade, apoio e companheirismo de sempre.

Ao amigo Igor Sales por todo o carinho, apoio e ajuda durante esta jornada.

Aos amigos - Ana Kely, Davi, Danylo, Rodrigo Oliveira, Nathália Torres, Iracelle
Abreu, Crisálida Vilanova, Gilcilene Moura, Raissa Bergê, Selma Silva, Maurício
Avelar, Márcio Gleiton, Taisa Aroucha, Yzália Myrelle, Larissa Aroucha, Mariana
Serra, Paulinho Alves, Samyra Buzelle, Samatha Freitas, Marcos Gomes, Iata,
Claudiane Castro, Hellainy Brandão, Renan Carvalho, Eufran Chaves, Hernandes Brito,
Mayara Cunha, Alyne Stephany, Douglianny, Ricardo Adriano, Breno Assunção,
Vinicyus Teles, Gabriel Klinsmann, Eliane Mores, Paulo de Tarso, Patricia Oliveira,
Renatta Berlfort, Natanael Arruda, Shandyrley, Hugo Anunciato, João Batista, Thaisa
Mara, Bruna - que mesmo de longe sempre me dão todo o apoio, carinho, conselhos e
força necessários.

Ao Marcos Cantuária pelo carinho, conversas e incentivo, que apesar do pouco tempo
de convivência tem se mostrado um grande amigo e companheiro.

A Me. Suely por todos os ensinamentos, paciência, conversas e ajuda nos experimentos
durante esta jornada.

Aos demais do Laboratório de Investigação Médica 51 (LIM-51) – Dra. Denise, Dr.

Hermes, Kelli, seu Geraldo, dona Fátima, Dr. Francisco Soriano, Vivian, Ester,

Rosângela - por toda a ajuda, conversas, ensinamentos ao longo desta caminhada.

Aos irmãos que fiz em São Paulo – Ricardo Souza e Luciana, Wando e Paty, Guilherme
e João, Eunice, Esdras, Adriana, dona Joana e seu John, - que me deram bastante apoio,
carinho e nunca me deixaram esquecer a importância do Senhor Jesus Cristo na minha
vida.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - pelo apoio
financeiro para a realização desse projeto e ao CNPq – Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pela bolsa de estudos fornecida.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

(Simone de Beauvoir)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL = ácidos graxos livres;
AMP = adenosina monofosfato;
AMPc = adenosina monofosfato cíclico;
AMPK = proteína quinase ativada por AMP;
CCL2 = quimiocina (motivo C-C) ligante 2;
CD 38 = conjunto de diferenciação 38;
CHE = células hepáticas estreladas;
ChREBP = proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos;
CTR = grupo controle;
DCV = doença cardiovascular aterosclerótica;
DGAT2 = diacilglicerol O-aciltransferase 2;
DHL = grupo dieta hiperlipídica;
DNAMt = DNA mitocondrial;
DRG = dietas ricas em gordura;
EROs = espécies reativas de oxigênio;
ERR α = receptores α relacionados a estrógeno;
FOXO1 = fator de transcrição “*forkhead*” da família FoxO;
GP130 = glicoproteína 130;
HNE = 4-hidroxinonenal;
HNF4 α = fator nuclear hepático 4 α ;
HP = haptoglobina;
IKK = I κ B quinase;
IL = interleucina;
JAK = janus quinase;
LIPO = grupo lipofectamina;
LPS = lipopolissacarídeo;
MAP = proteína ativada por mitógeno;
MDA = malondialdeído;
NAFLD = doença hepática gordurosa não-alcoólica;
NASH = esteato-hepatite não-alcoólica;
NEG = grupo negativo;
NF- κ B = fator nuclear kappa B;

NRF = fator respiratório nuclear;

OAG = oxidação de ácidos graxos;

OMS = Organização Mundial de Saúde;

PA = pancreatite aguda;

PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio-1;

PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinase;

PGC-1 = coativador-1 do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama;

PPARs = receptores ativados por proliferador de peroxissomas;

RE = retículo endoplasmático;

RI = resistência à insulina;

RNAi = RNA de interferência;

RNAm = RNA mensageiro;

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SAA = amiloide sérica A;

SCD1 = esteroil-CoA dessaturase 1;

SEQ 1 = grupo sequência 1;

SEQ 2 = grupo sequência 2;

SHP2 = SH2-domínio contendo proteína tirosina fosfatase 2;

SIRT1 = sirtuína 1;

SOCS3 = supressor de sinalização de citocinas 3;

SREBP1 = proteína de ligação ao elemento de resposta do esterol;

STAT3 = transdutor de sinal e ativador de transcrição 3;

TGF β = fator de transformação do crescimento- β ;

TIMP-1 = inibidor tecidual da metaloproteinase-1;

TNF α = fator de necrose tumoral alfa;

VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para realização de RT-PCR em camundongos.....	14
Tabela 2: Grupos experimentais usados para o teste de RNA de interferência.....	15
Tabela 3: Sequências de iniciadores (<i>primers</i>) de RNA de interferência (RNAi) utilizados.....	16
Tabela 4: Sequências de iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para realização de RT-PCR em células HepG2.....	16
Tabela 5: <i>Score</i> da avaliação histológica do tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos patogênicos da esteatose.....	5
Figura 2: Estrutura e semelhança dos coativadores PGC-1 α e PGC-1 β	8
Figura 3: Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo intra-abdominal nos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	18
Figura 4: Determinação do perfil bioquímico sérico dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica... ..	19
Figura 5: Avaliação histológica do tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	20
Figura 6: Expressão de PGC-1 α e PGC-1 β no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	21
Figura 7: Expressão dos receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs, do inglês) (PPAR α , PPAR δ e PPAR γ) no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	22
Figura 8: Quantificação das citocinas no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica.....	23
Figura 9: <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α em células HepG2 utilizando RNA de interferência.....	24
Figura 10: Conteúdo proteico de PGC-1 α em células HepG2 após tratamento com RNAi.....	25
Figura 11: Expressão gênica de IL-6 nas células HepG2 após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência.....	26
Figura 12: Expressão gênica de TNF- α e IL-1 β nas células HepG2 após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência.....	26
Figura 13: Quantificação de IL-6 no sobrenadante de células HepG2 após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência.	27
Figura 14: Avaliação do conteúdo proteico de NF- κ B em células HepG2 após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α	28
Figura 15: Avaliação do conteúdo proteico de Phospho-I κ B α em células HepG2 após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α	29

Barroso WA. *PGC-1 alfa como regulador inflamatório na esteato-hepatite não-alcoólica* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Resumo

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (*NAFLD*, do inglês) é a manifestação clínica hepática da síndrome metabólica, cuja incidência aumenta consideravelmente em todo o mundo. A *NAFLD* pode progredir para um estado de esteatohepatite não-alcoólica (*NASH*, do inglês), caracterizado por inflamação hepatocelular, com ou sem fibrose. Dados na literatura mostram que o coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PGC-1 α*), além de estar envolvido em diversos processos metabólicos, representa uma estratégia terapêutica promissora na modulação da inflamação. Neste projeto investigamos as alterações inflamatórias no fígado induzida por dieta hiperlipídica e o papel do *PGC-1 α* nesse processo. Camundongos C57black/6 receberam dieta hiperlipídica contendo 30% de gordura por 10 semanas. O peso dos animais foi avaliado semanalmente. Após a eutanásia, o tecido adiposo intra-abdominal (retroperitoneal e periepídidimo) foi coletado e pesado. Analisamos o perfil glicêmico e lipídico sérico e expressão de genes envolvidos no metabolismo glicêmico e lipídico. Avaliou-se também o aspecto histológico e a inflamação do tecido hepático por quantificação das citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β . A dieta rica em gordura conduziu a um aumento dos depósitos de gordura intra-abdominal, hiperglicemia e hiperlipidemia. Os animais também apresentavam esteatohepatite, com aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição na expressão de *PGC-1 α* no tecido hepático. O envolvimento do *PGC-1 α* na produção de mediadores inflamatórios por hepatócitos foi avaliado em células HepG2 utilizando RNA de interferência (RNAi). O *knockdown* da expressão de *PGC-1 α* causou aumento na expressão e liberação de IL-6 em hepatócitos via aumento na fosforilação de I κ B α e consequente ativação do NF κ B. Portanto, nossos dados mostram que o *PGC-1 α* inibe a produção de mediadores inflamatórios (IL-6) em hepatócitos, e fornecem novas evidências das conexões existentes entre as vias metabólicas e imunes.

Descritores: fígado; inflamação; citocinas; hepatócitos; interleucina-6; *PGC-1 α* ; HepG2.

Barroso WA. *PGC-1 alpha in regulating inflammatory in nonalcoholic steatohepatitis* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the liver clinical manifestation of the metabolic syndrome, whose incidence increases considerably around the world. NAFLD may progress to a state of non-alcoholic steatohepatitis, characterized by hepatocellular inflammation, with or without fibrosis. Data in the literature show that the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α), a protein involved in various metabolic processes, represents a promising therapeutic strategy in the modulation of inflammation. In this project, we investigate the inflammatory changes in the liver induced by high fat diet and the role of PGC-1 α in this process. C57black/6 mice were fed a high fat diet containing 30% fat for 10 weeks. The weight of the animals was measured weekly. After euthanasia, the intra-abdominal adipose tissue (retroperitoneal and periepididymal) was collected and weighed. We have analyzed the glycemic and serum lipid profile and expression of genes involved in glucose and lipid metabolism. We also assessed liver morphology by HE staining and inflammation by quantification of the cytokines IL-6, TNF- α and IL-1 β . The high fat diet led to an increase in intra-abdominal fat deposits, hyperglycemia and hyperlipidemia. Animals also presented steatohepatitis, an increased proinflammatory cytokines and decreased PGC-1 α expression in the hepatic tissue. The involvement of PGC-1 α on inflammatory mediators production by hepatocytes was evaluated in HepG2 cells using RNA interference (RNAi). The knockdown of PGC-1 α expression caused an increase in IL6 expression and release by hepatocytes via the increase in the I κ B α phosphorylation and subsequent activation of NF κ B. Therefore, our data show that PGC-1 α inhibits the production of inflammatory mediators (IL-6) in hepatocytes and provide further evidence of the connections between the metabolic and immune pathways.

Descriptors: liver; inflammation; cytokines; hepatocytes; Interleukin-6; PGC-1 α ; HepG2.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Obesidade, síndrome metabólica e <i>NAFLD</i>	1
1.2. Doença do fígado gorduroso não-alcoólico (<i>NAFLD</i> , do inglês)	4
1.3. Coativador-1 α de receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α)	8
2. Hipótese	10
3. Objetivos	11
3.1. Geral	11
3.2. Específicos	11
3.2.1 Caracterizar o modelo de <i>NASH</i> induzida por dieta	11
3.2.2 Verificar a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicêmico e lipídico hepático	11
3.2.3 Avaliar a inflamação do tecido hepático	11
3.2.4 Avaliar o envolvimento do PGC-1 α na produção de mediadores inflamatórios por hepatócitos	11
4. Material e Métodos	12
4.1. Animais e indução de esteatohepatite não-alcoólica (<i>NASH</i> , do inglês)	12
4.2. Avaliação do desenvolvimento da <i>NASH</i> , coleta de sangue e tecidos	12
4.3. Perfil bioquímico plasmático	12
4.4. Histologia hepática	13
4.5. Extração de RNA do tecido hepático e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)	13
4.6. Extração de proteínas e dosagem de citocinas hepáticas	14
4.7. Cultivo celular	15
4.8. Silenciamento de PGC-1 α por RNA de interferência (RNAi)	15
4.9. Extração de RNA das células e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)	16

4.10. Determinação de citocinas no sobrenadante das células	17
4.11. Detecção do conteúdo proteico por <i>Western Blotting</i>	17
4.12. Análise Estatística	18
5. Resultados.....	18
5.1. Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo nos animais	18
5.2. Determinação do perfil bioquímico plasmático dos animais	19
5.3. Avaliação histologia hepática dos animais.....	20
5.4. Expressão de PGC-1 α , PGC-1 β e dos PPAR α , PPAR γ e PPAR δ	21
5.5. Quantificação de citocinas hepáticas nos animais.....	22
5.6. Expressão de PGC-1 α após o tratamento das células HepG2 com RNAi.....	23
5.7. Influência da expressão de PGC-1 α sobre a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias nas células HepG2.....	25
5.8. Influência da expressão de PGC-1 α sobre citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células HepG2.....	27
5.9. Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 α sobre NF- κ B e Phospho-I κ B α nas células HepG2.....	28
6. Discussão	29
6.1. Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo nos animais	29
6.2. Determinação do perfil bioquímico plasmático dos animais	30
6.3. Avaliação histológica hepática dos animais	30
6.4. Expressão de PGC-1 α , PGC-1 β e dos PPAR α , PPAR γ e PPAR δ	31
6.5. Quantificação de citocinas hepáticas nos animais.....	32
6.6. Influência da expressão de PGC-1 α sobre a produção de IL-6 por hepatócitos (células HepG2).....	34
6.6.1. Mecanismos moleculares envolvidos na modulação da expressão de IL-6 por PGC-1 α	35
7. Conclusão	37
8. Referências Bibliográficas.....	38

1. Introdução

1.1. Obesidade, síndrome metabólica e *NAFLD*

A obesidade é um problema de saúde pública e sua prevalência tem aumentado significativamente ao longo dos últimos 30 anos, tornando-se uma epidemia global (WHO, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), até o ano passado (2015), mais de 700 milhões de adultos seriam obesos (LINHARES et al., 2012). O último inquérito domiciliar realizado no Brasil demonstrou que mais da metade (51%) da população adulta das capitais está com excesso de peso e 17,4% desta está clinicamente obesa (BRASIL, 2013). A obesidade resulta de um desequilíbrio energético prolongado durante o qual o consumo excede o gasto corporal (Feillet-Coudray et al., 2009). Dessa forma, estudos e estratégias no sentido de combatê-la têm sido desenvolvidos nos últimos anos, bem como pesquisas no sentido de compreender sua evolução e a fisiopatologia das doenças associadas (Glanz, et al., 2012).

A obesidade é um importante fator de risco para várias doenças crônicas graves, como diabetes tipo dois, doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral, asma e certas formas de câncer. A consequência física mais importante da obesidade é a doença cardiovascular aterosclerótica (DCV). Uma porção substancial da DCV resultante da obesidade é mediada pelo diabetes tipo dois. Mas a obesidade é acompanhada por vários outros fatores de risco para a DCV, que incluem o fígado gorduroso, os cálculos biliares de colesterol, apneia do sono, osteoartrite e doença do ovário policístico. Estes distúrbios são comumente encontrados em indivíduos que carregam o que chamamos de síndrome metabólica (Grundy, 2004).

A síndrome metabólica é definida por anormalidades que incluem obesidade central, resistência à insulina, hiperlipidemia, hiperglicemia e hipertensão (Reaven, 1988). A prevalência da síndrome metabólica está em ascensão no mundo ocidental e vai levar a aumento de casos de diabetes e doença cardiovascular (Ford et al., 2008). Sedentarismo (Arden et al., 2004) e alto teor de gordura nas “dietas ocidentais” (Feldeisen e Tucker, 2007) têm sido implicados no aumento da síndrome metabólica. Várias vias metabólicas estão implicadas na patogênese da doença, incluindo lipogênese (Roden et al., 1996; Samuel et al., 2004), aumento da inflamação (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997) e redução na oxidação de ácidos graxos (Ji e Friedman, 2007, 2008). Identificar os mecanismos moleculares subjacentes à síndrome metabólica tem sido descrito como um dos esforços mais críticos na medicina moderna (Taubes, 2009).

Os dados disponíveis de estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos descrevem a doença hepática gordurosa não-alcoólica (*NAFLD*, do inglês) como a manifestação hepática da síndrome metabólica (Marchesini et al., 2001). Os principais fatores de risco associados à síndrome metabólica são obesidade abdominal, resistência à insulina, diabetes e dislipidemia (Povel et al., 2011).

Outros autores relataram a prevalência de *NAFLD* em cerca de 57% a 74% e de 22% a 58% das crianças obesas e adultos, respectivamente (Rashid e Roberts, 2000; Tarantino et al., 2007). A esteatohepatite, no entanto, pode ser encontrada em 40% a 100% dos casos de obesidade nos adultos (Tarantino et al., 2007) e 15% a 25% em crianças (Povel et al., 2011). Considerando a obesidade como uma crescente epidemia, a prevalência e o impacto da *NAFLD* continuam a aumentar, tornando a esteatohepatite não-alcoólica (*NASH*, do inglês) potencialmente a causa mais comum de doença hepática avançada nas próximas décadas (Vernon et al., 2011).

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são os achados laboratoriais mais intimamente associados com a presença de doença hepática gordurosa em uma grande série de pacientes, mesmo em indivíduos magros com tolerância à glicose normal (Marchesini et al., 2001; Bloomgarden, 2004; Gupte et al., 2004). A prevalência da *NAFLD* é aumentada em indivíduos com intolerância à glicose e naqueles com diabetes recentemente diagnosticada na proporção de 43% a 62%, respectivamente (Jimba et al., 2005). Em um estudo prospectivo de 100 pacientes com diabetes tipo 2, a incidência de esteatose hepática foi de 49%, confirmando esse forte fator de risco para a *NAFLD* (Gupte et al., 2004). No Brasil, a prevalência da síndrome metabólica e diabetes entre os pacientes com *NAFLD* foi estimada em 41,3% e 22,7%, respectivamente (Cotrim et al., 2011). A associação das duas condições está relacionada com a doença mais agressiva e mortalidade crescente (Ekstedt et al., 2006; Younossi et al., 2004).

A hipertensão, especialmente a hipertensão sistólica, também é um preditor para a *NAFLD*. A presença de múltiplas doenças metabólicas como diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia e hipertensão são associados com uma doença grave, potencialmente progressiva do fígado (Marchesini e Marzocchi, 2007). Cotrim et al. (2011) confirmaram estes dados ao relatar em 64% a prevalência de hipertensão entre pacientes com *NAFLD* e esteatohepatite. Hsiao et al. (2007) demonstraram que a presença de esteatose hepática grave foi significativamente correlacionada com a prevalência e o grau de hipertensão, os níveis de glicose e triglicerídeos séricos. Por outro lado, um estudo em pacientes não-obesos e não-diabéticos com hipertensão

primária mostrou que a prevalência de esteatose hepática pode dobrar, em comparação com o grupo controle (Donati et al., 2004).

O aumento dos triglicerídeos séricos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), combinados com a redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), representam uma ameaça para o desenvolvimento de doença cardiovascular. As evidências sugerem que a *NAFLD* está associada ao aumento da incidência da doença cardiovascular, tanto em não-diabéticos e quanto em diabéticos tipo 2 (Kotronen e Yki-Järvinen et al., 2008).

A presença de dislipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ou ambos) definida pelo National Institute of Health (NIH) (NCEP, 2002) foi relatada em 20% a 80% dos casos associadas com *NAFLD* (Baskin et al., 2005; Diehl et al., 1988; Loria et al., 2009). A hipertrigliceridemia está presente em 64% dos pacientes com esteatose hepática com baixos níveis de HDL em 30%-42% dos casos reportados (Marchesini et al., 2003). Cotrim et al. (2011) relataram a presença de hiperlipidemia em 66,8% dos pacientes com *NAFLD* no Brasil. Estudos têm mostrado a *NAFLD* fortemente associada a um risco aumentado de doença cardiovascular, havendo associação independente entre esteatose hepática, placas ateroscleróticas da carótida e disfunção endotelial (Villanova et al., 2005; Volzke et al., 2005). Considerando-se todas as causas de fígado relacionadas, a doença cardiovascular representa o maior risco de sobrevivência de pacientes com *NASH* (Dudley et al., 2011).

A *NAFLD* pode afetar qualquer idade e parece ser diferente entre os diferentes grupos étnicos. A prevalência é significativamente maior em mulheres brancas do que no homem branco. As diferenças na distribuição de gordura corporal e composição corporal entre os grupos étnicos podem explicar parcialmente as diferenças raciais na prevalência. O fenótipo de obesidade central está associada com aumento da gordura intra-abdominal, portanto, os pacientes com obesidade central são caracteristicamente resistentes à insulina e mais comumente presentes com *NAFLD* em comparação com pacientes com obesidade inferior no corpo (Souza et al., 2012).

Os mecanismos patogênicos da *NAFLD* ainda estão sob investigação. No entanto, os triglicérides acumulados dentro dos hepatócitos, resultantes da resistência à insulina, são considerados o primeiro passo para o modelo proposto e amplamente aceito. O estresse oxidativo resultante da oxidação mitocondrial de ácidos graxos e expressão de citocinas inflamatórias têm sido considerados fatores causais secundários para os danos do fígado, fibrose e inflamação (Day e James, 1998).

1.2. Doença do fígado gorduroso não-alcoólico (*NAFLD*, do inglês)

A doença hepática gordurosa não-alcoólica é a expressão hepática clínica da síndrome metabólica (Petta et al., 2009). Ela representa um espectro de transtornos caracterizados por esteatose hepática predominantemente macrovesicular, que ocorrem em indivíduos na ausência de consumo significativo de álcool (Sanyal, 2002). Neste contexto, é possível distinguir uma condição de fígado gorduroso simples, onde o único achado histológico é a presença de esteatose, de um estado de esteatohepatite não-alcoólica (*NASH*, do inglês), caracterizado por lesão/inflamação hepatocelular com ou sem fibrose. A prevalência da esteatose hepática é de cerca de 20-30% na população geral. Com o rápido aumento nos fatores de risco da síndrome metabólica, a *NAFLD* se tornou a causa mais comum de doença hepática nos países ocidentais (Browning et al., 2004; Bedogni et al., 2005). A relevância clínica da *NAFLD* decorre do fato de que uma proporção considerável de indivíduos (20-30%) desenvolvem *NASH*, e esta condição, ao contrário de simples fígado gorduroso, é uma doença hepática potencialmente progressiva, que pode levar ao estágio final da doença hepática e carcinoma hepatocelular (Fassio et al., 2004; Adams et al., 2005; Ekstedt et al., 2006).

A patogênese da doença hepática gordurosa não-alcoólica não é totalmente compreendida e mesmo colocando a resistência à insulina como um mecanismo preponderante, muitos outros fatores estão implicados tanto no acúmulo de gordura no fígado quanto na progressão da doença para esteato-hepatite não-alcoólica (Petta et al., 2009).

O acúmulo de gordura, principalmente na forma de triglicérides, é a condição necessária para o desenvolvimento da *NAFLD* e *NASH*. A dinâmica de lipídeos nos hepatócitos é controlada tanto por hormônios produzidos distalmente (principalmente insulina) quanto por fatores gerados localmente, e representa o resultado de interações complexas entre os vários tipos de células localizadas em diferentes tecidos (Marra et al., 2008).

Quatro mecanismos patogênicos são considerados responsáveis pelo acúmulo de gotículas de gordura à base de triglicérides (Figura 1), a saber: (i) o aumento da absorção de ácidos graxos livres (AGL) a partir de alimentos com elevado teor de gordura ou de adipócitos da gordura corporal, (ii) o aumento da síntese de AGL no fígado a partir da glicose ou de acetato por resistência à insulina (RI), (iii) a diminuição da β -oxidação mitocondrial de AGL causada por uma grande variedade de drogas e (iv)

a diminuição da secreção de triglicerídeos em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) pelo fígado (Tannapfel et al., 2011; Burt et al., 1998).

Figura 1: Mecanismos patogênicos da esteatose (Fonte: Willebrords et al., 2015).

A resistência à insulina é uma deficiência no metabolismo da glicose. Para superá-la e promover a captação de glicose, os indivíduos com resistência insulínica aumentam a secreção de insulina e reduzem o seu *clearance* (Utzschneider e Kahn, 2006), resultando em alterações metabólicas em outros tecidos. A insulina é um potente inibidor da produção de glicose hepática, a qual é prejudicada pelo quadro de resistência insulínica hepática (Gastaldelli et al., 2006b). Outro alvo importante da RI é o tecido adiposo, em que o efeito antilipolítico da insulina é reduzido, resultando num aumento da liberação de ácidos graxos livres para a circulação sistêmica (Marra et al., 2008).

Indivíduos com *NAFLD* são altamente resistentes à insulina, no que se refere ao: (i) músculo, porque eles apresentam reduzida captação de glicose (Bugianesi et al., 2005); (ii) fígado, porque eles mostram supressão prejudicada de produção endógena de glicose hepática (Bugianesi et al., 2005; Gastaldelli et al., 2006a,b) e (iii) tecido adiposo, porque eles exibem altas taxas lipolíticas e aumento de AGL circulantes (Sanyal et al., 2001; Bugianesi et al., 2005).

Apesar do progresso obtido para a compreensão de como a gordura se acumula no fígado, a patogênese de forma avançada da *NAFLD* permanece por esclarecer. Várias hipóteses têm sido propostas recentemente. Em geral, existe uma associação entre *NAFLD* e resistência à insulina com exceção de algumas condições genéticas específicas que afetam o metabolismo lipídico (Kantartzis et al., 2009a,b; Amaro et al., 2011; Lonardo et al., 2011; Stefan et al., 2011). De acordo com a hipótese original (“*two-hits*”), a esteatose hepática é uma doença progressiva na qual a resistência à insulina (“o primeiro hit”) conduz a um aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado. Se os AGL não são oxidados ou secretados, a esteatose hepática se desenvolve (Day e James, 1998). A esteatose hepática predispõe o fígado ao “segundo hit”, tal como disfunção mitocondrial, citocinas, adipocinas, estresse do retículo endoplasmático (ER, do inglês) e endotoxinas bacterianas. Esta hipótese original foi modificada para sugerir que a *NAFLD* pode ser uma consequência de paralelos “*multi-hits*” (Tilg e Moschen, 2010). Neste modelo, a resistência à insulina conduz ao aumento da lipogênese e aumento da absorção de AGL pelo fígado. A lipotoxicidade sensibiliza o fígado à lesão por “múltiplos hits paralelos” (danos oxidativos, ativação de vias fibrogênicas, ativação de células estreladas hepáticas, expressão alterada de adipocinas) levando à *NASH* e fibrose. Mais recentemente, uma nova teoria, o “distinto-hit”, tem sido proposto para sugerir vias patogênicas distintas para a esteatose hepática e *NASH* (Vernon et al., 2011; Lonardo et al., 2011; Yilmaz, 2012).

Pacientes com *NASH* apresentam disfunção mitocondrial, a qual resulta principalmente da RI e do excesso de AGL (lipotoxicidade). Esse dano mitocondrial causa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inicia a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica das membranas mitocondriais e danos no DNA mitocondrial (DNAm) podem contribuir para a diminuição da função mitocondrial e perpetuar a geração de EROs (Varela-Reyet al., 2009).

A peroxidação lipídica é um potencial candidato na patogênese da *NASH* (Pessayre et al., 2001), uma vez que a peroxidação das membranas mitocondriais pode causar diretamente a necrose/apoptose e gerar megamitocôndria. Os aldeídos, produtos finais da peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), podem estimular a síntese de proteínas de matriz extracelular por células hepáticas estreladas (CHE) com ligação cruzada à citoqueratinas para formar corpos de Mallory e estimular a quimiotaxia de neutrófilos (Zamara et al., 2004). Os produtos da peroxidação lipídica podem também iniciar uma cascata que conduz à ativação do fator

nuclear kappa B (NF- κ B), que levará ao aumento da transcrição de várias citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e ligantes de morte por hepatócitos e células não-parenquimatosas (Moore et al., 2001; Ribeiro et al., 2004). O grau de peroxidação lipídica se correlaciona com a disponibilidade de ácidos graxos, o que pode causar danos consideráveis no fígado esteatótico (Benzie, 1996). MDA e HNE estão aumentadas em 90% nos pacientes com *NASH* em comparação com pacientes com esteatose, ilustrando o aumento de estresse oxidativo (Loguercio et al., 2001).

As citocinas também são candidatos para um papel na progressão da *NAFLD* por razões semelhantes àquelas descritas para EROs e peroxidação lipídica. Em primeiro lugar, as citocinas são capazes de produzir todas as alterações histológicas clássicas da *NASH* incluindo morte/apoptose de hepatócitos (TNF- α /TGF β), quimiotaxia de neutrófilos (IL-8), ativação de CHE (TNF- α /TGF β) e corpos de Mallory (TGF β) (Pessayre et al., 2001). Por outro lado, citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) podem desempenhar um papel na resistência à insulina hepática e sistêmica associada com *NASH* (Arkan et al., 2005). Em terceiro lugar, os estudos em pacientes com obesidade relacionada com *NASH* têm mostrado que, em comparação com os controles obesos, pacientes tem um aumento da expressão de RNAm de TNF- α e dos seus receptores no fígado e tecido adiposo, com o aumento da expressão correlacionando-se com a gravidade histológica (Crespo et al., 2001).

De fato, EROs e produtos de peroxidação lipídica são fatores que induzem inflamação através da produção de citocinas pró-inflamatórias, conduzindo a quimiotaxia de neutrófilos e desencadeando as diversas lesões de *NASH* (Day e James, 1998; Sreekumar et al., 2003; Marra et al., 2008; Oliveira e Stefano, 2015). EROs ativam o NF- κ B, que induz a síntese de TNF- α , bem como um aumento na expressão de várias citocinas, incluindo TGF- β , IL-6, IL-8 e Fas-ligante (Hui et al., 2004). TGF- β , HNE, e IL-8 induzem a quimiotaxia de neutrófilos humanos, o que pode explicar, em parte, o infiltrado de neutrófilos (Carter-Kent et al., 2008).

O aumento do tecido adiposo na obesidade é associado com o desequilíbrio na produção de diversos mediadores pró- e anti-inflamatórios (Kanda et al., 2006). As adipocitocinas desempenham um papel decisivo na cascata inflamatória (Hasegawa et al., 2001; Ding et al., 2005; Ouchi et al., 2011). A adiponectina, quando aumentada, inibe a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Ouchi et al., 2000; Masaki et al., 2004; Wolf et al., 2004), incluindo o TNF- α . Ainda, melhora o metabolismo glicêmico e lipídico (Ouchi et al., 2000; Wolf et al., 2004). Em indivíduos que

apresentaram uma redução nos teores circulantes de adipocitocina foram observadas várias disfunções metabólicas associadas, tais como diabetes, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (Funahashi et al., 2004), sugerindo a existência de associação entre hipoadiponectinemia e o estabelecimento da síndrome metabólica. Por outro lado, os níveis plasmáticos de leptina, que desempenha um papel central no controle da ingestão de alimentos e o gasto de energia, estão aumentados em doentes obesos (Friedman e Halaas, 1998; Chitturi et al., 2002), os quais apresentam resistência à leptina favorecendo o aumento da ingestão calórica. A resistina intra-hepática também está aumentada em pacientes com *NASH* e as células inflamatórias contribuem para a sua expressão (Bertolani et al., 2006).

1.3. Coativador-1 α de receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α)

PGC-1s (Coativador-1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama-PPAR γ), mais especificamente nas suas isoformas PGC-1 alfa e beta (Figura 2), têm sido descritos como os principais reguladores da homeostase energética da célula (Lin et al., 2005). Essa função é exercida através da capacidade dos PGC-1s em se ligarem a fatores de transcrição ou receptores nucleares diretamente ligados à respiração mitocondrial, como receptor do fator respiratório nuclear 1 e 2 (NRF-1, fator respiratório nuclear-1, e NRF-2, fator respiratório nuclear-2), receptores α relacionados a estrógeno (ERR α , do inglês) e receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs) ou outros que controlam a disponibilidade de nutrientes, ácidos graxos e carboidratos (Scarpulla, 2012).

Figura 1: Estrutura e semelhança dos coativadores PGC-1 α e PGC-1 β . Os coativadores PGC-1 α e PGC-1 β compartilham alto grau de homologia, cada um apresentando um domínio de ativação e um domínio de repressão transcricional, um domínio rico em arginina e serina e um domínio de ligação ao RNA (Adaptado de Scarpulla, 2012 e Girnun, 2012).

Em adição ao seu papel central comum no metabolismo oxidativo, PGC-1 α e PGC-1 β regulam vias celulares específicas. PGC-1 α está envolvido na adaptação ao jejum e na gliconeogênese que representa a síntese *de novo* de glicose no fígado, ao passo que o PGC-1 β está envolvido no processo *de novo* da lipogênese através da ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta do esterol (SREBP1, do inglês) (Horton et al., 2003; Ferré e Foufelle, 2010; Lin et al., 2005).

O PGC-1 α , o coativador fundador da família, é descrito como um ativador da termogênese adaptativa em tecido adiposo marrom (Puigserver et al., 1998) e indutor da biogênese mitocondrial (Wu et al., 1999), em parte, através de sua ativação de genes-alvo do NRF e sua interação específica com o NRF-1. Ele também é um potente ativador da biogênese mitocondrial através da ERR α (Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004).

PGC-1 α é o mais estudado e caracterizado PGC-1, e tem sido relatada sua interação com os receptores nucleares PPAR α , HNF4 α (fator nuclear hepático 4 α) e FOXO1 (fator de transcrição “*forkhead*” da família foxO), que são essenciais para a adaptação hepática ao jejum (Lin et al., 2002).

A insulina e o glucagon realizam a homeostase da glicose através da regulação da transcrição de PGC-1 α . O glucagon, através de AMPc, ativa o fator de transcrição ChREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos) que é um regulador essencial do PGC-1 α . Uma vez expresso, o PGC-1 α coativa fatores de transcrição necessários para a indução de genes neoglicogênicos mediados pelo PGC-1 α , tais como HNF4 α e FOXO1. Camundongos com supressão específica de PGC-1 α exibem esteatose hepática devido, pelo menos em parte, a perda da capacidade oxidativa mitocondrial e disfunção mitocondrial. Também demonstraram que a superexpressão de PGC-1 α hepático e subsequente aumento na oxidação de ácidos graxos (OAG), através do conteúdo e/ou função mitocondrial elevados, resulta no armazenamento reduzido de triglicérides tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Morris et al., 2012).

A superexpressão de PGC-1 α em hepatócitos primários de rato resultou em um aumento nos marcadores de conteúdo e função mitocondrial (citrato sintase, DNA mitocondrial, e proteínas do sistema de transporte de elétrons) e um aumento da OAG (Morris et al., 2012). O exercício também aumenta os níveis hepáticos de PGC-1 α em modelos de ratos com acesso à roda de corrida (Laye et al., 2009). No entanto, a administração crônica de dieta rica em gordura reduz os níveis de PGC-1 α hepático em

camundongos WT (tipo selvagem) sedentários, resultando em redução da respiração mitocondrial hepática (Hirschey et al., 2011).

Propõe-se que o PGC-1 α está controlando o metabolismo oxidativo global, tanto por regular a biogênese mitocondrial quanto por suas propriedades intrínsecas na mitocôndria. A atividade de PGC-1 α também é regulada por modificações pós-traducionais tal como acetilação, metilação ou fosforilação. O PGC-1 α é ativado pela SIRT1 (situína 1) por desacetilação e pela p38 MAP quinase através da fosforilação. A inibição do PGC-1 α é mediada através de fosforilação da proteína via AKT e Clk2 e através de acetilação por GCN5 (Feige e Auwerx, 2007; Wright et al., 2007).

Há dados na literatura que mostram que o PGC-1 α , além de estar envolvido nos processos metabólicos, representa uma estratégia terapêutica promissora na modulação da inflamação. Segundo Nijland e colaboradores (2014), níveis acentuados de PGC-1 α reduzem a produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 e quimiocina (motivo C-C) ligante 2 (CCL2), em astrócitos. Seus dados sugerem que o aumento de PGC-1 α funcione como um mecanismo de proteção endógena contra o dano oxidativo e inflamação, reduzindo assim a neurodegeneração.

A perda específica de PGC-1 α no músculo esquelético causa a indução transcricional, nesse órgão de muitos genes que fazem parte de inflamação sistêmica ou local, como IL-6, TNF α (Fator de Necrose Tumoral α), SOCS1 (Supressão de Sinalização de Citocinas), SOCS3 e CD38 (Conjunto de diferenciação 38) (Handschin et al., 2007a,b).

Nosso grupo também tem evidências do papel do PGC-1 α na resposta inflamatória, onde observamos em ratos sujeitos a pancreatite aguda (PA) grave um aumento significativo nos níveis de RNAm de PGC-1 α . Além disso, a expressão de PGC-1 α foi maior em macrófagos peritoneais de animais sujeitos a um insulto bacteriano do que em animais com PA. Além disso, a supressão da expressão de PGC-1 α com antisense prejudicou a fagocitose. Juntos, estes resultados sugerem que o PGC-1 α é expresso diferencialmente durante a inflamação asséptica e infecção, e que é necessário para a fagocitose adequada (Llimona et al., 2014).

2. Hipótese

Como supracitado, formas mais graves de doença hepática, como a NASH, se desenvolvem quando um processo inflamatório se instala secundariamente às desordens metabólicas dos hepatócitos. Considerando as evidências listadas acima sobre o papel

crucial dos coativadores PGC-1 nas interações entre o metabolismo e o processo inflamatório, inclusive no fígado, nos propomos a investigar neste projeto o papel do PGC-1 α nas alterações inflamatórias decorrentes da *NASH* em camundongos que, por sua vez, não está devidamente esclarecido.

Nossa hipótese é que a alteração na expressão de PGC-1 α esteja relacionada com a resposta inflamatória na *NASH*. Assim, devido à ingestão de alta concentração de gordura, a expressão de PGC-1 α é reduzida, modulando a resposta inflamatória positivamente ou negativamente.

3. Objetivos

3.1. Geral

Determinar o papel do PGC-1 alfa na resposta inflamatória da esteatohepatite não-alcoólica.

3.2. Específicos

3.2.1 Caracterizar o modelo de *NASH* induzida por dieta

Estratégia: Camundongos C57black/6 receberam dieta hiperlipídica contendo 30% de gordura por 10 semanas. O peso dos animais foi avaliado semanalmente e no plasma foram determinados a glicemia e o perfil lipídico. Também foi determinado o aspecto histológico do tecido hepático dos animais.

3.2.2 Verificar a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicêmico e lipídico hepático.

Estratégia: Foi feita a extração de RNAm do tecido hepático e a expressão de PGC-1 α , PGC-1 β , PPAR α , PPAR δ e PPAR γ foi avaliada por PCR em tempo real.

3.2.3 Avaliar a inflamação do tecido hepático.

Estratégia: As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β foram dosadas por ELISA.

3.2.4 Avaliar o envolvimento do PGC-1 α na produção de mediadores inflamatórios por hepatócitos.

Estratégia: A expressão de PGC-1 α foi suprimida em cultura de células HepG2 com a utilização de um RNA de interferência (RNAi) específico. As células foram

recolhidas e foi avaliada a expressão do PGC-1 α (RNA_m) por PCR em tempo real e por *Western blotting*. Assim, após a inibição do PGC-1 α nas células HepG2, o sobrenadante foi recolhido e quantificaram-se as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF α e IL-6) no sobrenadante por ELISA e nas células por PCR em tempo real.

4. Material e Métodos

4.1. Animais e indução de esteatohepatite não-alcoólica (NASH, do inglês)

Camundongos machos (C57black/6) de 8 semanas, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram acondicionados em gaiolas contendo cinco animais cada, à temperatura de 23 ± 2 °C, umidade de $54 \pm 9\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e ração. Eles foram divididos em dois grupos experimentais de cinco animais, sendo que o grupo controle (CTR) recebeu ração padrão para roedores (Nuvilab®) durante o período de 10 semanas e o grupo dieta hiperlipídica (DHL) recebeu a ração rica em gordura (52,95% de carboidratos, 20% de proteínas, 30% lipídeos (10% de óleo de coco, 20% de óleo de soja), 5% de celulose, 3,5% de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 0,3% de L-cistina e 0,25% de Bitartarato de colina) por igual período. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de ética em experimentação animal da FMUSP e o projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o protocolo de número 109/15.

4.2. Avaliação do desenvolvimento da NASH, coleta de sangue e tecidos

O desenvolvimento ponderal foi avaliado uma vez por semana. Após 10 semanas, os animais passaram por um jejum (10 – 12 horas) e em seguida foram anestesiados, com xilazina (8 mg/Kg)/cetamina (10 mg/Kg), para posterior laparotomia e coleta de sangue. O sangue foi centrifugado (2.000 rpm, 10 min) para a coleta do plasma e as alíquotas foram armazenadas para as determinações bioquímicas.

Os depósitos adiposos periepídimal e retroperitoneal foram removidos e pesados. O fígado foi separado em duas porções: uma amostra conservada em formol 10% tamponado para avaliação histológica e a outra amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e proteínas.

4.3. Perfil bioquímico plasmático

Foram determinadas as concentrações de glicose (GL), colesterol total (CT), colesterol-HDL (CT-HDL), colesterol-LDL (CT-LDL) e triglicérides (TG) através de método colorimétrico (espectrofotometria), utilizando *kits* comerciais, conforme técnica descrita pelo fabricante (Labtest Diagnóstica SA, Brasil).

4.4. Histologia hepática

As amostras de fígado fixadas em formol 10% tamponado passaram pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão, para posterior microtomia com cortes de 5µm de espessura e coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (100x e 400x), segundo o critério de *score* para esteatose, inflamação lobular e hepatocelular, para a classificação do grau de esteatose e esteatohepatite não-alcoólica.

4.5. Extração de RNA do tecido hepático e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)

Para a extração do RNA total foi adicionado 1 mL de TRIzol (Invitrogen®) nas alíquotas de fígado pulverizado, sendo mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio por amostra, com posterior homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada centrifugação por 15 minutos a 12.000 g/4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e as demais frações desprezadas. Foram adicionados 500 µL de isopropanol, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O produto foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anterior, e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foi adicionado 1 mL de etanol 75%, sendo realizada nova centrifugação, durante 5 minutos a 7.000 g/4 °C. O álcool residual foi retirado e a amostra ressuspensa em ± 20 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato), proporcionalmente ao tamanho do *pellet*. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm, correspondente ao pico de absorção de RNA, e 280 nm, correspondente ao pico de absorção de proteínas, no equipamento NanoVue (GE HealthCare).

A expressão dos genes de interesse foi determinada por Real Time-PCR com sequências de iniciadores específicos (Invitrogen®), como segue abaixo (Tabela 1), utilizando o *kit* SuperScript III Platinum® SYBR Green One-Step (Invitrogen®) no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem) e o resultado foi

calculado sob a razão $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão do gene *housekeeping* $\beta 2M$, também determinado por Real-Time PCR. A reação de RT-PCR foi realizada com 15 μL de volume total, sendo 1,45 μL de água deionizada estéril, 7,5 μL SYBR Green qPCR super Mix-UDG (Invitrogen), 0,3 μL de cada *primer* (sense e antisense) a 10 pmol/mL, 0,3 μL de ROX e 5 μL de RNA (100 ng) diluído em água DEPC.

Os genes pesquisados foram PGC-1 α , PGC-1 β , PPAR α , PPAR δ e PPAR γ . As sequências dos *primers* foram desenhadas conforme dados do Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sintetizadas pela Invitrogen® (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de iniciadores (*primers*) utilizados para realização de RT-PCR em camundongos.

<i>Gene</i>	<i>Sequências</i>	
$\beta 2M$	<i>Sense</i>	CATGGCTCGCTCGGTGACC
	<i>Antisense</i>	AATGTGAGGCGGGTGGAACTG
PGC-1α	<i>Sense</i>	AGCCGTGACCACTGACAACGAG
	<i>Antisense</i>	GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG
PGC-1β	<i>Sense</i>	GGCAGGTTCAACCCCGA
	<i>Antisense</i>	CTTGCTAACATCACAGAGGATATCTTG
PPARα	<i>Sense</i>	ATGCCAGTACTGCCGTTTTC
	<i>Antisense</i>	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT
PPARδ	<i>Sense</i>	TGGAGCTCGATGACAGTGAC
	<i>Antisense</i>	GTACTGGCTGTCAGGGTGGT
PPARγ	<i>Sense</i>	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC
	<i>Antisense</i>	CGCAGGTTTTTGAGGAACTC

4.6. Extração de proteínas e dosagem de citocinas hepáticas

Aproximadamente 350 mg de fígado pulverizado foi homogeneizado em 1 mL de solução de RIPA (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de TRITON X-100, 150 mM de NaCl, 0.1% de SDS) e levado a leve agitação constante por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm/4°C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram diluídas 50 vezes para quantificação e foi utilizada uma diluição seriada de albumina de soro bovino como padrão. A leitura foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro.

As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β foram dosadas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), conforme protocolo do fabricante.

4.7. Cultivo celular

Foi utilizada a linhagem celular HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, as quais foram mantidas em meio Dulbecco MEM (DMEM/vitrocell-embriolife)/HAM F-12 (vitrocell-embriolife), pH 7,4, contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco®). A cultura foi mantida em atmosfera contendo 95% O₂ e 5% CO₂ a 37 °C.

4.8. Silenciamento de PGC-1 α por RNA de interferência (RNAi)

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 6 poços a $1,5 \times 10^5$ células/poço e deixadas *overnight*. Após este período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Foram realizados quatro grupos de acordo com a tabela 2:

Tabela 1: Grupos experimentais usados para o teste de RNA de interferência.

Grupo	Reagentes
Lipofectamina	Opti-MEM I e lipofectamina
Negativo	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência negativa
Sequência 1	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 1 específica para PGC-1 α
Sequência 2	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 2 específica para PGC-1 α

Foram realizados dois grupos controles, um utilizando o meio de cultura de transfecção e lipofectamina (grupo lipofectamina - LIPO) como sendo o controle interno e outro utilizando uma sequência negativa de RNAi, a qual entra na célula mas não interfere na expressão gênica (grupo negativo – NEG) como sendo o controle negativo. Em seguida, utilizamos duas sequências desenhadas especificamente para interferir na expressão de PGC-1 α (sequência 1 e sequência 2).

Foi adicionado 10 nM de concentração final de RNAi e 5 μ L de Lipofectamina RNAi MAX (Invitrogen®) para cada grupo. Essa solução reagiu por 20 minutos para a formação dos complexos em temperatura ambiente. Foi adicionado meio de transfecção Opti-MEM I (Invitrogen®) para totalizar o volume final de 2,5 mL/poço. As sequências específicas para PGC-1 α (Ambion by life technologies) estão descritas na tabela 3:

Tabela 2: Sequências de iniciadores (*primers*) de RNA de interferência (RNAi) utilizados.

<i>RNAi</i>	<i>Sequências</i>	
Sequência 1	<i>Sense</i>	CCUGUUUGAUGACAGCGAAtt
	<i>Antisense</i>	UUCGCUGUCAUCAAACAGGcc
Sequência 2	<i>Sense</i>	GGAGCUCCAAGACUCUAGAtt
	<i>Antisense</i>	UCUAGAGUCUUGGAGCUCctg

As células foram cultivadas por 24 horas após a transfecção com RNAi. Após este período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS e realizado novamente todo o processo de transfecção com RNAi. Depois de 24 horas, totalizando um período de 48 horas com RNAi, as células foram recolhidas para mensuração da expressão de PGC-1 α e os sobrenadantes foram coletados para posterior dosagem de citocinas.

4.9. Extração de RNA das células e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)

Após o tratamento por 48 horas com o RNAi, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 1 mL de TRIzol (Invitrogen®) em cada poço de cultura celular, sendo mantido por 5 minutos em temperatura ambiente e os demais procedimentos foram realizados como descrito anteriormente.

A expressão dos genes de interesse foi determinada como descrito anteriormente e os genes pesquisados foram PGC-1 α , IL-6, TNF- α e IL-1 β . As sequências dos *primers* foram desenhadas conforme dados do Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e sintetizadas pela Invitrogen® (Tabela 4).

Tabela 3: Sequências de iniciadores (*primers*) utilizados para realização de RT-PCR em células HepG2.

<i>Gene</i>	<i>Sequências</i>	
β2M	<i>Sense</i>	GATGAGTATGCCTGCCGTGTG
	<i>Antisense</i>	CAATCCAAATGCGGCATCT
PGC-1α	<i>Sense</i>	CACCAGCCAACACTCAGCTA
	<i>Antisense</i>	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT
IL-6	<i>Sense</i>	CCTTCCAAAGATGGCTGAAA

	<i>Antisense</i>	CAGGGGTGGTTATTGCATCT
TNF-α	<i>Sense</i>	TCCTTCAGACACCCTCAACC
	<i>Antisense</i>	AGGCCCCAGTTTGAATTCTT
IL-1β	<i>Sense</i>	TCTGTACCTGTCCTGCGTGTTG
	<i>Antisense</i>	AGGTGCTGATGTACCAGTTGGG

4.10. Determinação de citocinas no sobrenadante das células

As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β foram quantificadas por ELISA no sobrenadante das células após 48 horas de tratamento com RNAi, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), conforme protocolo do fabricante.

4.11. Detecção do conteúdo proteico por *Western Blotting*

Foi avaliado o conteúdo proteico de anti-PGC-1 α + β (ab72230) (abcam®), NF- κ B p65 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology®) e Phospho-I κ B α (Ser32/Ser36) (Cell Signaling Technology®) em células de cultura. Para tal, após o tratamento das células com o RNAi, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1mg/mL pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). Amostras de 80 μ g de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra e DTT (Dithiothreitol), submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE em gel 7,5% de poliacrilamida para PGC-1 α e NF- κ B p65 e gel 12% para o Phospho-I κ B α . Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho semi-drytransfer (Biorad). Em seguida, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de BSA (albumina bovina) em tampão PBS por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpos primários contra as proteínas de interesse numa diluição de 1:1000 *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase numa diluição de 1:20000 e expostas ao sistema de detecção SuperSignal (Pierce). O conteúdo das proteínas analisadas foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J”, criado por Wayne Rasband do National Institute of Mental Health, NIH, USA.

4.12. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de teste *t*-Student e/ou análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls, usando GraphPad Prism, Inc software, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo nos animais

Avaliamos o peso corporal final e observamos que os animais tratados por 10 semanas com a dieta hiperlipídica (DHL) apresentaram maior ganho de peso (** $p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle (CTR) (Figura 3A). Também avaliamos a deposição do tecido adiposo nos animais e observamos que o grupo DHL apresentou um depósito de gordura intra-abdominal, representado pelo tecido adiposo retroperitoneal (Figura 3B) e periepídimal (Figura 3C), praticamente quatro vezes maior quando comparado ao grupo CTR (** $p < 0,0001$).

Figura 3: Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo intra-abdominal nos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. O peso corporal final (A) referente ao dia da

eutanásia e os pesos do tecido adiposo retroperitoneal (B) e periepididimal (C) em relação a 10 gramas de peso corporal (pc) foram avaliados nos animais controle (CTR) e dieta hiperlipídica (DHL). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 5$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. $**p < 0,01$ e $***p < 0,0001$ DHL *versus* CTR.

Em seguida, avaliamos se a dieta hiperlipídica provocou alterações nos parâmetros bioquímicos plasmáticos do grupo DHL quando comparado ao grupo CTR.

5.2. Determinação do perfil bioquímico plasmático dos animais

Avaliamos o perfil glicêmico e lipídico de jejum dos animais. Observamos que o grupo DHL apresentou uma glicemia de jejum significativamente elevada quando comparado com o grupo CTR ($**p < 0,01$) (Figura 4A). Os resultados também mostram um aumento significativo do colesterol total ($***p < 0,0001$) (Figura 4B), colesterol-LDL (Figura 4C) ($***p < 0,0001$) e dos triglicérides ($*p < 0,05$) (Figura 4E) no grupo DHL quando comparado ao grupo CTR. Já referente ao colesterol-HDL, não houve diferença entre os grupos experimentais (ns - não significante) (Figura 4D).

Figura 4: Determinação do perfil bioquímico plasmático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. A glicose (A), o colesterol total (B), o colesterol-LDL (C), o colesterol-HDL (D) e os triglicérides (E) foram dosados no plasma dos animais controle (CTR) e dieta

hiperlipídica (DHL). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 4-5$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ e ns (não significativa) DHL *versus* CTR.

Nossos dados de aumento de peso corporal e de tecido adiposo, juntamente com o perfil glicêmico e lipídico alterados no grupo DHL frente ao grupo CTR, sugerem a instalação de síndrome metabólica nesses animais. Nosso próximo passo foi investigar se a dieta hiperlipídica causou também mudanças histológicas no tecido hepático dos animais, para avaliar uma possível instalação da doença do fígado gorduroso não-alcoólico/esteatohepatite não-alcoólica (NAFLD/NASH).

5.3. Avaliação histologia hepática dos animais

Quanto à avaliação histológica do tecido hepático dos animais, os resultados mostraram que o grupo DHL (Figura 5B) apresentou esteatose hepática ($p = 0,0013$), inflamação lobular ($p = 0,0039$) e hepatocelular *ballooning* ($p = 0,0004$), segundo critério de *score* proposto por Kleiner et al. (2005) (Figura 5 e Tabela 5). Portanto, podemos inferir a partir desses resultados que o grupo DHL apresenta esteatohepatite não-alcoólica.

Figura 5: Avaliação histológica do tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. As secções histológicas do tecido hepático dos animais controle (CTR) (A) e dieta hiperlipídica (DHL) (B) foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e o espectro de amostra é de uma área de 100 μm .

Tabela 5: Score da avaliação histológica do tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. As lâminas foram analisadas segundo o critério de *score* para classificação do grau de NAFLD/NASH como descrito na metodologia. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 5$). A diferença entre os grupos experimentais (DHL *versus* CTR) foi detectada por meio de teste *t*-Student.

NAFLD/NASH	CTR	DHL	<i>p</i>
Score*			
Esteatose	0,00 ± 0,00	1,80 ± 0,37	0,0013
Inflamação Lobular	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,20	0,0039
Hepatocelular Ballooning	0,00 ± 0,00	1,40 ± 0,24	0,0004

Devido ao comprometimento hepático observado, nosso próximo passo foi investigar a expressão do PGC-1 α e do PGC-1 β no referido tecido para sabermos qual o comportamento deles quando há instalação de NASH. Também investigamos a expressão dos receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs) por estarem envolvidos no metabolismo lipídico e de glicose para avaliarmos se os mesmos estavam exercendo alguma influência no comprometimento hepático observado.

5.4. Expressão de PGC-1 α , PGC-1 β e dos PPAR α , PPAR γ e PPAR δ

A expressão de PGC-1 α se mostrou significativamente diminuída no grupo DHL quando comparado ao grupo CTR (** $p < 0,01$) (Figura 6A). Já o PGC-1 β não apresentou variação entre os grupos experimentais (ns - não significante) (Figura 6B).

Figura 6: Expressão de PGC-1 α e PGC-1 β no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. PGC-1 α (A) e PGC-1 β (B) foram quantificados no tecido hepático dos animais controle (CTR) e dieta hiperlipídica (DHL) por RT-PCR. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 4-5). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. * $p < 0,05$ e ns (não significante) DHL *versus* CTR.

Os receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs, do inglês) foram avaliados e observamos que a expressão de PPAR α ($p = 0,4140$) (Figura 7A), PPAR δ ($p = 0,1355$) (Figura 7B) e PPAR γ ($p = 0,2623$) (Figura 7C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (ns - não significante).

Figura 7: Expressão dos receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs, do inglês) (PPAR α , PPAR δ e PPAR γ) no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. PPAR α (A), PPAR δ (B) e PPAR γ (C) foram quantificados no tecido hepático dos animais controle (CTR) e dieta hiperlipídica (DHL) por RT-PCR. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 5$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. ns (não significante) DHL *versus* CTR.

Após esses resultados, avaliamos a presença de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático para definirmos o perfil inflamatório quando a NASH está instalada e o PGC-1 α diminuído.

5.5. Quantificação de citocinas hepáticas nos animais

As citocinas pró-inflamatórias dosadas no tecido hepático estavam significativamente aumentadas no grupo DHL quando comparadas ao grupo CTR, tais como IL-6 aumentada em aproximadamente 37% ($***p < 0,0001$) (Figura 8A), IL-1 β em 51% ($***p < 0,0001$) (Figura 8B) e TNF- α em 49,5% ($**p < 0,01$) (Figura 8C).

Figura 8: Quantificação das citocinas no tecido hepático dos animais controles e tratados por 10 semanas com dieta hiperlipídica. IL-6 (A), IL-1β (B) e TNF-α (C) foram dosadas no tecido hepático dos animais controle (CTR) e dieta hiperlipídica (DHL). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 4-5). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ DHL versus CTR.

Depois de observarmos uma diminuição da expressão de PGC-1α no fígado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica e caracterizado o perfil inflamatório hepático, investigamos uma possível relação causal entre a diminuição da expressão de PGC-1α e a resposta inflamatória em hepatócitos humanos. Para isso, realizamos experimentos utilizando sequências específicas de RNA de interferência (RNAi) com a finalidade de diminuir a expressão do PGC-1α em células HepG2.

5.6. Expressão de PGC-1α após o tratamento das células HepG2 com RNAi

Foram realizados dois grupos controles, um utilizando o meio de cultura de transfecção e lipofectamina (grupo lipofectamina - LIPO) como sendo o controle interno e outro utilizando uma sequência inespecífica de RNAi, a qual entra na célula mas não interfere na expressão gênica (grupo negativo – NEG) como sendo o controle negativo. Nossos dados mostram que os reagentes utilizados para os testes de transfecção e a sequência negativa utilizada não influenciam na expressão de PGC-1α (ns - não significante) (Figura 9A).

Em seguida, utilizamos duas sequências desenhadas especificamente para interferir na expressão de PGC-1 α . Utilizando as sequências 1 (SEQ 1) e 2 (SEQ 2) específicas para o PGC-1 α foi possível observar uma diminuição em aproximadamente 70% de sua expressão gênica comparando com o controle negativo (NEG) (** $p < 0,0001$), como mostrado na Figura 9B.

Figura 9: knockdown da expressão de PGC-1 α em células HepG2 utilizando RNA de interferência. A expressão gênica de PGC-1 α nos grupos lipofectamina (LIPO) e controle negativo (NEG) - A -, e a diminuição da expressão de PGC-1 α nas sequências específicas 1 (SEQ 1) e 2 (SEQ 2) - B - foi quantificada por RT-PCR. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 6$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste t -Student e/ou análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ SEQ 1, SEQ 2 versus NEG e ns (não significante) LIPO versus NEG.

Também avaliamos a diminuição do conteúdo proteico de PGC-1 α por *Western blotting*. As duas sequências desenhadas especificamente para interferir na expressão de PGC-1 α (SEQ 1 e SEQ 2) diminuíram o conteúdo proteico de PGC-1 α em aproximadamente 60% (SEQ 1) (** $p < 0,01$) e 51,6% (SEQ 2) (** $p < 0,0001$) quando comparadas com o controle negativo (NEG), como mostrado na Figura 10.

Figura 10: Conteúdo proteico de PGC-1 α em células HepG2 após tratamento com RNAi. A avaliação do conteúdo proteico de PGC-1 α nos grupos controle negativo (NEG) e sequências específicas 1 (SEQ 1) e 2 (SEQ 2) foi quantificada por *Western blotting*. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 3$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ SEQ 1 *versus* NEG *** $p < 0,0001$ SEQ 2 *versus* NEG.

Em seguida, fomos investigar se os níveis de expressão de PGC-1 α estariam relacionados com os níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias nas células HepG2.

5.7. Influência da expressão de PGC-1 α sobre a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias nas células HepG2

Nossa análise mostrou que houve associação entre a diminuição da expressão de PGC-1 α e a expressão gênica de IL-6 nas células HepG2 após tratamento com RNAi, já que nos grupos sequências (SEQ 1 e SEQ 2) houve um aumento significativo da expressão de IL-6 quando comparados ao grupo NEG (* $p < 0,05$ SEQ 1 *versus* NEG; *** $p < 0,0001$ SEQ 2 *versus* NEG) (Figura 11). Os resultados também mostraram que houve um aumento significativo na expressão de TNF- α nas células tratadas com a sequência 2 (* $p < 0,05$ SEQ 2 *versus* NEG). Não houve relação entre a expressão de IL-1 β e PGC-1 α (Figura 12B).

Figura 11: Expressão gênica de IL-6 nas células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1α utilizando RNA de interferência. IL-6 foi quantificada nas células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1α com RNA de interferência por RT-PCR. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 6). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ SEQ 1, SEQ 2 versus NEG.

Figura 12: Expressão gênica de TNF- α e IL-1 β nas células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência. TNF- α e IL-1 β foram quantificados nas células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência por RT-PCR. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 5-6). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$ SEQ 2 *versus* NEG e ns (não significante) SEQ 1, SEQ 2 *versus* NEG.

Nosso próximo passo, portanto, foi investigar se os níveis de expressão de PGC-1 α estariam correlacionados com a liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante das células HepG2.

5.8. Influência da expressão de PGC-1 α sobre citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células HepG2

Nossa análise mostrou que houve associação entre a diminuição da expressão de PGC-1 α e a liberação de IL-6 no sobrenadante das células HepG2 após tratamento com RNAi, pois nos grupos sequências (SEQ 1 e SEQ 2) houve um aumento significativo de IL-6 quando comparados ao grupo NEG (** $p < 0,0001$) (Figura 13). Os resultados também mostraram que não houve diferença na liberação de IL-6 entre os grupos LIPO e NEG (ns - não significante) (Figura 13).

Figura 13: Quantificação de IL-6 no sobrenadante de células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência. IL-6 foi dosada no sobrenadante de cultura de células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1 α utilizando RNA de interferência por ELISA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (n = 6). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,0001$ SEQ 1, SEQ 2 *versus* NEG e ns (não significante) LIPO *versus* NEG.

As citocinas IL-1 β e TNF- α não foram detectadas no sobrenadante das células HepG2 após o tratamento com o RNAi.

Em seguida, fomos investigar o mecanismo pelo qual a diminuição nos níveis de expressão de PGC-1 α estariam aumentando a liberação de IL-6 no sobrenadante das células HepG2.

5.9 Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 α sobre NF- κ B e Phospho-I κ B α nas células HepG2

Os resultados mostraram que não houve diferença no conteúdo proteico do NF- κ B entre os grupos negativo (NEG) e sequências específicas 1 e 2 (SEQ 1 e 2) (ns - não significante) (Figura 14). Nossa análise mostrou também que houve um aumento significativo de Phospho-I κ B α no grupo sequência 2 (SEQ 2) quando comparado ao grupo NEG (* p <0,05) (Figura 15).

Figura 14: Avaliação do conteúdo proteico de NF- κ B em células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1 α . A avaliação do conteúdo proteico de NF- κ B nos grupos negativo (NEG) e sequências específicas 1 e 2 (SEQ 1 e 2) foi quantificada por *Western blotting*. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias ($n = 4$). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. ns (não significante) SEQ 1, SEQ 2 *versus* NEG.

Figura 15: Avaliação do conteúdo proteico de Phospho-IκBα em células HepG2 após *knockdown* da expressão de PGC-1α. A avaliação do conteúdo proteico de Phospho-IκBα nos grupos controle negativo (NEG) e sequência específica 2 (SEQ 2) foi quantificada por *Western blotting*. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias (n = 4). A diferença entre os grupos experimentais foi detectada por meio de teste *t*-Student. * $p < 0,05$ SEQ versus NEG.

6. Discussão

6.1. Avaliação do peso corporal e do tecido adiposo nos animais

Os efeitos deletérios de dietas ricas em gordura (DRG) têm sido bastante documentados. De acordo com estudos anteriores que demonstraram que uma alimentação baseada numa DRG favorece o desenvolvimento da obesidade (Winzell e Ahren, 2004; Lee et al., 2011), nossos resultados mostraram que o peso corporal e a deposição do tecido adiposo intra-abdominal (retroperitoneal e periepididimal) nos animais DHL apresentaram um aumento significativo após 10 semanas. Trabalhos anteriores também mostraram que a administração de uma DRG causou aumento significativo de peso corporal e de tecido adiposo após oito (Oliveira et al., 2014) e 12 semanas (Dixon et al., 2013; van der Heijden et al., 2015) em camundongos C57black/6. Além disso, a literatura também relata que um aumento no tempo de permanência de camundongos C57black/6 com uma dieta hiperlipídica levou a um aumento de peso corporal até um máximo de 40 semanas. Só que após esse período o ganho de peso nivelou-se e se manteve elevado até o fim do estudo de 52 semanas (van

der Heijden et al., 2015). Assim, nosso modelo de indução de obesidade por dieta hiperlipídica foi tão eficiente quanto aos reportados pela literatura.

6.2. Determinação do perfil bioquímico plasmático dos animais

Há evidências de que a ingestão de elevado teor de gordura, especialmente um componente elevado de gordura saturada, está associada com a obesidade, resistência à insulina e hiperglicemia em estudos com animais (West e York, 1998; Burcelin et al., 2002; Åhrén et al., 2010). Além disso, nos seres humanos, o excesso de consumo de gordura na dieta promove a resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Lovejoy e DiGirolamo, 1992; Marshall et al., 1994; Vessby et al., 1994).

Correspondendo à taxa de ganho de peso corporal e aumento de tecido adiposo nos camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica, observamos que o grupo DHL apresentou glicemia, colesterol total, colesterol-LDL e triglicérides de jejum significativamente elevado quando comparado ao grupo CTR. As alterações desses marcadores no soro podem ser utilizados como um indicador do grau de acumulação de lipídeos no fígado (Ding et al., 2014). Nossos resultados são consistentes com estudos anteriores sobre a ingestão de dieta rica em gordura que potencialmente leva ao aumento de glicose no sangue associado a uma resistência insulínica em camundongos C57black/6 (Santos et al., 2009; Oliveira et al., 2014). O colesterol total e triglicérides elevados, também observado em estudo anterior realizado em camundongos C57black/6 (Oliveira et al., 2014), poderiam estar relacionados com a redução do efeito lipolítico da insulina, em virtude da resistência insulínica (Marra et al., 2008). O aumento de colesterol-LDL também foi observado em estudo anterior de indução de obesidade e diabetes tipo 2 com a administração de uma dieta rica em gordura (Kuate et al., 2015).

6.3. Avaliação histológica hepática dos animais

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (*NAFLD*) é uma das formas mais comuns de doença hepática crônica nos países desenvolvidos e é frequentemente associada com a obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2. A esteatohepatite não-alcoólica (*NASH*), uma forma avançada de *NAFLD*, é caracterizada por esteatose hepatocelular juntamente com inflamação lobular e fibrose e pode evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Farrell e Larter, 2006).

Dietas ricas em gordura podem causar esteatose hepática (Oliveira et al., 2014) e esteatohepatite não-alcoólica (Dixon et al., 2013; van der Heijden et al., 2015). Nossos

resultados histopatológicos mostraram danos na estrutura hepática, com muitos vacúolos de gotículas de lipídeos nos hepatócitos. E ainda, no presente estudo, o grupo DHL apresentou esteatose hepática, inflamação lobular e balonização hepatocelular significativamente elevados. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que uma dieta rica em gordura causa esteatohepatite não-alcoólica em camundongos C57black/6 (Dixon et al., 2013; van der Heijden et al., 2015).

O fígado é o principal local de síntese e metabolismo de lipídeos. A esteatose hepática caracteriza-se pelo acúmulo excessivo de triglicérides nos hepatócitos quando o influxo e a síntese *de novo* lipídica excede a capacidade de exportação e utilização lipídica hepática (Adams e Lindor, 2007). A esteatose leva a lipotoxicidade, o que provoca a apoptose, necrose, geração de estresse oxidativo e inflamação. A lesão crônica resultante ativa uma resposta fibrogênica. Lesão hepatocelular, inflamação e fibrose são características de *NASH*, que são observados em apenas uma fração dos indivíduos com *NAFLD*, embora os mecanismos exatos que conduzem a partir *NAFLD* à *NASH* permanecem ainda por serem esclarecidos (Marra et al., 2008).

6.4. Expressão de PGC-1 α , PGC-1 β e dos PPAR α , PPAR γ e PPAR δ

A investigação do PGC-1 α na fisiologia do fígado tem sido focada na integração de fatores nutricionais e hormonais, principalmente no controle da gliconeogênese hepática de jejum (Lin et al., 2005). Entretanto, no que se refere à doença metabólica, tem sido observada uma expressão hepática reduzida de PGC-1 α em obesos e indivíduos sedentários quando comparados com controles magros (Croce et al., 2007). Além disso, a expressão hepática de PGC-1 α e a ativação transcricional da biogênese mitocondrial têm sido relatadas como baixas em modelos roedores com esteatose hepática (Aharoni-Simon et al., 2011). Essa deficiência na biogênese mitocondrial associada com a expressão diminuída de PGC-1 α durante o desenvolvimento da doença do fígado gorduroso pode estar relacionado com a grande quantidade de substrato energético circulante e no fígado, fazendo com que este não necessite produzir PGC-1 α para gerar energia. E, de acordo com a literatura, nosso resultado mostrou uma expressão de PGC-1 α significativamente diminuída no grupo DHL quando comparado ao grupo CTR.

O PGC-1 α está envolvido no metabolismo de glicose, regulação de lipídeos e na homeostase energética. O jejum induz a expressão de PGC-1 α no fígado de adulto, o que leva a ativação das enzimas gliconeogênicas fosfoenolpiruvato carboxiquinase

(PEPCK) e glicose-6-fosfatase através da interação com os fatores de transcrição HNF4 α e FOXO-1 (Boustead et al., 2003; Puigserver et al., 2003; Rhee et al., 2003). Portanto, um estado com sobrecarga energética dispensa a produção de PGC-1 α .

Efeitos importantes do PGC-1 se devem à sua capacidade em coativar os receptores ativados por proliferador de peroxissomas (PPARs). Três isoformas de PPARs [PPAR α , PPAR γ e PPAR β (ou δ)] foram identificados e têm um papel central na detecção de níveis de nutrientes e na regulação do metabolismo lipídico e de glicose (Gervois et al., 2007). A ativação do PPAR α exerce efeitos benéficos sobre a obesidade e a esteatose hepática (Chen et al., 2010). Estes efeitos podem ser atribuídos ao PPAR α por induzir a transcrição de diversos genes que estão envolvidos na β -oxidação peroxissomal e mitocondrial e na oxidação microssomal de ácidos graxos, predominantemente no fígado (Reddy e Hashimoto, 2001; Magliano et al., 2013). Já o PPAR δ é crucial para a β -oxidação no músculo esquelético. No fígado são relatadas propriedades anti-inflamatórias por ativação de macrófagos e proteção contra lipotoxicidade. A indução de SCD1 (estearoil-CoA dessaturase 1) pelo PPAR δ promove a diminuição do estresse oxidativo (Roberts et al., 2009; Liu et al., 2011). A regulação positiva do PPAR γ por dietas ricas em gordura maximiza a esteatose hepática através da indução de fatores lipogênicos hepáticos, enquanto que sua ativação parcial conduz ao aumento da expressão de adiponectina e diminuição da resistência à insulina (Souza-Mello, 2015). Em particular, os agonistas de PPAR γ reduzem os níveis de resistina, TNF- α , IL-6 e proteína C reativa em pacientes com diabetes tipo 2 e em doentes com NASH (Bajaj et al., 2004; Belfort et al., 2006). No presente estudo, a expressão hepática do PPAR α , PPAR δ e PPAR γ não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. Portanto, sugere-se que neste estudo os PPARs não estejam interferindo nos processos metabólicos na *NASH*.

6.5. Quantificação de citocinas hepáticas nos animais

As citocinas são mediadores moleculares envolvidos na fisiologia e na fisiopatologia de muitas doenças, nas quais é possível observar um desequilíbrio de mediadores pró-inflamatórios em relação a moléculas anti-inflamatórias (Petta et al., 2009). Neste contexto, é importante ressaltar o papel da IL-6, IL-1 β e TNF- α . Na verdade, estes mediadores, cuja expressão é também fortemente associada com a obesidade visceral, parecem desempenhar um papel decisivo na modulação da cascata

inflamatória, condição que parece ter um papel central, não só para o acúmulo de gordura no fígado, mas também para a progressão da doença.

A sinalização de IL-6 no fígado é iniciada pela ligação de IL-6 ao seu receptor (IL-6R), seguida pela associação ao transdutor de sinal glicoproteína 130 (GP130). Este complexo receptor ativa janus quinase (JAKs), que por sua vez fosforila o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), permitindo a transferência do STAT3 para o núcleo e induzindo a transcrição de moléculas inflamatórias, tais como amiloide sérica A (SAA) 1, SAA2, e haptoglobina (HP), bem como do supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) (Alonzi et al., 2001; Wang et al., 2001; Ramadoss et al., 2009). A proteína SOCS3 inibe a sinalização de insulina hepática através de vários mecanismos, incluindo antagonização do receptor da insulina e a fosforilação e ativação do substrato do receptor de insulina (Senn et al., 2002; Ueki et al., 2004a,b; Torisu et al., 2007). Portanto, o efeito dessensibilizante da insulina pela IL-6 nos hepatócitos é pelo menos em parte resultado da inflamação causada pela IL-6 no tecido hepático (Franckhauser et al., 2008).

A exposição crônica ao excesso de IL-6 pode sensibilizar o fígado a lesão e morte celular por apoptose (Blindenbacher et al., 2003; Howard e Flier, 2006). Níveis séricos de IL-6 são elevados em modelos animais com *NAFLD* (Cressman et al., 2006) e estão associados com a inflamação do fígado (Chitturi et al., 2002). A IL-6 no fígado está associada com a gravidade da esteatose, necroinflamação e fibrose na *NASH* humana (Chitturi et al., 2002; El-Assal et al., 2004) e envolvida no recrutamento de leucócitos em doenças do fígado (Malchow et al., 2011).

A IL-1 β contribui para a ativação de células hepáticas estreladas alterando a produção de fatores de regulação fibrogênica. Entre os fatores fibrinogênicos produzidos pelas CHE, a IL-1 β aumenta de forma significativa a secreção de TIMP-1, um inibidor de metaloproteases da matriz, que inibe a degradação da matriz extracelular para promover a fibrose hepática. Na verdade, camundongos transgênicos que superexpressam TIMP1 apresentam fibrose hepática grave induzida pelo tratamento de tetracloreto de carbono e o tratamento com um anticorpo anti-TIMP1 atenuou a fibrose hepática (Yoshiji et al., 2000; Parsons et al., 2004). IL-1 β induz outros fatores fibrogênicos, incluindo o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), colágeno, e diminuiu a expressão de Bambi, um pseudorreceptor para TGF β (Yoshiji et al., 2002). Assim, a IL-1 β desempenha um papel importante na resposta fibrogênica na *NASH*.

Estudos também mostraram que a IL-1 β promove o acúmulo de lipídios e síntese de triglicerídeos por super-regulação de DGAT2 (diacilglicerol O-aciltransferase 2) em hepatócitos. O aumento do acúmulo de triglicérides por IL-1 β foi observada em hepatócitos TLR9-/- *in vitro*, indicando que mesmo depende da IL-1 β , mas não de TLR9, em hepatócitos. Esse estudo sugere que um baixo nível de IL-1 β está associado com o menor acúmulo de lipídeo em hepatócitos de camundongos TLR9-/- (Miura et al., 2010). Camundongos C57BL/6 de tipo selvagem alimentados com uma dieta rica em gorduras aumentaram o conteúdo proteico hepático de IL-1 β após 12 semanas de dieta (Dixon et al., 2013).

O TNF- α tem participação na resistência insulínica (Nobili et al., 2006), resposta inflamatória (Chalasani et al., 2003), apoptose (Angulo et al., 2004), esteatose e nas mudanças histológicas da *NASH* (Haukeland et al., 2006; Ueki et al., 2004b). A inibição farmacológica do TNF- α , ou de suas vias de sinalização, resulta na melhoria da resistência insulínica, esteatose hepática, inflamação e resposta antioxidante em modelos experimentais e humanos (Li et al., 2003; Feldstein e Gores, 2005; Haukeland et al., 2006; Shoelson et al., 2006). A produção de TNF- α , estimulada por LPS, no sangue periférico, aumenta progressivamente de pacientes controles para pacientes com esteatose e destes para pacientes com *NASH* (Tomita et al., 2006). O TNF- α plasmático é significativamente maior em pacientes obesos com *NASH* do que em obesos sem *NASH*, e a expressão de TNF- α no fígado está associada com a gravidade da fibrose (Adams et al., 2004).

Encontramos concentração aumentada de IL-6, IL-1 β e TNF- α no fígado dos animais DHL, evidenciando, juntamente com os dados histológicos, que nosso modelo experimental induziu *NASH*.

6.6. Influência da expressão de PGC-1 α sobre a produção de IL-6 por hepatócitos (células HepG2)

Uma característica central do PGC-1 α é o seu potencial para impulsionar a biogênese mitocondrial e aumentar o metabolismo oxidativo (Wu et al., 1999). Portanto, sua expressão diminuída causa prejuízo nessas funções. No entanto, tem surgido na literatura evidências de que o PGC-1 α não regula somente vias metabólicas. Camundongos *knockout* músculo-específico para PGC-1 α mostraram um aumento da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, IL-6 e TNF- α , no músculo esquelético, e estes animais também apresentaram níveis séricos elevados de IL-6

circulantes (Handschin et al., 2007b). Nossas análises mostraram que houve associação entre a expressão de PGC-1 α e a liberação de IL-6 no sobrenadante das células HepG2 após tratamento com RNAi, pois nos grupos sequências (SEQ 1 e SEQ 2) houve um aumento significativo de IL-6 quando comparados ao grupo NEG. Resultado semelhante foi obtido quando analisamos a expressão gênica de IL-6 nessas mesmas células.

Segundo Nijland e colaboradores (2014), níveis acentuados de PGC-1 α reduzem a produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, em astrócitos, reduzindo assim a neurodegeneração. Esse fato sugere que o aumento de PGC-1 α funcione como um mecanismo de proteção endógena sobre o dano oxidativo e inflamação. Em contrapartida, nossos animais com *NASH* mostraram um aumento de IL-6 e PGC-1 α diminuído, o que sugere que o excesso de triglicerídeos pode ter diminuído a expressão do PGC-1 α e isso desregulou o efeito protetor anti-inflamatório que ele tem de diminuir a IL-6. Verificamos essa hipótese ao mostrar que a redução de PGC-1 α em células HepG2 leva ao aumento de IL-6. Portanto, a perda da homeostase energética da célula em virtude da diminuição de PGC-1 α leva a perda desse mecanismo de proteção endógena contra a inflamação.

O papel do PGC-1 α que estamos investigando no fígado já foi observado em vários estudos com músculo esquelético. Segundo Handschin e colaboradores (2007a) uma eliminação específica do PGC-1 α do músculo esquelético reduziu o desempenho no exercício e promoveu danos na fibra muscular. Além disso, a perda de PGC-1 α resultou em níveis elevados de fatores pró-inflamatórios localmente no músculo, assim como sistemicamente. Estes resultados sugerem um papel anti-inflamatório para o PGC-1 α . Também em músculo esquelético de pacientes diabéticos, o PGC-1 α mostrou uma correlação negativa com os níveis de IL-6 ou TNF- α independentes do índice de massa corporal (Handschin et al., 2007b). Assim como foi observado que os PGC-1s (PGC-1 α e PGC-1 β) suprimem diferentemente a expressão gênica e secreção no meio de cultura de IL-6 e TNF- α em células musculares que os superexpressam (Eisele et al., 2013).

6.6.1. Mecanismos moleculares envolvidos na modulação da expressão de IL-6 por PGC-1 α

A via do fator nuclear- κ B (NF- κ B) desempenha um papel central na regulação da resposta inflamatória através da transcrição de seus genes alvo, sendo que sua ativação tem sido associada com a obesidade e resistência insulínica em diferentes

órgãos (Cai et al., 2004; Arkan et al., 2005; Zhang et al., 2008; Geng et al., 2015). Ele pode ser ativado por uma variedade de estímulos, tais como citocinas pró-inflamatórias, neurotransmissores, produtos provenientes de vírus e bactérias, bem como estresse físico e químico (Siebenlist et al., 1994; Ghosh et al., 1998). Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B (especialmente o I κ B α) são necessárias para que ocorra a sua translocação para o núcleo (Baeuerle e Baltimore, 1996; Baldwin, 1996). Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I κ B α e o I κ B β , sendo o papel do I κ B α melhor caracterizado.

Vários estímulos como TNF- α , IL-1 e LPS (lipopolissacarídeo) levam à fosforilação do I κ B, que ocorre nas serinas 32 e 36 do I κ B α , e estas são fundamentais para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. O desmembramento do complexo I κ B α /NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo levando a um aumento na expressão de genes alvo (Karin e Ben-Neriah, 2000; Ghosh et al., 1998).. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinases específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase: IKK α e IKK β . O complexo IKK é capaz de discernir entre o I κ B complexado e o I κ B livre, explicando o fato do I κ B poder acumular-se nas células onde o IKK permanece ativado (Zandi et al., 1997).

Sabemos que a expressão de IL-6 é regulada por diversos fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B (Eisele et al., 2013). Portanto, para investigarmos o mecanismo pelo qual a redução dos níveis de PGC-1 α leva ao aumento da expressão gênica e secreção de IL-6 em hepatócitos fomos avaliar a via de sinalização do NF- κ B. Nossos dados mostraram que o *knockdown* de PGC-1 α não altera o conteúdo proteico do NF- κ B p65 em hepatócitos. Em contrapartida, leva ao aumento da fosforilação de I κ B α nas mesmas células. Esse aumento indica um desmembramento do complexo I κ B α /NF- κ B, liberando o NF- κ B para o núcleo, onde induz a expressão de genes pró-inflamatórios (IL-6 e TNF- α , Figuras 11 e 12A). Esses dados sugerem que o PGC-1 α inibe a expressão de IL-6 por estabilizar o complexo I κ B α /NF- κ B.

Dados semelhantes já foram descritos na literatura. Segundo Eisele e colaboradores (2013), PGC-1s (PGC-1 α e PGC-1 β) diminuem a expressão de citocinas pró-inflamatórias pela via de sinalização do NF- κ B em células musculares. Ambos

reduzem a fosforilação do membro p65 da família do NF- κ B, diminuindo assim seu potencial de ativação de transcrição, em células musculares tratadas com TNF- α . De maneira semelhante aos nossos dados, a superexpressão de PGC-1 α nas células musculares também não alterou os níveis basais do NF- κ B p65. Esses dados juntos mostram que os coativadores PGC-1 são capazes de restringir eventos inflamatórios em diferentes tipos celulares, e não somente em células musculares como reportado pela literatura, e fornecem uma ligação molecular entre as vias metabólicas e imunitárias.

A administração da dieta hiperlipídica nos animais levou a diminuição da expressão de PGC-1 α , a qual pode ser um mecanismo de compensação gerado pela quantidade de calorias ingeridas. Em virtude desta diminuição de PGC-1 α , e consequentemente da sua ação, houve um aumento de IL-6 e demais citocinas pró-inflamatórias, resultando na instalação da *NASH*. Esta inflamação do tecido hepático pode ser justificada pela diminuição das defesas anti-inflamatórias, o que levou ao aumento de IL-6. Sendo assim, os nossos dados mostram claramente que a IL-6 pode ser produzida por hepatócitos em resposta a estímulo específico, no caso à diminuição de PGC-1 α . No entanto, vários aspectos dos mecanismos que regulam a produção de IL-6 mediada pela diminuição da expressão de PGC-1 α hepatocelular não estão elucidados e merecem estudos mais aprofundados.

7. Conclusão

A dieta rica em gordura conduz a um estado de esteatohepatite não-alcoólica, aumento dos depósitos de gordura intra-abdominal, hiperglicemia e hiperlipidemia, com aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição na expressão de PGC-1 α no tecido hepático de animais C57black/6. A alteração na expressão de PGC-1 α nos animais parece estar relacionada com a produção de fatores inflamatórios, uma vez que o *knockdown* da expressão de PGC-1 α aumenta a expressão e liberação de IL-6 em hepatócitos via NF- κ B/I κ B α .

8. Referências Bibliográficas

- Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:2365-8.
- Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol*. 2007; 17:863-9.
- Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a populationbased cohort study. *Gastroenterology*. 2005; 129:113-21.
- Adhihetty PJ, Ugucioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood DA. The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 297: C217-25.
- Aharoni-Simon M, Hann-Obercyger M, Pen S, Madar Z, Tirosh O. Fatty liver is associated with impaired activity of PPAR γ -coactivator 1 α (PGC1 α) and mitochondrial biogenesis in mice. *Lab Invest*. 2011; 91:1018-28.
- Ahrén J, Ahrén B, Wierup N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets*. 2010; 2:353-6.
- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation (correction of activation) in the liver. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:1621-32.
- Amaro A, Fabbrini E, Kars M, Yue P, Schechtman K, Schonfeld G, Klein S. Dissociation between intrahepatic triglyceride content and insulin resistance in familial hypobetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. 2010; 139:149-53.
- Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2004; 41:943-9.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002; 346:1221-31.
- Arder CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Després JP, Rankinen T, Bouchard C. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36:1610-5.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005; 11:191-8.

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005; 11:191-8.

Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 1996; 87:13-20.

Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28:783-9.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14:649-83.

Baskin ML, Ard J, Franklin F, Allison DB. Prevalence of obesity in the United States. *Obes Rev*. 2005; 6:5-7.

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005; 42:44-52.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*. 1995; 9:2736-46.

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006; 355:2297-307.

Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 1996; 47:233-61.

Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Ginés P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol*. 2006; 169:2042-53.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2003; 38:674-82.

Bloomgarden ZT. Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*. 2004; 27:824-30.

Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J*. 2006; 20:1889-91.

Boustead JN, Stadelmaier BT, Eeds AM, Wiebe PO, Svitek CA, Oeser JK, O'Brien RM. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4IIE cells. *Biochem J*. 2003; 369(Pt 1):17-22.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *VIGITEL Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013.*

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287:C817-33.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40:1387-95.

Brumbaugh DE, Friedman JE. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res*. 2014; 75:140-7.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005; 48:634-42.

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282(4):E834-42.

Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol*. 1998; 15:246-58.

Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*. 2004; 119:285-98.

Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:1036-42.

Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:2771-6.

Chen H, Dardik B, Qiu L, Ren X, Caplan SL, Burkey B, et al. Cevoglitazar, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma dual agonist, potentially reduces food intake and body weight in obese mice and cynomolgus monkeys. *Endocrinology*. 2010; 151:3115–24.

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. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002; 35:373-9.

Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity. *Hepatology*. 2002; 36:403-9.

Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva R de C, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011; 10:33-37.

Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001; 34:1158-63.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; 274:1379-83.

Croce MA, Eagon JC, LaRiviere LL, Korenblat KM, Klein S, Finck BN. Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes*. 2007; 56:2395–9.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998; 114:842–5.

Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike disease in nonalcoholics. A clinical and histological comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*. 1988; 94:1056-62.

Ding L, Liu JL, Hassan W, Wang LL, Yan FR, Shang J. Lipid modulatory activities of Cichorium glandulosum Boiss et Huet are mediated by multiple components within hepatocytes. *Sci Rep*. 2014; 4:4715.

Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol*. 2005; 166:1655-69.

Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013; 8:e56100.

Donati G, Stagni B, Piscaglia F, Venturoli N, Morselli-Labate AM, Rasciti L, Bolondi L. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. *Gut*. 2004; 53:1020-3.

Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PLoS One*. 2011; 6:e21662.

Eisele PS, Salatino S, Sobek J, Hottiger MO, Handschin C. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2013; 288:2246-60.

Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006; 44:865-73.

Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006; 44:865–73.

El-Assal O, Hong F, Kim WH, Radaeva S, Gao B. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:205-11.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1):S99-S112.

Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology*. 2004; 40:820–6.

Feige JN, Auwerx J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol*. 2007; 17:292-301.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46:624–32.

Feldeisen SE, Tucker KL. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007; 32:46-60.

Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Front Biosci*. 2005; 10:3093-9.

Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: A role for *de novo* lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 2:83-92.

Ford ES, Li C, Zhao G, Pearson WS, Mokdad AH. Prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adolescents using the definition from the International Diabetes Federation. *Diabetes Care*. 2008; 31:587-9.

Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia*. 2008; 51:1306-16.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of bodyweight in mammals. *Nature*. 1998; 395:763-70.

Funahashi T, Matsuzawa Y, Kihara S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. *Int Congress Series*. 2004; 1262:368-71.

Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E, Ferrannini E, DeFronzo RA. The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care*. 2006a; 29:2275-81.

Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Santini E, Ciociaro D, DeFronzo RA, Ferrannini E. The effect of rosiglitazone on the liver: decreased gluconeogenesis in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006b; 91:806-12.

Gauldie J, Richards C, Baumann H. IL6 and the acute phase reaction. *Res Immunol*. 1992; 143:755-9.

Geng S, Zhu W, Xie C, Li X, Wu J, Liang Z, Xie W, Zhu J, Huang C, Zhu M, Wu R, Zhong C. Medium-chain triglycerides ameliorates insulin resistance and inflammation in high fat diet-induced obese mice. *Eur J Nutr*. 2015; [Epub ahead of print].

Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007; 3:145-56.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:225-60.

Girnun GD. The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23:381-8.

Glanz K, Bader MD, Iyer S. Retail grocery store marketing strategies and obesity: an integrative review. *Am J Prev Med*. 2012; 42:503-12.

Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2595-2600.

Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Patel N, Madan A, Amarapurkar A, Hafeezunnisa. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 19:854-8.

Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*. 2007a; 282:30014-21.

Handschin C, Choi CS, Chin S, Kim S, Kawamori D, Kurpad AJ, Neubauer N, Hu J, Mootha VK, Kim YB, Kulkarni RN, Shulman GI, Spiegelman BM. Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 α knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. *J Clin Invest*. 2007b; 117:3463-74.

Harmon RC, Tiniakos DG, Argo CK. Inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 5:189-200.

Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of α -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15:1667-72.

Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjørø K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol*. 2006; 44:1167-74.

Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, Stančáková A, Goetzman E, Lam MM, Schwer B, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Kakar S, Bass NM, Kuusisto J, Laakso M, Alt FW, Newgard CB, Farese RV Jr, Kahn CR, Verdin E. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell*. 2011; 44:177-90.

Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:12027-32.

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

Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*. 2006; 17:365-71.

Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ, Yang YH, Lin WY, Yang JF, Chiu CC, Chuang WL, Tsai TR, Yu ML. Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:2118-23.

Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology*. 2004; 40:46-54.

Ji H, Friedman MI. Reduced capacity for fatty acid oxidation in rats with inherited susceptibility to diet-induced obesity. *Metabolism*. 2007; 56:1124-30.

Ji H, Friedman MI. Reduced hepatocyte fatty acid oxidation in outbred rats prescreened for susceptibility to diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32:1331-4.

Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 2005; 22:1141-5.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006; 116:1494-505.

Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes*. 2009b; 58:2616-23.

Kantartzis K, Machicao F, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. The *DGAT2* gene is a candidate for the dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2009a; 116:531-7.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:621-63.

Kim JA, Wei YZ, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008; 102:401-14

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41:1313-21.

Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*. 2005; 146:3417-27.

Kobayashi T, Yoshida T, Fujisawa T, Matsumura Y, Ozawa T, Yanai H. Metabolomics-based approach for predicting stages of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 445:412-6.

Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:27-38.

Kuate D, Kengne AP, Biapa CP, Azantsa BG, Abdul Manan Bin Wan Muda W. Tetrapleura tetraptera spice attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced obese and type 2 diabetic rats with metabolic syndrome features. *Lipids Health Dis*. 2015;14:50.

Laye MJ, Rector RS, Borengasser SJ, Naples SP, Uptergrove GM, Ibdah JA, Booth FW, Thyfault JP. Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue. *J Appl Physiol* (1985). 2009; 106:161-8.

Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011; 60:2474-83.

Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003; 37:343-50.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005; 1:361-70.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002; 277:1645-8.

Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell*. 2005; 120:261–73.

Linhares RS, Horta BL, Gigante DP, Dias-Da-Costa JS, Olinto MTA. Distribution of general and abdominal obesity in adults in a city in southern Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2012; 28:438-47.

Liu S, Hatano B, Zhao M, Yen CC, Kang K, Reilly SM, Gangl MR, Gorgun C, Balschi JA, Ntambi JM, Lee CH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ/β in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem*. 2011; 286:1237-47.

Llimona F, de Lima TM, Moretti AI, Theobaldo M, Jukemura J, Velasco IT, Machado MC, Souza HP. PGC-1 α expression is increased in leukocytes in experimental acute pancreatitis. *Inflammation*. 2014; 37:1231-9.

Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, Budillon G, Cimino L, Di Carlo A, Di Marino MP, Morisco F, Picciotto F, Terracciano L, Vecchione R, Verde V, Del Vecchio Blanco C. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol*. 2001; 35:568–74.

Lonardo A, Bellentani S, Ratziu V, Loria P. Insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis: Necessary but not sufficient-Death of a dogma from analysis of therapeutic studies? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 5:279-89.

Loria P, Carulli L, Bertolotti M, Lonardo A. Endocrine and liver interaction: the role of endocrine pathways in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 6:236-47.

Lovejoy J, DiGirolamo M. Habitual dietary intake and insulin sensitivity in lean and obese adults. *Am J Clin Nutr*. 1992; 55:1174-9.

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2013; 8:e64258.

Malchow S, Thaiss W, Jänner N, Waetzig GH, Gewiese-Rabsch J, Garbers C, Yamamoto K, Rose-John S, Scheller J. Essential role of neutrophil mobilization in

concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812:290-301.

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

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003; 37:917-23.

Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic syndrome and NASH. *Clin Liver Dis*. 2007; 11:105-17.

Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med*. 2008; 14:72-81.

Marshall JA, Hoag S, Shetterly S, Hamman RF. Dietary fat predicts conversion from impaired glucose tolerance to NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1994; 17:50-6.

Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF α in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004; 40:177-84.

Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007; 213:286-300.

Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice. *Gastroenterology*. 2010; 139:323-34.

Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*. 2001; 7:41-7.

Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM. PGC-1 α and PGC-1 β specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:6570-5.

Morris EM, Meers GM, Booth FW, Fritsche KL, Hardin CD, Thyfault JP, Ibdah JA. PGC-1 α overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced

triacylglycerol accumulation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; 303:G979-92.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143-421.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 2007; 317:121-4.

Nerstedt A, Cansby E, Amrutkar M, Smith U, Mahlapuu M. Pharmacological activation of AMPK suppresses inflammatory response evoked by IL-6 signalling in mouse liver and in human hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2013; 375:68-78.

Nijland PG, Witte ME, van het Hof B, van der Pol S, Bauer J, Lassmann H, van der Valk P, de Vries HE, van Horssen J. Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2:170.1-13.

Nobili V, Manco M, Ciampalini P, Diciommo V, Devito R, Piemonte F, Comparcola D, Guidi R, Marcellini M. Leptin, free leptin index, insulin resistance and liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155:735-43.

Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB, Mars WM. Synthesis of IL-6 by Hepatocytes Is a Normal Response to Common Hepatic Stimuli. *PLoS One*. 2014; 9:e96053.

Oliveira CP, Stefano JT. Genetic polymorphisms and oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis (NASH): A mini review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015; 39 Suppl 1:S35-40.

Oliveira LS, Santos DA, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. *J Nutr Biochem*. 2014; 25:193-200.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NFkappaB signaling through a cAMPdependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296-301.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:85-97.

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; 140:197-208.

Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, Krebs B, Kraft S, Zahn S, Brocks B, Feirt N, Mei B, Cho MS, Ramamoorthi R, Roldan G, Ng P, Lum P, Hirth-Dietrich C, Tomkinson A, Brenner DA. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology*. 2004; 40:1106-15.

Pessayre D, Bearson A, Fromenty B, Mansour A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:57-69.

Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009; 41:615-25.

Povel CM, Boer JM, Reiling E, Feskens EJ. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev*. 2011; 12:952-67.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003; 423:550-5.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998; 92:829-39.

Ramadoss P, Unger-Smith NE, Lam FS, Hollenberg AN. STAT3 targets the regulatory regions of gluconeogenic genes in vivo. *Mol Endocrinol*. 2009; 23:827-37.

Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30:48-53.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595-1607.

Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21:193-230.

Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:4012-7.

Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:1708-17.

Roberts LD, Hassall DG, Winegar DA, Haselden JN, Nicholls AW, Griffin JL. Increased hepatic oxidative metabolism distinguishes the action of Peroxisome proliferator-activated receptor delta from Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the ob/ob mouse. *Genome Med* 2009; 1: 115

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996; 97:2859-65.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004; 279:32345-53.

Santos CF, Carneiro RE, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition*. 2009; 25:818–27.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001; 120:1183-92.

Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002; 123:1705-25.

Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819:1088-97.

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, Kralli A. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPAR gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:6472-7.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002; 51:3391-9.

Shiri-Sverdlov R, Wouters K, van Gorp PJ, Gijbels MJ, Noel B, Buffat L, et al. Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates. *J Hepatol.* 2006; 44:732–41.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116:1793-801.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10:405-55.

Souza MRA, Diniz MFFM, Medeiros-Filho JEM, Araújo MST. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol.* 2012; 49(1):89-96.

Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015; 7:1012-9.

Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003; 38:244-51.

Stefan N, Staiger H, Haring HU. Dissociation between fatty liver and insulin resistance: The role of adipose triacylglycerol lipase. *Diabetologia.* 2011; 54:7–9.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006; 127:397-408.

Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch.* 2011; 458:511-23.

Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22:293-303.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:836-47.

Taubes G. Insulin resistance. Prosperity's plague. *Science.* 2009; 325:256–60.

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

Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor

alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*. 2006; 55:415-24.

Torisu T, Sato N, Yoshiga D, Kobayashi T, Yoshioka T, Mori H, Iida M, Yoshimura A. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes Cells*. 2007; 12:143-54.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004a; 24:5434-46.

Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004b; 101:10422-7.

Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:4753-61.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997; 389:610-4.

Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:562-73.

van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, Gruben N, Youssef SA, de 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 (Albany NY)*. 2015; 7:256-68.

Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:969-76.

Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34:274-85.

Vessby B, Aro A, Skarfors E, Berglund L, Salminen I, Lithell H. The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes*. 1994; 43:1353-7.

Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 42:473-80.

Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J, Schminke U, Kessler C, John U. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:1848-53.

Wang Y, Kinzie E, Berger FG, Lim SK, Baumann H. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep*. 2001; 6:379-85.

West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(3 Suppl):505S-512S.

Willebrords J, Pereira IV, Maes M, Crespo Yanguas S, Colle I, Van Den Bossche B, Da Silva TC, de Oliveira CP, Andraus W, Alves VA, Cogliati B, Vinken M. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res*. 2015; 59:106-25.

Winzell MS, Ahren B. The High-Fat Diet-Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:S215-S9.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323:630-5.

World Health Organization. *Preventing chronic diseases: a vital investment*. Geneva: WHO; 2005.

Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem*. 2007; 282:18793-9.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. 1999. *Cell*. 98:115-24.

Wustefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2000; 32:514-22.

- Yilmaz, Y. Review article: Is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Therap.* 2012; 36:815–23.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology.* 2000; 32:1248-54.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology.* 2002; 36:850-60.
- Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2:262-5.
- Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, Robino G, Tamagno E, Aragno M, Danni O, Autelli R, Colombatto S, Dianzani MU, Pinzani M, Parola M. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2004; 40:60-8.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 1997; 91:243-52.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 2008; 135:61-73.