LÍVIA SAMARA DOS REIS RODRIGUES OKADA

**Avaliação proteômica e lipidômica de pacientes com
esteato-hepatite não alcoólica tratados com ácidos
graxos ômega-3**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky
Waitzberg

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Okada, Livia Samara dos Reis Rodrigues

Avaliação proteômica e lipidômica de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados com ácidos graxos ômega-3 / Livia Samara dos Reis Rodrigues Okada. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Hepatopatia gordurosa não alcoólica/metabolismo 2.Fisiopatologia e terapia 3.Ácido alfa-linolênico 4.Ácido eicosapentaenoico 5.Ácidos docosa-hexaenoicos 6.Ácido araquidônico 7.Proteômica 8.Retículo endoplasmático/patologia 9.Mitocôndrias hepáticas/metabolismo 10.Lipídeos/fisiologia 11.Farmacologia 12.Biossíntese 13.Transtornos do metabolismo dos lipídeos 14.Peroxidação de lipídeos 15.Biologia de sistemas

USP/FM/DBD-130/17

*A minha mãe Maria de Fatima dos Reis Rodrigues:
Por um amor sem medidas.*

*Ao meu pai José Oliveira Rodrigues:
Meu herói.*

*As minhas irmãs Clívia Tamara dos Reis Rodrigues Ferreira e
Lilian Najara dos Reis Rodrigues:
Grandes alegrias de minha vida.*

*Ao meu esposo Maurício Minoru Sano Okada:
Amor da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg, por compartilhar todo o seu vasto conhecimento com os pesquisadores mais jovens, por incentivar e acreditar na pesquisa e na formação do conhecimento científico. Muito obrigada pela grande oportunidade de tê-lo como orientador.

A Prof. Dra. Claudia Pinto Marques de Oliveira, pela confiança depositada neste trabalho, pelo apoio e pelo incentivo sempre presente nas horas mais necessárias e, principalmente, por me proporcionar um ambiente de pesquisa harmônico, alegre e construtivo. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ismael Cotrim Dale Guerreiro, do Laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP, pela cuidadosa padronização e execução da extração de proteínas realizada em tecido hepático parafinado de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica, bem como, pela orientação, pelo apoio e pelas brilhantes sugestões, fatores imprescindíveis para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Puneet Puri da Virginia Commonwealth University-VCU, Richmond, Virginia, USA, pela parceria científica e pelo intercâmbio de conhecimentos, e pela análise e interpretação dos dados.

À Prof. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres, Dra. Geni Sampaio e Dra. Rosana Soares do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, por me acolherem em seu laboratório, orientarem e viabilizarem as análises em cromatografia gasosa com competência e comprometimento.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, professor titular da disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e importante contribuição na leitura cega das lesões histológica e no desenvolvimento desta tese.

À Raquel Torrinhas da Equipe de Metabologia e Nutrição em Cirurgia (Metanutri) do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo compartilhamento de conhecimento científico, pelas pertinentes sugestões, pela revisão cuidadosa desta tese, e pelo auxílio em minhas atividades junto à Metanutri. Meu respeito e minha admiração por sua postura científica. Agradeço pela orientação profissional e pessoal despendidas na execução deste trabalho.

À Graziela Rosa Ravacci da Equipe de Metabologia e Nutrição em Cirurgia do Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração, pelo intercâmbio de experiências/conhecimentos e pelo companheirismo frequentes que, por vezes, amenizaram momentos difíceis vividos durante o desenvolvimento desta tese.

À Elaine Aparecida da Silva, pela frequente disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, coordenador do Departamento de Pós-graduação em Ciências em Gastroenterologia, e Dr. José Jukemura, por zelarem pela qualidade dos cursos oferecidos no programa do referido Departamento e das pesquisas desenvolvidas por seus alunos. Um agradecimento especial à Vilma de Jesus Libério, pela frequente disponibilidade e atenção.

À FAPESP, pelos auxílios financeiros que viabilizaram o desenvolvimento desta tese.

Ao assessor da FAPESP que, por trás de seu anonimato, contribuiu para promover a qualidade científica do estudo que esta tese contempla.

Aos Profs. Ana Maria Pita Lottenberg, Carlos Eduardo Jacob e José Tadeu Stefano, pelas valiosas sugestões oferecidas durante minha prova de qualificação, que, certamente, contribuíram para a qualidade científica desta tese.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Esteato-hepatite não alcoólica	2
1.2 Ácidos graxos ômega-3.....	6
1.3 AGPIs n-3 e modulação inflamatória.....	7
1.4 AGPIs n-3 e modulação metabólica	10
1.5 A ômica da NASH.....	12
1.6 Justificativa do estudo	16
2 OBJETIVO.....	20
3 MÉTODOS.....	22
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Casuística	23
3.3 Obtenção das amostras biológicas.....	24
3.4 Análise histológica do tecido hepático.....	25
3.5 Análise do perfil proteômico (MS ^E) do tecido hepático.....	25
3.5.1 Extração de proteínas do tecido hepático	26
3.5.2 Análise por MSE (MSE).....	26
3.6 Análise do perfil lipidômico plasmático.....	27
3.6.1 Análise do perfil plasmático de classes de lipídios.....	28
3.6.2 Análise do perfil plasmático de AGPIs.....	29
3.7 Cálculo do tamanho da amostra, e processamento e análise estatística dos dados	30

3.7.1 Processamento e análise estatística dos dados de proteômica do tecido hepático	31
3.7.2 Processamento e análise estatística dos dados de lipidômica plasmática	31
4 RESULTADOS	34
4.1 Variáveis descritivas dos pacientes.....	34
4.2 Alterações histológicas.....	35
4.3 Resposta proteômica hepática à suplementação com AGPIs n-3.....	35
4.4 Resposta lipidômica plasmática à suplementação com AGPIs n-3	50
5 DISCUSSÃO.....	54
5.1 Da contribuição científica	54
5.2 Do método	55
5.3 Dos resultados	56
6 CONCLUSÕES.....	65
7 ANEXOS.....	67
7.1 Anexo A – Aprovação do protocolo do estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa	67
7.2 Anexo B – Lista complementar de proteínas alteradamente (versus antes do tratamento) expressas no tecido hepático de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica após o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.....	68
8 REFERÊNCIAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido araquidônico
AG:	Ácido graxo
AGPIs n-3:	Ácidos graxos ômega-3
AGPIs:	Ácidos graxos poli-insaturados
AKT:	Proteína quinase B
ALA:	Ácido alfa-linolênico
ALDH4A1:	Família 4 aldeído desidrogenas, membro 1
ALDOB:	Aldolase frutose-bisfosfato B
ALOX15:	Araquidonato lipoxigenase15
ALT:	Alanina aminotransferase
ANXA5:	Anexina A5
APO J:	Apolipoproteína J
ARRDC2:	Domínio arrestina contendo proteína 2
AST:	Aspartato aminotransferase
AT:	Antes do tratamento
ATC:	Ciclo do ácido tricarboxílico
ATF6:	Fator ativador de transcrição 6.
ATP:	Adenosina trifosfato
CBR1:	Carbonil redutase 1
CHC:	Carcinoma hepatocelular
ChREBP:	Proteína ligante do elemento regulado por carboidrato
CPSM:	Carbamoil fosfato sintase M
CSAD:	Cisteína descarboxilase do ácido sulfínico
DAG:	Diacil-glicerol
DCN:	Decorina
DHA:	Ácido docosaexaenoico
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2

DPA:	Ácido docosapentaenoico
DT:	Depois do tratamento
ENO3:	Enolase 3
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
ERE:	Estresse do retículo endoplasmático
FABP:	Proteína de ligação de ácidos graxos
FABPL:	Proteína ligante de ácidos graxos, fígado
FASTKD2:	FAST quinase domínio 2
FASTKD2:	Proteína FAST quinase 2
FAZ:	Enzima ácido graxo sintase
FID:	Detector de ionização em chama
FXR:	Receptor X farnesoide
G3P:	Gliceraldeído 3-fosfato
GGT:	Gama-glutamyltransferase
GLP:	Glicerofosfolípides
GPC:	Glicerofosfocolina
HAOX1:	Hidroxiácido oxidase 1
HAUS6:	HAUS augmina-like subunidade complexo 6
HDL:	Lipoproteína de alta densidade
HNF4 α :	Fator nuclear 4 α de hepatócito
ICAM5:	Molécula de adesão intercelular 5
IDH3A:	Isocitrato desidrogenas 3 ^a
IMC:	Índice de massa corpórea
IRE1:	Enzima requerente de inositol 1
JNK:	c-Jun N-quinase terminal
KPYR:	Piruvato quinase
LDHC:	Cadeia C L-lactato desidrogenase
LDL:	Lipoproteína de baixa densidade
LTB4:	Leucotrieno B4
LTB5:	Leucotrieno B5
LXR:	Receptores X do fígado

MAM:	Membrana mitocondrial associada ao retículo endoplasmático
mTOR:	Rapamicina
mTORC2:	Complexo 2 da rapamicina
n-3:	Ômega-3
n-6:	Ômega 6
NAFLD:	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NAS:	Escore de atividade de esteato-hepatite não alcoólica
NASH:	Esteato-hepatite não alcoólica
NF-κB:	Fator de transcrição nuclear κB
NLGN4X:	Neuroligina-4, ligante-X
NLGN4Y:	Neuroligina-4, ligante-Y
Nrf2:	Fator relacionado ao E2
OPLS-DA:	Análise discriminatória ortogonal parcial dos quadrados mínimos
PAF:	Fator de agregação plaquetária
PCA:	Análise de componentes principais
PCK2:	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 2, mitocondrial
PEBP1:	Proteína ligante de fosfatidiletanolamina 1
PERK:	Quinase pancreática do retículo endoplasmático
PGE2:	Prostaglandina E2
PGE3:	Prostaglandina E3
PGM1:	Fosfoglicomutase 1
PGRM1:	Receptor de progesterona associada à membrana 1
PGRMC2:	Componente do receptor de progesterona associada à membrana 2
PLGs:	Protein Lynx Global Server
PPAR:	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPIA:	Peptidilprolil isomerase A
PRDX6:	Peroxiredoxina 6
PTEN:	Homóloga de fosfatase e tensina
RI:	Resistência à insulina

ROS:	Espécies reativas de oxigênio
RPS27A:	Proteína ribossomal ubiquitina-40S S27a
SM:	Síndrome metabólica
SREBP:	Elemento de resposta a esterol
SUGT1:	Supressor do alelo homólogo G2 SKP1
TAG:	Triacil-glicerol
THIM:	Tiamina
TLR:	Receptor toll like-4
TNF:	Fator de necrose tumoral
TPIS:	Triosefosfato isomerase
TX2:	Tromboxano 2
TX3:	Tromboxano 3
UBA52:	Proteína ribossomal ubiquitina-60S L40
UBB:	Poliubiquitina-B
UPR:	Resposta a proteínas desdobradas
VIP:	Importância da variável na projeção
VLDL:	Lipoproteína de muito baixa densidade
XBP1:	X-Box proteína de ligação 1
ZNF445:	Proteína dedo de zinco 445

LISTA DE SÍMBOLOS

%:	Porcentagem
μL:	Microlitros
<:	Menor
=:	Igual
>:	Maior
dL:	Decilitros
g:	Gramas
kg:	Quilogramas
L:	Litros
m ² :	Metros quadrados
mL:	Mililitros
ppm:	Partes por milhão
U:	Unidades

LISTA DE SIGLAS

EUA:	Estados Unidos da América
HC-FMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
UK:	Inglaterra

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos ômicos em doença hepática gordurosa não alcoólica/esteato hepatite não alcoólica.....	15
Tabela 2 -	Características descritivas de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica, antes e após suplementação com ácidos graxos ômega-3.....	34
Tabela 3 -	Proteínas exclusivamente expressas no tecido hepático do grupo antes da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3	36
Tabela 4 -	Proteínas exclusivamente expressas no tecido hepático do grupo após suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3	37
Tabela 5 -	Vias principais de proteínas exclusivamente e alteradamente (<i>versus</i> antes do tratamento) expressas no tecido hepático de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica após o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3	40
Tabela 6 -	Classes lipídicas com maior representatividade identificadas em amostras plasmáticas de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica antes (AT) e após (DT) tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, conforme identificação por análise de OP.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), segundo a teoria dos múltiplos impactos paralelos. Adaptado de TILG AND MOSCHEN, 2010.	3
Figura 2 -	Vias de sinalização sensíveis ao estresse do retículo endoplasmático (Adaptado de: Tilg & Moschen, 2010).	5
Figura 3 -	Mecanismos de ação de ácidos graxos ômega-3 na modulação da resposta inflamatória	8
Figura 4 -	Mecanismos de ação de ácidos graxos ômega-3 na modulação da atividade de fatores de transcrição de genes relacionados ao metabolismo.	11
Figura 5 -	Representação esquemática das porções obtidas com aplicação do protocolo Bligh-Dyer.	28
Figura 6 -	Redes construídas considerando as proteínas identificadas por ESI-QTOF MS.	38
Figura 7A -	Análise de Interactome mostrando alterações funcionais de alterações funcionais da via de transporte intracelular de lípidos no fígado, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.	44
Figura 7B -	Análise de Interactome mostrando alterações funcionais de alterações funcionais da via de transporte intracelular de lípidos no fígado, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.	45
Figura 8A -	Análise de Interactome mostrando a via antioxidante no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.	46
Figura 8B -	Análise de Interactome mostrando a via antioxidante no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.	47
Figura 9 -	Análise de Interactome mostrando modulação do retículo endoplasmático em tecido hepático de pacientes com HNA, após o tratamento com PUFA n-3. As funções discutidas neste relatório são indicadas com sombra roxa.....	48

Figura 10A -Análise de Interactome mostrando a modulação da via respiratória celular no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.49

Figura 10B -Análise de Interactome mostrando a modulação da via respiratória celular no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Perfil lipidômico (OPLS-DA) de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados por meio de suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3	51
Gráfico 2 -	<i>Variable importance projection</i> (VIP) dos lipídios plasmáticos de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados com suplementação de ácidos graxos ômega-3.	52

RESUMO

Okada LSRR. *Avaliação proteômica e lipidômica de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados com ácidos graxos ômega-3* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A esteato-hepatite não alcoólica (*NASH*) é considerada problema de saúde pública, dada sua crescente incidência e seu possível papel na carcinogênese hepato-celular. Terapias atuais envolvem alterações de dieta e estilo de vida, mas têm seu resultado prejudicado pela baixa aderência dos pacientes. Abordagens farmacológicas ainda são precárias. Uma grande dificuldade no manejo de *NASH* reside no limitado entendimento de sua fisiopatologia, que parece envolver complexas alterações metabólicas e inflamatórias. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs n-3) são reconhecidos por suas propriedades moduladoras do metabolismo lipídico e da inflamação, e estão diminuídos em pacientes com *NASH*. O uso clínico de AGPIs n-3 tem mostrado benefício no controle da esteatose e na produção de marcadores da resposta metabólica e inflamatória em *NASH*, embora com algumas observações contraditórias. A compreensão de mecanismos moleculares modulados por AGPIs n-3 em *NASH* podem ser úteis para identificar alvos moleculares que auxiliem no desenho de intervenção farmacológica efetiva. Nesse sentido, ciências ômicas são particularmente úteis para a compreensão de mecanismos moleculares com alto valor translacional para a prática clínica e podem contribuir para a identificação desses alvos. **OBJETIVO:** O presente estudo avaliou a resposta proteômica hepática e lipidômica plasmática de pacientes com *NASH* perante o tratamento com AGPIs n-3. **MÉTODO:** As avaliações proteômicas e lipidômicas foram desenvolvidas por espectrometria de massas e/ou cromatografia gasosa em amostras de biópsias hepáticas e plasma coletadas de pacientes envolvidos em estudo preliminar, realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O referido estudo envolveu pacientes adultos, de ambos os sexos e com diagnóstico de *NASH* tratados diariamente, durante 6 meses, com 3 cápsulas contendo mistura de óleo de linhaça e óleo de peixe [0,315 g AGPIs: sendo 0,065 g de ácido eicosapentaenoico (EPA), 0,050 g de docosahexaenoico (DHA) e 0,2 g alfa linolênico (ALA) por cápsula]. Pacientes, após o tratamento com AGPIs n-3, que apresentaram altas concentrações plasmáticas de ALA e/ou DHA e/ou baixas de ácido araquidônico (AA) mostraram melhora parcial das alterações de histologia hepática. No presente estudo, avaliamos as vias proteômicas e marcadores lipidômicos resultantes do tratamento com AGPIs n-3. Isto foi feito por meio da comparação, antes (grupo AT) e depois do tratamento (grupo DT), de pools de tecido hepático (análise por interactoma) e amostras de plasma (OPLS-DA). **RESULTADOS:** Foram identificadas proteínas hepáticas,

exclusivamente e/ou alteradamente expressas, no grupo DT, relacionadas com vias de matriz celular, metabolismo lipídico, de estresse oxidativo, e de retículo endoplasmático e respiração celular. Com excessão da via de matriz celular, a análise do interactoma revelou alteração funcional significativa das vias moduladas por essas proteínas. Em conjunto, essas alterações foram sugestivas de diminuição de lipotoxicidade, estresse oxidativo e respiração anaeróbia, e aumento de respiração aeróbia após tratamento com AGPIs n-3. Estas modificações são marcadores potenciais de melhora de função de retículo endoplasmático e mitocondrial. Em adição, após o tratamento com AGPIs n-3, o perfil lipidômico plasmático mostrou-se alterado com significativo aumento de glicerofosfolípides, ALA e EPA, e diminuição de ácido araquidônico (n-6) e da razão AGPIs n-6/n-3. Estes dados são concordantes com potencial melhora das funções de retículo endoplasmático e mitocondriais. **CONCLUSÃO:** O tratamento com AGPIs n-3 em pacientes com NASH influenciou favoravelmente o perfil proteômico hepático e lipidômico sistêmico. Em conjunto, essas alterações sugerem melhora da função de retículo endoplasmático e mitocondrial, com potencial impacto na homeostase celular, por meio da modulação de diferentes vias biológicas.

Descritores: Esteato-Hepatite não Alcoólica/Metabolismo, Fisiopatologia e Terapia; Ácido Alfa-Linolênico; Ácido Eicosapentaenoico; Ácido Docosa-hexaenoico; Ácido Araquidônico; Proteômica; Lipidômica; Retículo Endoplasmático/Patologia; Mitocôndrias Hepáticas/Metabolismo; Lipídeos/Fisiologia, Farmacologia, Análise e Biossíntese; Transtornos do Metabolismo dos Lipídeos; Peroxidação de Lipídeos; Biologia de Sistemas.

ABSTRACT

Rodrigues, LSR. *Proteomics and lipidomics evaluation of patients with nonalcoholic steatohepatitis treated with omega-3 fatty acids* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUCTION: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered a public health problem, given its increasing incidence and its possible role in hepatocellular carcinogenesis. Current therapies involve diet and lifestyle changes, but its applicability suffers from low patients adherence. Pharmacological approaches are still missing. A main difficulty in the NASH management lies in the limited understanding of its pathophysiology, which seems to involve complex metabolic and inflammatory disturbances. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) are recognized for its modulatory properties on lipid metabolism and inflammation and are decreased in patients with NASH. The clinical use of these PUFAs has shown benefit in controlling steatosis and the production of metabolic and inflammatory response markers in NASH, despite some conflicting reports. Understanding mechanisms modulated by n-3 PUFAs in NASH may be useful for identifying molecular targets that could assist in the design of effective pharmacologic interventions. In this sense, omics sciences are particularly useful for understanding molecular mechanisms with high translational value to clinical practice and may contribute to the identification of these targets. **AIM:** This study evaluated the liver proteomic and plasma lipidomics responses of patients with NASH towards treatment with n-3 PUFAs. **METHODS:** The proteomic and lipidomic evaluations were studied by mass spectrometry and / or gas chromatography in samples from liver biopsies and plasma collected from patients enrolled in a preliminary clinical trial of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. This study involved adult patients of both sexes diagnosed with NASH treated daily for 6 months, with 3 capsules containing a mixture of linseed and fish oils [0.315 g PUFAs: 0.065 g eicosapentaenoic acid (EPA) , 0.050 g docosahexaenoic (DHA) and 0.2 g alpha linolenic acid (ALA) per capsule]. Patients, after treatment with n-3 PUFAs, with higher concentrations of ALA and DHA and lower arachidonic acid (AA) showed improvement of liver histology alterations. In the present study we evaluated the proteomics pathways and lipidomics markers resulted from treatment with PUFAs n-3. This was performed by comparing, before (BT group) and after (AT group) treatment, liver tissue pools (analysis interactome) and plasma samples (OPLS-DA). **RESULTS:** It was identified, in a way exclusive and altered, the expressed liver proteins in AT group, related to pathways of cellular matrix, lipid metabolism, oxidative and endoplasmic reticulum stress and cellular respiration. With the exception of cell matrix, the analysis of the interactome revealed substantial functional alterations of the pathways modulated by

these proteins. Together, these changes were suggestive of decreased lipotoxicity, oxidative stress and anaerobic respiration and increased aerobic respiration following treatment with PUFAs n-3. These modifications are potential markers of endoplasmic reticulum and mitochondrial functions improvement. In addition, after treatment with n-3 PUFAs, the lipidomics profile was modified, with significant increase in glycerophospholipids, ALA and EPA and decrease of arachidonic acid (AA) and n-6/n-3 AGPIs ratio. These findings are concordant with potential improvement of reticulum endoplasmic and mitochondrial functions. **CONCLUSION:** In patients with NASH the treatment with n-3 PUFAs favorably influenced hepatic proteomic and systemic lipidomics profiles. Together, these changes suggest improved endoplasmic reticulum and mitochondrial functions, with potential impact on cellular homeostasis through the modulation of different biological pathways.

Descriptors: Non-alcoholic Fatty Liver Disease; Alpha-Linolenic Acid; Eicosapentaenoic Acid; Docosahexaenoic acid; Arachidonic Acid; Proteomics; Lipidomics; Endoplasmic Reticulum; Mitochondria, Liver; Lipids, Lipid Metabolism Disorders, Lipid Peroxidation; Systems Biology.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esteato-hepatite não alcoólica

A esteato-hepatite não alcoólica (do Inglês, *NASH*) constitui fase intermediária da doença hepática gordurosa não alcoólica (do Inglês, *NAFLD*). Histologicamente, se caracteriza por progressivo acúmulo de gordura (esteatose) macro/microvesicular, infiltrado inflamatório lobular misto e balonização hepatocelular em área da veia centro lobular (zona III), com ou sem fibrose e presença de corpúsculos de Mallory¹⁻³. Essas alterações podem culminar em cirrose hepática (aproximadamente, 10-29%, no período de 10 anos) e, eventualmente, carcinoma hepatocelular (CHC; aproximadamente, 4-27% dos pacientes que progridem com cirrose, no período de 10 anos)³.

NASH é, atualmente, reconhecida como problema de saúde pública mundial. Sua incidência é alta, atingindo cerca de 6 milhões de pessoas nos Estados Unidos, e se associa com aumento de seus principais fatores de risco – diabetes, obesidade e dislipidemia.¹ Sabidamente, as alterações inflamatórias e metabólicas envolvidas nesses fatores de risco estão envolvidas na patogênese de *NASH*, mas a identidade e sequência dos mecanismos, pelos quais estas ocorrem, permanecem em discussão.

Em 1998, Day⁴ e colaboradores propuseram o modelo de dois impactos (*two hits*), na tentativa de fornecer uma base racional fisiopatológica para a progressão do dano hepático. Neste modelo, o primeiro impacto (*first hit*) seria o acúmulo de ácidos graxos (AG) nos hepatócitos e o segundo impacto (*second hit*) seria o aumento do estresse oxidativo e endotoxemia crônica, desencadeando inflamação e fibrose. Atualmente, essa teoria vem perdendo força para a teoria contemporânea dos múltiplos impactos paralelos (*multiple parallel hits*)⁵.

A teoria dos múltiplos impactos paralelos destaca a resistência à insulina (RI) como condição inicial para o acúmulo de AGs no hepatócito,

uma vez que favorece a lipogênese e inibe a lipólise⁶. A RI seria seguida por uma sequência de eventos, como aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático (ERE), disfunção mitocondrial e endotoxemia crônica (**Figura 1**). Como resultado, o fígado esteatótico se tornaria vulnerável a esses múltiplos impactos, culminando com lesão hepatocelular, inflamação e fibrose⁵.

Figura 1 - Progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), segundo a teoria dos múltiplos impactos paralelos. Adaptado de TILG AND MOSCHEN, 2010.

Legenda - Na primeira fase de *NAFLD*, no fígado, ocorre acúmulo excessivo de ácidos graxos (AGs) livres por resistência à insulina (RI). Fatores de transcrição (SREBP-1c e PPAR-alfa) ativam enzimas-chave da lipogênese e síntese de AGs livres no fígado. Na segunda fase (progressão para *NASH*), a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta, principalmente pelo estresse da beta-oxidação mitocondrial (EM) e do retículo endoplasmático (ERE), que conduzem à peroxidação lipídica. Esta pode aumentar a produção de citocinas inflamatórias e promover morte celular, inflamação e fibrose. Simultaneamente, mediadores do tecido adiposo e a endotoxemia (intestino) contribuem para esse processo. ATP: adenosina trifosfato.

Estudos em modelos animais e o acompanhamento da evolução da doença em humanos forneceram subsídios para a descrição de biossistema que atende à teoria de múltiplos impactos. Esse biossistema envolve vias

metabólicas potencialmente inter-relacionadas com as diferentes etapas de *NAFLD* e destaca a importância potencial do estresse de retículo endoplasmático (ERE) e mitocondrial em vários aspectos da *NASH*. Postula-se que o ERE prolongado possa afetar a regulação do metabolismo hepático dos lipídios, promovendo esteatose e *NASH*, e diminuir a função mitocondrial, propiciando apoptose celular mediada por mitocôndria e, consequentemente, disfunção hepática⁵.

O ERE está relacionado ao acúmulo de proteínas desdobradas, cuja demanda está aumentada em condições de doença e/ou estressantes, como *NASH*. Na tentativa de recuperar a homeostase celular, o retículo endoplasmático ativa a chamada “resposta a proteínas desdobradas” (do Inglês, *UPR*)^{7,8}. A *UPR* se associa à ativação de vias de transdução de sinais que podem contribuir para a inflamação, resistência à insulina e lipogênese *de novo*^{9,10} **Figura 2**. Adicionalmente, o retículo endoplasmático está intimamente relacionado com a mitocôndria^{11,12}, com quem se comunica através da membrana mitocondrial associada ao retículo endoplasmático (do Inglês, *MAM*)¹³. A *MAM* tem sido descrita como uma plataforma para ativação de várias vias de estresse celular, que incluem apoptose, inflamação, resposta à autofagia e *UPR*¹⁴.

Um dos fatores apontados como possível indutor de estresse celular e, consequentemente, ERE é o desequilíbrio crônico entre a oferta e a demanda de nutrientes⁵. O consumo excessivo de energia tem sido associado a alterações relacionadas com o metabolismo, incluindo aquelas que caracterizam a *NAFLD*, atualmente, reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM). Um evento comum na etiologia dos distintos componentes da SM é a RI, intimamente ligada à fisiopatologia do *NASH*⁶.

O aumento da prevalência de obesidade está associado com aumento da prevalência de *NAFLD* e SM. Em estudo populacional multiétnico, que incluiu mais de 2.000 indivíduos, a *NAFLD* foi diagnosticada em apenas 9% dos indivíduos com índice de massa corporal (IMC) <25 kg/m² e em 51% daqueles com IMC>35 kg/m²¹⁵. Notadamente, a obesidade e seus distúrbios

metabólicos são consequência do estilo de vida atual e, portanto, um padrão dietético inadequado pode estar relacionado com o desenvolvimento de *NAFLD/NASH*.

Figura 2 - Vias de sinalização sensíveis ao estresse do retículo endoplasmático (Adaptado de: Tilg & Mos Then, 2010).

Legenda - A resposta ao acúmulo de proteínas desdobradas (UPR) no retículo endoplasmático (RE) ativa diferentes vias de sinalização sensíveis ao estresse: quinase pancreática do RE (do Inglês, PERK), enzima requerente de inositol 1 (do Inglês, IRE1) e fator ativador de transcrição 6 (ATF6). A ativação dessas vias resulta em aumento da lipogênese hepática, via proteína de ligação-1 X-Box (XBP1) (1, 2 e 3); aumento da resistência à insulina e inflamação, via c-Jun N-quinase terminal (JNK) (4); ativação do fator de transcrição nuclear κB (do Inglês, NF-κB), via enzima-1 requerente de inositol (IRE1) (5); inibição direta da sinalização por leptina (6); receptor toll like-4 (TLR4) ativa IRE1 e seus alvos moleculares em sequência (*downstream*) (7).

Outro estudo, também de base populacional, avaliou o padrão alimentar de pacientes com *NAFLD*, e verificou que o alto consumo de refrigerante e carne vermelha, somado ao baixo consumo de peixe dessa população, aumentou o risco para *NAFLD* independente dos fatores tradicionais¹⁶. O peixe é rica fonte de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs)

essenciais ômega(n)-3. Portanto, o menor consumo de peixes poderia implicar em menor disponibilidade desses AGPIs para o organismo.

A concentração plasmática total de AGPIs n-3 é baixa em *NAFLD* e está associada com aumento de esteatose, estresse oxidativo e *NASH*¹⁷⁻¹⁹. Adiciona-se que a elevada razão de AGPIs n-6:AGPIsn-3, em biópsias hepáticas de pacientes com *NAFLD*, mostrou correlação, direta e significativa, com a quantidade de triglicerídeos no fígado. Aparentemente, a menor presença de AGPIsn-3 pode participar no desenvolvimento de *NASH*²⁰.

1.2 Ácidos graxos ômega-3

AGPIs n-3 constituem família de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa cuja primeira dupla-ligação encontra-se entre o terceiro e quarto carbono, a partir do radical metil de sua cadeia carboxílica²¹. O organismo humano não possui enzimas Δ -12 e Δ -15 dessaturases, responsáveis por adicionar uma dupla-ligação antes do nono carbono a partir da extremidade metil (distal). Dessa maneira, AGPIs n-3 não podem ser produzidos *de novo* endogenamente pelo homem. Estes devem ser fornecidos exclusivamente pela dieta, por isso é dito essencial²².

No entanto, AGPIs n-3 dietéticos podem ser convertidos endogenamente, por processos enzimáticos sequenciais de alongamento e dessaturação, a outros membros dessa família de AGs. O AGPI n-3 comumente consumido na dieta corresponde ao ácido alfa-linolênico (do Inglês, *ALA*). Endogenamente, *ALA* pode ser convertido em ácidos eicosapentaenoico (do Inglês, *EPA*) e docosaexaenoico (do Inglês, *DHA*), ambos encontrados em abundância no óleo de peixe²³. Evidências atuais atribuem aos AGPIs n-3 *ALA*, *EPA* e *DHA* efeitos moduladores da resposta imunológica e do metabolismo de lipídeos, glicose e antioxidante, que são de especial interesse para prevenção e/ou tratamento de *NASH*²³.

1.3 AGPIs n-3 e modulação inflamatória

EPA e *DHA* fazem parte do grupo de nutrientes capazes de modular a resposta inflamatória sistêmica e estão associados, principalmente, com diminuição da intensidade da resposta inflamatória²¹. Como precursor de *EPA* e *DHA*, o ácido alfa-linolênico também pode influenciar indiretamente a resposta imunológica. Esses AGPIs n-3 servem como substrato para a síntese de mediadores lipídicos essenciais para a iniciação e resolução da resposta inflamatória²⁴. *EPA* e *DHA* influenciam, ainda, a atividade de fatores de transcrição chave da inflamação e a estrutura de *lipid rafts*, com modulação de vias inflamatórias por receptores localizados nesses microdomínios de membrana (**Figura 3**).

EPA incorporado nos fosfolípides de membranas celulares participa diretamente da resposta inflamatória, servindo como substrato alternativo a AGPIs n-6 (ácido araquidônico; do Inglês, *AA*) para síntese de eicosanoides²⁰. Frente a um estímulo antigênico, *EPA* e *AA* são mobilizados de fosfolípides de membranas celulares pela enzima fosfolipase A2 e competem pelas mesmas vias enzimáticas (ciclooxigenase e lipoxigenase) para a formação desses mediadores inflamatórios. Notadamente, os eicosanoides formados a partir de *EPA*, como prostaglandina E3 (PGE3), leucotrieno B5 (LTB5) e tromboxano 3 (TX3), têm potencial inflamatório significativamente menor do que aqueles sintetizados a partir de *AA*, que incluem prostaglandina E2 (PGE2), leucotrienos B4 (LTB4), tromboxano 2 (TX2) e fator de agregação plaquetária (PAF)²¹.

Figura 3 - Mecanismos de ação de ácidos graxos ômega-3 na modulação da resposta inflamatória

Legenda: Uma vez incorporados na membrana, ácidos graxos ômega-3 interferem na estrutura de *rafts* lipídicos e podem influenciar a sinalização modulada por receptores neles presentes (aqui representados como *toll like* - TLRs); frente a estímulo antigênico, ácidos graxos ômega-3 incorporados na membrana são ainda liberados pela ação de fosfolipases A2 e utilizados na síntese de eicosanóides (fase de iniciação da inflamação) ou resolvinas/protectinas/maresinas (fase de resolução da inflamação); adicionalmente, podem se ligar a receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e inibir a atividade do fator de transcrição nuclear κB (NF κB); ou, ainda, inibirem diretamente a atividade de NF κB (por mantê-lo sequestrado no citoplasma pela proteína κB), culminando, consequentemente, na inibição da transcrição de moléculas inflamatórias [presentemente representadas por interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)].

EPA e *DHA* também atuam como substrato para síntese de mediadores especializados da resolução inflamatória (resolvinas, protectinas e maresinas). Esses mediadores lipídicos são liberados durante a comunicação célula-célula na fase de resolução inflamatória (quando existe necessidade de que a inflamação chegue ao fim), via biossíntese

transcelular, e participam do controle endógeno da inflamação, propiciando que a estrutura normal e homeostase teciduais possam ser restauradas²⁵.

AGPIs n-3 exercem outros efeitos que parecem ser, ao menos em parte, independentes da síntese de mediadores lipídicos. Experimentalmente e em alguns estudos clínicos, AGPIs n-3 mostram capacidade de influenciar a síntese de outra classe de mediadores imunológicos, as citocinas. AGPIs n-3 inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) IL-1 β e IL-6, e parecem modular favoravelmente a produção da citocina contra regulatória IL-10^{23,26}.

O mecanismo pelo qual AGPIs n-3 modula a produção de citocinas parece ocorrer em nível gênico. Em estudo conduzido em células endoteliais humanas estimuladas por IL-1, *DHA* inibiu a expressão gênica de proteínas pró-aterogênicas e pró-inflamatórias (incluindo citocinas inflamatórias)²⁷. A modulação de genes por AGPIs n-3 poderia acontecer pela ativação de receptores nucleares de fatores de transcrição que controlam a expressão de alguns genes, como o sistema receptor ativador do proliferador de peroxissoma (do Inglês, *PPARs*)²⁸. Entre outras funções, os *PPARs* antagonizam vias de sinalização do fator de transcrição nuclear κ B (do Inglês, *NF κ B*), responsável pela transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, que incluem citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores pró-inflamatórios^{28,29}. Os *PPARs* controlam, ainda, a duração e a intensidade da resposta inflamatória, por induzirem a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no catabolismo de eicosanoides pró-inflamatórios³⁰⁻³².

Outro mecanismo de atividade dos AGPIs n-3 sobre a produção de citocinas e outras moléculas inflamatórias é a sua incorporação em *lipid rafts*, microdomínios da membrana celular relacionados ao início e à propagação de sinalizações celulares. Vários receptores imunológicos são encontrados nos *lipid rafts* e a integridade estrutural desses microdomínios é fundamental para que a sinalização via receptores ocorra³³. Por exemplo, a desestruturação de *lipid rafts* pode influenciar a ativação de *NF- κ B* via

receptores de células T leucocitárias e inibir a transcrição de moléculas inflamatórias, como as citocinas.

Tomadas em conjunto, as propriedades descritas oferecem suporte ao uso potencial de AGPIs n-3 em diferentes condições clínicas de base inflamatória.

1.4 AGPIs n-3 e modulação metabólica

AGPIs n-3 também são capazes de influenciar vias metabólicas, que incluem o metabolismo de gordura. Experimentalmente, ácido alfa-linolênico está associado com estímulo de beta-oxidação, inibindo a síntese de ácidos graxos e lipídios, e resultando no menor acúmulo de gordura em hepatócitos. Além disso, mostrou estimular a secreção de colesterol na bile, conduzindo à depleção do pool intra-hepático e ao *turnover* de colesterol³⁴.

Ocorre que, além de participar da modulação de genes inflamatórios, AGPIs n-3 podem influenciar fatores de transcrição de genes relacionados com o metabolismo lipídico e de resistência à insulina, e, com estresse oxidativo, como membros do *PPARs*^{35,36}, proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (do Inglês, *SREBP-1*)³⁷⁻⁴¹, receptores X do fígado (do Inglês, *LXR*)⁴², receptor X farnesoide (do Inglês, *FXR*)⁴²⁻⁴⁴, fator nuclear 4 α de hepatócito (do Inglês, *HNF4 α*)⁴⁵, proteína ligante do elemento regulado por carboidrato (do Inglês, *ChREBP*)⁴⁶ e fator relacionado ao E2 (do Inglês, *Nrf2*)⁴⁷. Parte dessa influência ocorre via modulação de *lipid rafts* por *EPA* e *DHA*, e parte pela ação direta desses AGPIs e/ou seus metabólitos (**Figura 4**).

Figura 4 - Mecanismos de ação de ácidos graxos ômega-3 na modulação da atividade de fatores de transcrição de genes relacionados ao metabolismo.

Legenda - Pela desestruturação de rafts lipídicos e/ou de sua ação direta, ácidos graxos ômega-3 (AGPIs n-3) e seus metabólitos inibem atividade de fator nuclear 4 α de hepatócito (HNF 4 α) e proteína ligante do elemento regulado por carboidrato (ChREBP), e ativam receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e proteínas de ligação do elemento de resposta esterol (SREBPs), influenciando o metabolismo de ácidos graxos (AG) e carboidratos.

Membros do sistema *PPAR* regulam a expressão de genes associados com metabolismo lipídico, incluindo proteína de ligação de ácidos graxos (do Inglês, *FABP*)⁴⁸⁻⁵³. *PPAR- α* , por exemplo, é um fator de transcrição conhecido por reduzir lipídios no plasma (a base de fibratos)⁵⁴ e aumentar β -oxidação mitocondrial⁵⁵. Dois estudos feitos com modelo experimental de *NASH* demonstraram que a infusão de agonista de *PPAR- α* preveniu e reverteu *NASH*⁵⁶. AGPIs n-3 estão relacionados com aumento da atividade de *PPAR- α* .

A *SREBP-1* é um dos reguladores-chave da síntese de ácidos graxos e desempenha um papel importante na resistência à insulina⁵⁷. O aumento das concentrações de insulina e glicose estimulam seus precursores⁵⁷⁻⁵⁹. Quando ativado, *SREBP-1* é transportado para o núcleo e, por meio de ligação com elemento regulador de esterol nas áreas promotoras de genes,

estimula lipogênese de novo^{59,60} e glicólise⁴⁹. O aumento da expressão de *SREBP-1* resulta em acúmulo de triglicerídeos no fígado⁶¹. AGPIs n-3 mostrou reduzir atividade de *SREBP-1* em cultura celular e modelos animais^{56,62-64}. *LXR* regulam o transporte e metabolismo de AG e colesterol, e aumentam a expressão de *SREBP-1*, promovendo nova síntese de triglicérides⁴³. Atualmente, se discute um possível papel inibidor de AGPIs n-3 sobre esses receptores.

Fator nuclear 4 α de hepatócito (*HNF4 α*) estimula a produção de L-piruvato quinase e glicoquinase e promove o fluxo de glicose e lipogênese no fígado. *HNF4 α* está relacionado com desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em jovens, desempenha importante papel na produção de lipoproteínas, e sua atividade é estimulada por AG saturados e é inibido por AGPIs n-3⁴⁵.

AGPIs n-3 inibem a atividade de *FXR* e *ChREBP*. *FXR* controla a síntese de sais biliares, por inibir a sínteses de enzimas biliares, reduz triglicerídeos hepáticos, induzindo *PPAR- α* e inibindo *SREBP-1*⁴². *ChREBP* inibe piruvato quinase, promovendo glicólise, está associado com esteatose hepática e resistência à insulina⁴³. Recentemente, observou-se que *EPA* induz, ainda, a ativação do fator de transcrição *Nrf2*, que regula a expressão de genes antioxidantes⁴⁷.

Tomadas em conjunto, as propriedades descritas atribuem a AGPIs n-3 a capacidade de influenciar lipogênese, armazenamento, oxidação e catabolismo de AGs, e melhorar sensibilidade à insulina. Deste modo, justifica-se considerar seu uso em diferentes condições clínicas, em que distúrbios no metabolismo de gordura estejam associados.

1.5 A ômica da NASH

Alterações de vias e funções celulares decorrentes de processos patofisiológicos conferem assinaturas moleculares específicas para cada doença. A assinatura sistêmica molecular do NASH vem sendo descrita em

humanos, pela aplicação de ciências ômicas⁶⁵. Ciências ômicas compreendem a análise genômica, transcriptômica, proteômica, lipidômica e metabolômica global de sistemas biológicos. Estas permitem quantificar e caracterizar componentes moleculares, para estudar alterações de redes e vias intracelulares características de determinada doença ou induzidas por fármacos que tenham efeito sobre ela⁶⁵.

O perfil proteico celular, tecidual e/ou sistêmico é capaz de refletir informações biológicas. Sequências gênicas podem não esclarecer mudanças fenotípicas proteicas e a análise da expressão proteica pelo estudo de RNA mensageiro (transcriptoma) pode não revelar as proteínas efetivamente expressas, já que não considera a existência de possíveis etapas de regulação pós-transcricional e/ou pós-traducional⁶⁶. Por exemplo, ao analisarem os perfis de expressão genômica e proteômica de pacientes portadores de NASH, Younossi e colaboradores encontraram alterações em doze proteínas, mas nenhuma correspondeu aos genes que se apresentaram diferencialmente expressos na mesma amostra⁶⁷.

Por outro lado, análises proteômicas permitem o estudo em larga escala de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, incluindo sua análise quantitativa ao longo do tempo e após intervenções. A partir dessa quantificação, é possível identificar alterações significativas de proteínas, que passam a ser consideradas proteínas marcadoras de funções biológicas de vias metabólicas⁶⁶. Por meio de ferramentas de bioinformática, é possível verificar, ainda, se as proteínas diferencialmente expressas compartilham vias biológicas comuns e se essas vias sofreram alterações funcionais decorrentes das mudanças desses seus componentes proteicos. Para esse fim, diferentes bases de dados disponibilizam redes biológicas que permitem a identificação das proteínas diferencialmente expressas dentro dessas vias⁶⁶.

Análises proteômicas podem ser complementadas pelas demais análises ômicas. Particularmente, análises lipidômicas podem refletir interações lipídio-proteína que ocorrem em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, ao permitirem caracterizar e quantificar moléculas lipídicas

em células e fluidos biológicos. Além disso, a diversidade estrutural de lipídeos reflete suas diversas funções fisiológicas, de tal forma que a abundância individual de suas espécies moleculares pode ser indicativa de uma variedade de doenças humanas⁶⁸. Diferentes plataformas de dados encontram-se disponíveis para auxiliar na identificação de moléculas lipídicas em diferentes doenças e/ou após intervenções farmacológicas. É o caso, por exemplo, do LIPD MAPS contendo quase 600 dessas espécies moleculares distintas ao longo de suas seis principais categorias de classes (ácidos graxos, glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos, esfingofosfolipídeos, esterol lipídeos e prenol lipídeos)⁶⁹.

Análises proteômicas e lipidômicas são realizadas por tecnologias analíticas de última geração, que incluem espectrometria de massas e cromatografia (gasosa ou líquida)⁶⁵. Estudos que avaliaram a assinatura sistêmica proteômica e lipidômica da NASH com sua aplicação permitiram, por exemplo, identificar alterações de proteínas de apoptose e adipocitocinas como base da fisiopatologia da doença e o envolvimento de metabólitos de AGs e não de triglicerídeos em sua patogênese⁶⁵. Foi possível, ainda, verificar que o grau de progressão da NASH se relaciona com aumento da proteína beta-hemoglobina, que volta a seus níveis normais após cirurgia bariátrica. Os estudos disponíveis nessa área encontram-se descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Estudos ômicos em doença hepática gordurosa não alcoólica/esteato hepatite não alcoólica

Coorte	Amostra	Exemplo de Alvos	Referências
Proteômicos			
Esteatose e <i>NASH</i>	Plasma	Apoptose, Adiponectinas	Li, H <i>et al.</i> 2011
<i>NAFLD</i> e Voluntários	Tecido adiposo	Glicogênio sintase quinase 3, PKA	Kalhan, SM <i>et al.</i> 2011
<i>NAFLD</i> e Voluntários	Plasma	Matriz extracelular, Inflamação, Coagulação	Younossi, ZM <i>et al.</i> 2005
<i>NASH</i>	Soro	Alfa e Beta hemoglobina	Younossi, ZM <i>et al.</i> 2008
Lipidômicos			
<i>NAFLD</i> , EHNA e Voluntários	Plasma	DAG/TAG, DPA/DHA, Colesterol livre, AGs livres, Glicerofosfocolina	Puri, P. <i>et al.</i> 2007
<i>NAFLD</i> e Voluntários	Plasma	DAG/TAG, Ácido Mirístico, Colesterol, Vitamina E	Puri, P. <i>et al.</i> 2009
<i>NAFLD</i> e Voluntários	Tecido hepático	Espécies de DAG, C30, C32, C34, 36	Debois, D <i>et al.</i> 2009

Legenda – *NAFLD*: doença hepática gordurosa não alcoólica; *NASH*: esteato hepatite não alcoólica; PKA: adenosinamonofofato cíclica regulada por proteína quinase A; DAG: diacil-glicerol, TAG: triacil-glicerol; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; AG: ácidos graxos.

1.6 Justificativa do estudo

Estratégias de tratamento de *NASH* se inserem naquelas desenvolvidas para tratamento da *NAFLD*. Diversas terapêuticas foram testadas para controle da *NAFLD*, que incluíram promoção de perda de peso por mudança de hábitos de vida, cirurgia bariátrica ou uso de drogas (Orlistat, Sibutramina e Rimonabant); redução da resistência à insulina, com uso de metformina e tiazodinetidonas; diminuição de estresse oxidativo, com uso de antioxidantes (vitamina E, Probucol); terapia antifator de necrose tumoral (do Inglês, *TNF*), com uso de Pentoxifilina; dentre outros⁷⁰. Essas terapias mostraram-se eficientes para atenuar comorbidades associadas à *NAFLD*, mas nenhuma se mostrou efetiva para o controle da doença.

Atualmente, o tratamento da *NAFLD* consiste na conciliação de diferentes abordagens e inclui controle da dieta, prática de atividade física, perda de peso e tratamento das comorbidades, mas não dispõe de agentes efetivos que inibam diretamente a progressão da doença⁷⁰. O controle do acúmulo de gordura, da inflamação e do estresse oxidativo característicos da *NASH* constitui uma interessante estratégia terapêutica para *NAFLD*. Nesse sentido, as propriedades anti-inflamatórias e moduladoras de processos metabólicos de AGPIs n-3 apontam benefício potencial no tratamento dos fatores envolvidos na fisiopatologia da *NASH* e podem ser de grande valia para seu tratamento⁷⁰.

Em modelos animais, de *NAFLD/NASH*, ácidos graxos n-3 apresentaram benefícios na prevenção e/ou melhora de esteatose hepática^{38,39-41}, hiperglicemia³⁷, hiperinsulinemia^{35,37} e resistência insulínica³⁵. Os benefícios foram associados com a modulação favorável de mediadores inflamatórios e metabólicos, que incluíram diminuição de níveis de *TNF*-alfa⁷¹⁻⁷⁴, interleucina (IL)-6³⁵, espécies reativas de oxigênio (do Inglês, ROS)³⁸, leucotrienos, prostaglandinas⁷⁵, da enzima ácido graxo sintase (do Inglês, *FAS*), triglicerídeos³³⁷ e aumento da expressão de resolvinas, protectinas³² e adiponectina^{335,71,72,76}. Os mecanismos envolvidos na modulação desses mediadores incluíram diminuição da ativação de

SREBP-1 no fígado, e aumento da ativação de *PPAR* nos tecidos adiposo e hepático⁷⁷⁻⁷⁹.

Clinicamente, em pacientes com *NAFLD/NASH* tratados com AGPIs n-3, observou-se redução nas concentrações de triglicérides, enzimas hepáticas [aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT)], *TNF*-alfa e glicemia, e melhora da inflamação, fibrose e esteatose hepática^{80,81}. Contudo, chama a atenção que, em revisão sistemática e metanálise, não se observou melhora histológica hepática⁸². Destacou-se a heterogeneidade metodológica significativa entre os estudos disponíveis nessa área e a necessidade da condução de novos ensaios clínicos, para melhor compreensão dos efeitos de AGPIs n-3 e seus mecanismos de ação no *NASH* em humanos⁸². Esse novo conhecimento é fundamental para nortear a aplicação de AGPIs n-3 no tratamento do *NASH*, com a finalidade de obter respostas clínicas efetivas.

Com o desenvolvimento de tecnologias de última geração, ciências ômicas vêm contribuindo significativamente para a compreensão de mecanismos moleculares (vias de sinalização, redes de interação proteína-proteína) envolvidos na fisiopatologia de várias doenças, bem como, na sua resposta a agentes terapêuticos. Estudos nessa área promovem o desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico, preditores de progressão da doença e na identificação de alvos que respondam a terapias específicas. Em pacientes com *NASH*, estudos ômicos já descrevem alterações moleculares associadas à sua fisiopatologia, mas não reportam alterações induzidas por seus potenciais terapêuticos.

Em estudo aleatório e controlado desenvolvido por nossa equipe, no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do aparelho Digestivo (LIM 35), a suplementação oral, por 6 meses, de AGPIs n-3 em pacientes com *NASH* [12] foi acompanhada por aumento significativo das concentrações plasmáticas de *ALA* e *EPA*, que se associaram com melhora parcial de marcadores histológicos hepáticos⁸³. Essas observações levantaram a hipótese de que a melhora da histologia hepática após suplementação com AGPIs n-3 resulta de mudanças proteômicas e lipidômicas induzidas por

esse tratamento. Conhecê-las poderia contribuir para a melhor compreensão de seus mecanismos de ação em pacientes com *NASH*. Na presente pesquisa, testamos essa hipótese, com a avaliação proteômica do tecido hepático e lipidômica do plasma colhidos dos pacientes avaliados, antes e depois de tratamento com AGPIs n-3, oriundos do referido estudo clínico.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar a resposta proteômica hepática e lipidômica plasmática de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica perante o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

Avaliar se o tratamento com AGPI N-3 modifica vias metabólicas associadas a estresse de retículo endoplasmático e à disfunção mitocondrial.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

As atividades experimentais do presente trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastreenterologia (LIM 35) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em parceria com o Laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina – e com o Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP) e Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos Funcionais – FCF, Universidade de São Paulo; e contempladas por auxílio Fapesp (nº2011/09234-9 e nº2013/03742-8).

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo constitui braço clínico-molecular de ensaio aleatório, duplo-cego e placebo controlado, registrado no www.clinicalTrials.gov (ID 01992809). Todos os procedimentos envolvidos no referido ensaio e no presente protocolo foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 0681/09; **Anexo A**). Adicionalmente, todos os pacientes nele incluídos leram e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Casuística

Os pacientes avaliados no presente estudo foram provenientes da Divisão de Gastroenterologia Clínica e Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP; São Paulo, Brazil), e selecionados no período de abril 2009 a abril de 2011, de acordo com os seguintes critérios: 1. Inclusão - homens e mulheres adultas (18-65 anos); diagnóstico histológico de *NASH*, por meio de análise de biópsia hepática coletada até 24 meses antes do início do estudo que apresentasse esteatose, infiltrado inflamatório lobular e balonização de hepatócitos, com ou sem Corpúsculos de Mallory e fibrose hepática estágio I, II e III, e Escore de atividade de esteato-hepatite não alcoólica (do Inglês, *NAS*) > 5 (Kleiner *et al.*, 2005); ausência de autoanticorpos; e com taxas de cobre e ceruloplasmina normais; 2. Exclusão - Intoxicação exógena por agentes oxidantes; gravidez e lactação; tempo de protrombina < 70%; plaquetas < 70 000/mm³ ou qualquer coagulopatia (inclusive alteração do tempo de sangramento); presença de esteatose sem sinal de inflamação ou balonização, ou presença de cirrose (estádio IV) na biópsia hepática; diabetes mellitus insulino-dependente; alergia a peixe ou linhaça; uso de anti-inflamatório não hormonal.

Após seleção, nutricionista sem vínculo com a presente pesquisa distribuiu os pacientes em 2 diferentes braços (alocação 1:1, com 30 pacientes em cada braço), por meio de sequência gerada com uso de *software* (GraphPad statistical *software*; QuickCalcs, La Jolla, CA - USA), para alocá-los aleatoriamente entre os grupos placebo ou tratamento. Com exceção desse nutricionista independente, os pesquisadores e clínicos envolvidos no estudo não tiveram acesso ao grupo em que cada paciente foi alocado até a conclusão da análise estatística de seus resultados. O grupo tratamento ingeriu, diariamente, 3 cápsulas gel contendo mistura de óleo de linhaça e óleo de peixe (0,200 g alfa linolênico, 0,065 g *EPA* e 0,050 g *DHA* por cápsula), perfazendo o total de 945 mg de AGPIs n-3/dia. O grupo

placebo ingeriu 3 cápsulas idênticas, cada qual contendo 2 mL de óleo mineral. A intervenção foi feita pelo período de 6 meses.

Apenas os pacientes alocados no grupo que recebeu tratamento com AGPIs n-3 foram foco de análise do presente estudo. Da amostra inicial de 30 pacientes nesse grupo, 3 foram excluídos porque não completaram o protocolo experimental.

3.3 Obtenção das amostras biológicas

As coletas de amostras teciduais e plasmáticas foram realizadas em dois períodos: antes da suplementação com AGPIs n-3 e após suplementação com AGPIs n-3. As biópsias hepáticas foram coletadas por patologista do Departamento de Patologia do HC-FMUSP e incluídas em parafina. As amostras plasmáticas foram obtidas de sangue periférico heparinizado, coletadas em tubos de coleta a vácuo. Para a separação do plasma, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1800rpm, por 5 minutos. Após a última centrifugação, duas alíquotas de 500µL do plasma foram coletadas na porção superior do tubo, adicionadas a tubos eppendorf e armazenadas em freezer -70°C. As amostras foram identificadas com etiquetas contendo um número específico para cada paciente, data e hora da coleta, seguida de marcação “AT” (antes do tratamento) ou “DT” (depois do tratamento).

Todas as análises desenvolvidas nas amostras plasmáticas e de tecido hepático foram feitas considerando-se o período do tratamento com AGPIs n-3 para identificação dos grupos: grupo antes do tratamento (AT) e grupo depois do tratamento (DT).

3.4 Análise histológica do tecido hepático

Parte das amostras de tecido hepático foi fixada em solução de formol a 10%, incluída em lâminas histológicas e submetida à coloração por hematoxilina-eosina (HE). Dois patologistas independentes, especialistas na graduação de DHGNA e cegos para o grupo de estudo (AT e DT) classificaram as referidas amostras de acordo com o escore elaborado pelo Comité de Patologia da Rede de Pesquisa Clínica em NASH (NAS). O escore NAS é definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3), e balonização (0 a 2), obtendo-se valores que variam de 0 a 8. Os valores de $NAS \geq 5$ correlacionam-se com diagnóstico de *NASH*, enquanto valores menores podem ser classificados como ausência, presença ou provável *NASH*. Adicionalmente, os dois patologistas semiquantificaram separadamente graus de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3), fibrose (0-4) e balonização (0-2). Desacordos ocasionais entre esses patologistas foram resolvidos por meio da discussão individual do caso discordante para chegarem a uma conclusão final. Para todos os parâmetros histológicos, avaliou-se melhora ou piora de *NASH*, comparando biópsias obtidas antes e depois do tratamento com AGPIs n-3. Como *NASH* é uma doença progressiva, a estabilização de qualquer desses parâmetros foi considerada como uma melhora.

3.5 Análise do perfil proteômico (MS^E) do tecido hepático

A análise do perfil proteômico do tecido hepático dos grupos AT e DT foi avaliada por técnica de espectrometria de massas (MS^E), realizada pela empresa Omics de análises em pós-genômica.

3.5.1 Extração de proteínas do tecido hepático

Para a extração das proteínas do tecido hepático, foram utilizados os seguintes reagentes: tampão Laemmli (100 mM Tris-HCL, pH 6,8, 2% v/v glicerol, 4% v/v β -mercaptoetanol - BIO-RAD); kit BCA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA); xilol e etanol (ambos da Merck Millipore Brasil); e Glu-fibrinopeptídeo B (Sigma, EUA). Água ultra pura, purificada por Direct-Q water system (Millipore, Bedford, MA, EUA), para preparação das soluções utilizadas.

As amostras de tecido hepático em parafina foram submetidas ao protocolo de extração de proteínas proposto por Nirmalan e cols. (2009)⁸⁴. A extração de proteínas do tecido parafinado foi feita em *pools* (2 *pools* – antes e depois do tratamento), cada qual contendo 20 mg de cada amostra de tecido. Para desparafinização do tecido, em microtubo de 2 mL, cada pool foi acrescido de 1mL de xilol duas vezes, com intervalo de 5 minutos. Em seguida, o tecido foi reidratado com etanol em diferentes concentrações (100%, 90%, 70%), por 5 minutos cada, e centrifugado para remover o excesso de etanol. Adicionou-se 150 μ L de tampão de Laemmli e, após fechar os tubos com grampos de plástico, procedeu-se aquecimento a 105° C durante 20 min. A quantificação de proteínas totais para cada *pool* foi realizada utilizando kit BCA.

3.5.2 Análise por MSE (MSE)

A aquisição de proteínas do tecido hepático foi feita por NanoUPLC tandem nanoESI com uso de equipamento Xevo G2 Qtof (Waters, UK), em alternância de baixa (scan de íon precursor) e alta (scan de fragmentação do íon) energia de colisão, considerando uma faixa de massa de m/z 50-2000. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo e o ajuste foi realizado previamente, para que se pudesse obter, pelo menos, 20 pontos

por pico cromatográfico, considerando 10% de pico de base TIC (Contagem total de íons) em ambas as aquisições do MSE.

A calibração foi realizada com fragmentos do Glu-fibrinopeptídeo B e, durante a aquisição, com o precursor $[M + 2H]^2+$ do íon 785,8426, por meio da fonte NanoLockSpray. A tecnologia 2D nanoACQUITY UPLC foi realizada em 2D-RP $\times$ RP, com a diluição de tampão de formiato de amônio a partir de alto a baixo pH. Foram efetuadas 10 frações de aquisições com 45 minutos cada. Os peptídeos foram eluídos na primeira dimensão com uma coluna Xbridge BEH130 C18 5 300 nm x 50 mm Nano coluna (Waters, EUA), utilizando formiato de amônio 20 mM, a pH 10 (bomba A) e acetonitrila (bomba B); e a segunda dimensão foi realizada com um nanoACQUITY UPLC Armadilha Symmetry C18 5 μ m 180 x 20 mm (Waters, EUA), imediatamente seguido por uma coluna nanoACQUITY analítico UPLC HSS T3 1.8 de 75 μ m x150 mm (Waters, EUA).

3.6 Análise do perfil lipidômico plasmático

A análise do perfil lipômico plasmático dos grupos AT e DT consistiu na avaliação de alterações de classes de lipídios, por técnica de espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por laser (MALDI-MS), e alterações das concentrações de AGPIs n-3 e n-6, por cromatografia gasosa. Dados do perfil de classes lipídicas plasmáticas foram obtidos apenas como parâmetros de alterações lipidômicas, enquanto dados do perfil de AGPIs plasmáticos foram obtidos com três propósitos distintos, a saber: como marcador de aderência ao tratamento com AGPIs n-3, como marcador de alterações histológicas associadas a AGPIs e como dado complementar lipidômico.

3.6.1 Análise do perfil plasmático de classes de lipídios

A análise do perfil plasmático de classes de lipídios foi realizada no Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP).

Extração dos lipídios plasmáticos

Para a extração dos lipídios plasmáticos, foram utilizados os seguintes reagentes: metanol (ACS/HPLC grade), adquirido de Burdick e Jackson (Muskegon, MI, *EUA*); e 2,5- ácido di-idroxibenzoico (DHB), adquirido de ICN Biomedicals (Aurora, OH, *EUA*). Água ultrapura, purificada por Direct-Q water system (Millipore, Bedford, MA, *EUA*), para preparação das soluções utilizadas.

As amostras de plasma foram submetidas ao protocolo de extração do tipo Bligh-Dyer. Em um microtubo de 2 mL, adicionou-se 300 μ L de amostra, 375 μ L de clorofórmio e 750 μ L de metanol. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 minutos e, posteriormente, seu conteúdo foi dividido em 2 tubos (712 μ L em cada). A cada tubo adicionou-se 187,5 μ L de clorofórmio e 150 μ L de água, homogeneizou-se em vórtex por 1 minuto e centrifugou-se a 3000 G por 1 minuto. Após a centrifugação, ocorreu a formação de 3 fases, como esquematizado na **Figura 5**, que permitiu identificar e coletar a porção apolar (lipídios).

Figura 5 - Representação esquemática das porções obtidas com aplicação do protocolo Bligh-Dyer.

Análise por MALDI-MS

A preparação para a análise de espectrometria de massas (do Inglês, *MS*) envolveu a colocação da porção de lipídios obtida de cada amostra plasmática na placa de MALDI (denominado *spot*). A coleta de espectros de massas foi realizada em equipamento MALDI-SYNAPT-Q-TOF (Waters, Manchester, UK), em modo automático. Cada espectro foi adquirido por cerca de 40 segundos, observando-se a formação do espectro de massas. Para o processamento de dados, os espectros foram acumulados e processados (em relação à linha de base e suavização) no *software* MassLynx v.4.0 (Waters, Manchester, UK).

3.6.2 Análise do perfil plasmático de AGPIs

O perfil de AG foi determinado com uso de cromatógrafo Agilent 7890 *A GC System*, equipado com coluna capilar J&W DB-23 60m x 250µm x 0,15 µm Agilent 122-2361, de alta resolução, com detector de ionização em chama (FID), do Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos Funcionais – FCF, Universidade de São Paulo.

Esterificação de ácidos graxos plasmáticos

Para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, as amostras de plasma foram submetidas ao protocolo proposto por Shirai *et al.* (2005)¹. Em um tubo de 15 mL, adicionou-se 1 mL de solução NaOH 0,5 M em metanol e 500 µL de plasma, e procedeu-se homogeneização com uso de vórtex, por 15 segundos, seguida de aquecimento em banho-maria a 100°C, por 5 minutos, e resfriamento à temperatura ambiente. Foram adicionados 2mL de BF₃-Metanol 14% e aplicou-se agitação no vórtex, por 15 segundos, e aquecimento em banho-maria a 100°C, por 30 minutos, seguida de resfriamento à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionou-se 1mL de isoctano e procedeu-se agitação no vórtex, por 30 segundos. Adicionou-se 5 mL de solução saturada de NaCl e

agitou-se vigorosamente por 30 segundos (agitação manual). Após separação de fases, transferiu-se a camada de isoctano (camada superior) para eppendorf e procedeu-se evaporação do isoctano com nitrogênio gasoso. O resíduo seco foi, então, ressuspendido com 120 uL de hexano grau HPLC, seguido da homogeneização em vórtex.

Análise por cromatografia gasosa

As condições cromatográficas empregadas foram feitas com adaptações específicas para otimizar as amostras do estudo, de acordo com parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limites de detecção e quantificação: injeção em modo split 50:1; temperatura do injetor 250°C; temperatura do detector 280°C; coluna cromatográfica J&W DB-23 60m x 250µm x 0,15 µm Agilent 122-2361. As condições de operação da coluna corresponderam à temperatura inicial de 80°C (1 minuto) e posterior de 230°C (5 minutos), com tempo total da corrida de 45 minutos. Os ácidos graxos foram avaliados por padronização externa, utilizando seus padrões de referência (Sigma) para obtenção da curva de calibração.

3.7 Cálculo do tamanho da amostra, e processamento e análise estatística dos dados

O tamanho da amostra do presente estudo foi determinado para observação de efeitos clínicos da suplementação com AGPIs n-3, com base na estimativa da diferença entre as proporções de resposta dos grupos placebo e suplementação com AGPIs n-3 observadas no estudo realizado por Capanni *et al.* (2006). A partir dessa abordagem, foi calculada uma amostra de 14 pacientes por grupo (placebo e suplementação), considerando um nível de significância de 5% e um poder de 80%. Estimou-se uma perda importante de pacientes, pela necessidade de procedimento invasivo no final do estudo. Portanto, optou-se por selecionar 30 pacientes em cada braço do estudo clínico inicial. Para observar a resposta lipidômica plasmática e proteômica tecidual ao tratamento com AGPIs n-3, foco da presente pesquisa, utilizou-se

apenas os pacientes do grupo suplementação que concluíram o tratamento e a coleta de biópsias antes de depois dele ($n = 27$).

3.7.1 Processamento e análise estatística dos dados de proteômica do tecido hepático

A identificação de proteínas do tecido hepático dos grupos AT e DT foi realizada utilizando-se *Protein Lynx Global Server* (PLGs) com *software* IdentityE, em comparação com o banco de dados UniProt, versão 2012_01, humano, com proteínas revistas manualmente (UniProtKB/Swiss-Prot). Para esta análise, 4% do falso positivo máximo foi permitido para cada proteína identificada. Para a análise de replicação, todas as proteínas que foram observadas em, pelo menos, 2 de 5 repetições foram consideradas identificadas.

A análise estatística foi realizada usando o *software* SPSS 18.0 (IBM, EUA). As taxas de *fold-change* foram calculadas por meio da razão entre os valores médios de concentração de proteína, para cada grupo (antes e após suplementação com AGPIs n-3). Somente proteínas observadas em, pelo menos, três repetições a cada cinco foram consideradas quantificadas. Os dados foram comparados usando o teste de Mann-Whitney, sendo adotado um α de 5%. Para proteínas exclusivas em cada um dos grupos (AT e DT), redes de interação proteína-proteína foram construídas usando o *software* Cytoscape 2.8.2. Para as proteínas que não participaram em redes de interação, consultou-se o site UniProt (www.uniprot.org) para determinar suas possíveis funções.

3.7.2 Processamento e análise estatística dos dados de lipidômica plasmática

Para a identificação dos lipídios plasmáticos dos grupos AT e DT, aplicou-se análise discriminatória ortogonal parcial dos quadrados mínimos (do Inglês, *OPLS-DA*), que consiste na realização de uma análise de

componentes principais (do Inglês, *PCA*) para a formação dos conjuntos de dados. Os modelos de *OPLS-DA* foram construídos e a importância da variável na projeção (do Inglês, *VIP*) foi utilizada para identificar os 10 íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos AT e DT. Baseado nisso, foi criado um escore de separação para cada íon.

Todas as análises foram realizadas a partir de uma matriz de dados, construída com auxílio dos *softwares* MarkerLynx (Waters, Manchester, UK) e Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA), a partir dos valores de m/z e intensidade relativa dos íons observados no perfil por MALDI. Em seguida, os íons estatisticamente importantes foram submetidos à identificação no banco de dados, usando o *software* *SimLipid* 3.0, permitindo adutos H^+ , Na^+ ou K^+ . O erro de massa foi calculado para todos os íons selecionados, com limiar máximo de 50 partes por milhão (ppm). Os íons responsáveis foram, então, identificados pelas subclasses de lipídios no banco de dados *online LIPID Metabolites and Pathways Strategy* (LIPID MAPS) (<http://www.lipidmaps.org/>).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis descritivas dos pacientes

As variáveis descritivas dos 27 pacientes incluídos na presente pesquisa, antes e após tratamento com AGPIs n-3, encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Características descritivas de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica, antes e após suplementação com ácidos graxos ômega-3

Variável	Antes	Depois	Valor <i>p</i>
Idade (anos)	52,5 ± 7,2		
Sexo feminino (%)	85,2		
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	31,1 ± 4,6	31,1 ± 4,5	0,777
Peso (kg)	76,9 ± 12,0	76,87 ± 12,1	0,791
Aspartato aminotransferase (U/L)	31,1 ± 16,7	37,15 ± 19,9	0,988
Alanino aminotransferase (U/L)	45,4 ± 35,3	51,73 ± 37,7	0,931
Y- glutamiltransferase (U/L)	73,6 ± 87,5	76,81 ± 97,0	0,909
Fosfatase alcalina (U/L)	88,1 ± 31,4	84,35 ± 30,6	0,048
Colesterol total (mg/dL)	199,4 ± 39,2	208,5 ± 43,0	0,946
HDL (mg/dL)	50,6 ± 16,6	50,8 ± 17,7	0,558
LDL (mg/dL)	117,7 ± 33,0	128,2 ± 36,4	0,977
Triglicérides mg/dL	165,6 ± 76,2	154,3 ± 68,6	0,227
Proteína C Reativa (mg/L)	5,4 ± 6,3	5,1 ± 7,2	0,301
Amiloide sérica A (mg/L)	8,3 ± 6,3	12,8 ± 17,9	0,455
Bilirrubina total (mg/L)	0,7 ± 0,4	0,74 ± 0,5	0,907
Bilirrubina direta (mg/L)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,935
Glicose sérica em jejum (mg/dL)	103,6 ± 24,9	109,0 ± 31,3	0,968
Interleucina 6 (ng/L)	4,32 ± 2,0	4,5 ± 2,2	0,904
Insulina sérica (μU/dL)	14,27 ± 7,57	15,6 ± 7,8	0,875
HOMA	3,61 ± 2	4,2 ± 2,4	0,971
Hemoglobina glicada %	6,4 ± 0,94	6,4 ± 0,9	0,141
Escore NAS	4,96 ± 1,45	4,9 ± 1,4	0,528
Esteatose	1,96 ± 0,76	1,8 ± 0,9	0,249
Inflamação lobular	1,44 ± 0,7	1,6 ± 0,6	0,878
Balonização 02	1,56 ± 0,5	1,44 ± 0,5	0,229
Balonização 04	2,52 ± 0,9	2,3 ± 0,9	0,156
Fibrose SBP	1,11 ± 0,8	1,3 ± 1,0	0,889
Fibrose Portal	0,81 ± 0,7	0,9 ± 0,7	0,713

4.2 Alterações histológicas

O tratamento com AGPIs n-3 não se associou com mudanças histológicas globais (**Tabela 2**). Por outro lado, as análises por cromatografia gasosa comprovaram a aderência dos pacientes ao tratamento ao mostrarem aumento significativo de suas concentrações plasmáticas de *ALA* ($p < 0,014$) e *EPA* ($p < 0,016$). Nos pacientes com elevação desses AGPIs n-3, houve melhora da inflamação lobular (*ALA*, $p = 0,020$; *EPA*, $p = 0,002$), esteatose (*ALA*, $p = 0,040$; *EPA*, $p = 0,050$) e balonização (*ALA*, $p = 0,010$; *EPA*, $p = 0,020$) do tecido hepático. Maiores níveis plasmáticos de *ALA* também foram relacionados com melhora do escore *NAS* ($p = 0,020$). Observou-se, ainda, diminuição significativa das concentrações plasmáticas de *AA* e esta se correlacionou com melhora da balonização hepática ($p = 0,05$). Consequentemente, a razão n-6/n-3 diminuiu significativamente ($p = 0,018$).

4.3 Resposta proteômica hepática à suplementação com AGPIs n-3

A análise do proteoma de biópsias hepáticas identificou 188 proteínas nos doentes antes (AT) e depois do tratamento (DT) com AGPI N-3. Destas, após o tratamento, 90 proteínas tiveram sua expressão diminuída (**Anexo 2A**) e 81 aumentadas (**Anexo 2B**). Doze proteínas estavam exclusivamente expressas no grupo AT (**Tabela 3**) e 5 estavam exclusivamente expressas no grupo DT (**Tabela 4**), conforme ilustra a **Figura 6**.

Tabela 3 - Proteínas exclusivamente expressas no tecido hepático do grupo antes da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

Nome da proteína	Uniprot	Gene	Função
Neuroligina-4, ligante-X	NLGNX HUMAN	NLGN4X	Proteína putativa de superfície de células neuronais, envolvida em interações célula-célula
Neuroligina-4, ligante-Y	NLGN4Y HUMAN	NLGN4Y	Proteína putativa de superfície de células neuronais, envolvida em interações célula-célula
Componente do receptor de progesterona associada à membrana 2	PGRC2 HUMAN	PGRMC2	Receptores para esteroides
Supressor do alelo homólogo G2 SKP1	SUGT1 HUMAN	SUGT1	Pode desempenhar um papel na ubiquitinação e subsequente degradação proteossômica de proteínas-alvo
Decorina	PGS2 HUMAN	DCN	Podem afetar a taxa de formação de fibrilas
Cisteína descarboxilase do ácido sulfínico	CSAD HUMAN	CSAD	Envolvida em processos metabólicos de compostos celulares nitrogenados
HAUS augmina-like subunidade complexo 6	HAUS6 HUMAN	HAUS6	Contribui para formação do fuso mitótico manutenção da integridade centrossoma
L-lactato desidrogenase Cadeia C	LDHC HUMAN	LDHC	Possível papel na motilidade de esperma
Anexina A5	ANXA5 HUMAN	ANXA5	Proteína anticoagulante
Arrestina contendo domínio 2	ARRD2 HUMAN	ARRDC2	Envolvida em transduções de sinais
Proteína dedo de zinco 445	ZNF445 HUMAN	ZNF445	Pode estar envolvida na regulação transcricional
Molécula de adesão intercelular 5	ICAM5 HUMAN	ICAM5	Proteínas ICAM são ligantes para a adesão da proteína LFA-1 leucocitária

Tabela 4 - Proteínas exclusivamente expressas no tecido hepático do grupo após suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

Nome da Proteína	Uniprot	Gene	Função
Proteína ligante de ácidos graxos, fígado	FABPL HUMAN	FABP1	Transporte de lipídios intracelulares.
Poliubiquitina-B	UBB HUMAN	UBB	Envolvidas na via de sinalização de receptores toll-like, ativação da atividade MAPK, cascata I-kappaB quinase/NF-kappaB, cascata JNK, via de sinalização mediada por citocina, organização de membranas celulares
Proteína ribossomal ubiquitina-60S L40	RL40 HUMAN	UBA52	
Proteína ribossomal ubiquitin-40S S27a	RS27A HUMAN	RPS27A	
Proteína FAST quinase 2	FAKD2 HUMAN	FASTKD2	Envolvida na respiração celular, fosforilação de proteínas, atividade de proteína quinase

Figura 6 - Redes construídas considerando as proteínas identificadas por ESI-QTOF MS.

Legenda – A figura mostra qualitativamente as alterações do perfil hepático proteico após tratamento com AGPIs n-3. Círculos em rosa representam os genes exclusivamente expressos no grupo antes do tratamento (A) e, no grupo após tratamento, com AGPIs n-3. Os círculos em azul representam genes que interagem com os genes presentes nesses grupos.

Ao se comparar entre o grupo DT e AT, as proteínas exclusivas e alteradamente expressas, observou-se que, após o tratamento, estas foram significativamente associadas às vias de matriz celular metabolismo lipídico, oxidativa, de ERE e energética. Estas associações foram confirmadas estatisticamente na análise de enriquecimento funcional do interactoma dos *clusters*. Dentre essas vias, apenas a de matriz celular não mostrou diferença funcional relevante entre os grupos (manteve-se significativa em ambos AT e DT), apesar de se ter mostrado com menor expressão de proteínas de matriz celular no grupo DT.

As demais vias destacadas tiveram alteração funcional significativa no grupo tratado com AGPIs n-3 (DT *versus* AT). Na via do metabolismo lipídico, identificou-se aumento sugestivo de atividade antilipototoxicidade mediada por maior expressão de proteínas com funções antilipotóxicas e menor expressão de proteína pró-lipotóxica. Na via oxidativa, identificou-se aumento de atividade antioxidante mediada pela maior expressão de enzimas antioxidantes. Na via de ERE, identificou-se aumento de atividades protetoras mediadas por maior expressão de proteínas de proteção a proteínas de desdobramento e menor expressão de proteínas de degradação celular. Finalmente, na via energética, identificou-se maior expressão de proteínas de respiração aeróbica e menor expressão de proteínas de respiração anaeróbica, incluindo glicólise e gliconeogênese, que poderia sugerir regulação da homeostase energética (**Tabela 5**).

As **Figuras 7, 8, 9, e 10** ilustram, respectivamente, a análise interactoma das categorias de ontologia gênica (inseridas em círculos nas referidas figuras) do metabolismo lipídico, via antioxidativa, de ERE e energética nos grupos AT e/ou DT, com os principais processos destacados por maior tamanho da fonte das letras nos círculos, o número de genes envolvidos destacados por tamanho do círculo (quanto maior o tamanho do círculo, maior o número de genes) e a importância da função de enriquecimento destacado por degradação da cor do círculo (quanto mais forte a cor do círculo, mais significativo é o processo).

A **Figura 14** ilustra o sistema biológico alterado por AGPIs n-3 em *NASH*, mostrando a integração entre vias proteômicas e lipidômicas.

Tabela 5 - Vias principais de proteínas exclusivamente e alteradamente (*versus* antes do tratamento) expressas no tecido hepático de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica após o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

	Nome da Proteína	Função Molecular	Condição*
Metabolismo Lipídico			
Lipotóxica	Receptor de progesterona de componente 2 associado à membrana	Via de sinalização mediada por hormônio hesteroide	Diminuída
	Proteína hepática ligante de ácidos graxos	Transporte de lipídios intracelular	Aumentada
Antilipototoxicidade	Proteína 1 ligante de fosfatidiletanolamina	Inibidor de serina protease, receptor de sinalização de via da insulina	Aumentada
	Clusterina/Apolipoproteína J	Previne agregação de proteínas inativas	Aumentada
	Glicerofosfodiester fosfodiesterase	Hidrolase	Aumentada
Estresse de Retículo Endoplasmático			
Degradação	Catepsina D	Protease ácida ativa na degradação de proteínas intracelulares	Diminuída
	60S proteína ribossomal L22	Ribonucleoproteína, proteína Ribossomal	Diminuída
	Proteína de choque térmico beta-1	Envolvida na resistência ao estresse e organização da actina	Diminuída
	Poliubiquitina-C	Existe covalentemente ligada à outra proteína	Diminuída
	40S proteína ribossomal S6	Papel no controle do crescimento e proliferação celulares	Diminuída
	Proteína homóloga SGT1	Ubiquitinação e degradação proteassômica de proteínas-alvo	Diminuída

continua

continuação

Estresse de Retículo Endoplasmático		
	Proteína regulada por glicose 78 kDa	Facilitadora da montagem de complexos de proteínas multiméricas no interior do retículo endoplasmático Aumentada
	Proteína de choque térmico 60 kDa	Pode facilitar o enrolamento correto de proteínas importadas Aumentada
	Fator de alongação 2	Facilitadora da montagem de complexos de proteínas multiméricas no interior do retículo endoplasmático Aumentada
Proteção	Domínio BTB/POZ contendo proteína contendo tetramerização de canal de potássio domínio 4	Homo-oligomerização de proteínas Aumentada
	E3 ubiquitina-proteína ligase CHIP	E3 ligase de proteína ubiquitina que tem como alvo substratos de chaperonas desdobradas para a degradação proteossômica Aumentada
	Fator de alongação 1-alpha 2	Promove a ligação guanosina trifosfato-dependente de aminoacil-RNA ^t ao local-A ribossômico durante a biossíntese proteica Aumentada
	F-box apenas proteína 10	Componente de reconhecimento por substrato do complexo ubiquitina ligase-tipo E3 de SCF (proteína-CUL1-F-box SKP1) Aumentada

Respiração celular

	C-1-tetrahydrofolate sintase, citoplasmica	5,10-metilenotetrahydrofolato+NADP = 5,10-metentetrahydrofolato+NADPH	Diminuída
	Isomerase A peptidil-prolil	Isomerase, rotatase	Diminuída
Anaeróbia	Guanosina trifosfato: adenosinamonofofato fosfotransferase AK3	Envolvida na manutenção da homeostase de nucleótidos celulares por catalisar a interconversão de nucleosídeo fosfato	Diminuída
	Aminoacilase-1	Envolvida na hidrólise de aminoácidos N-acilados ou N-acetilados (exceto L-aspartato)	Diminuída
	Frutose-bisfosfato aldolase B	D-frutose-1,6-bisfosfato = fosfato de glicerol + D-gliceraldeído-3-fosfato	Diminuída
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenas	Tem atividades de desidrogenas do gliceraldeído-3-fosfato e de nitrosilase, desempenhando papel em funções de glicólise e nucleares	Diminuída
	Galactoquinase	Enzima importante para o metabolismo da galactose	Diminuída

continua

continuação

Respiração celular			
Aeróbia	Fosfoglicomutase-1	Enzima que participa tanto na desagregação como na síntese de glicose	Diminuída
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Catalisa a conversão do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato	Diminuída
	Hemopexina	Liga-se à heme e o transporta para o fígado para a quebra e recuperação de ferro e retorno de hemopexina livre à circulação	Diminuída
	Enzima peroxissomal bifuncional	(3S) -3-hidroxiacil-coenzima A = trans-2 (ou 3) -enoil-coenzima A+água	Diminuída
	Carbonil redutase (NADPH) 1	Redutase dependente de NADPH com ampla especificidade de substratos	Diminuída
	Álcool desidrogenas 1	Isoenzima que preferencialmente catalisa a conversão de álcoois primários ramificados em seus respectivos aldeídos	Diminuída
	Subunidade alfa-4 de ATPase transportadora de sódio/potássio	Componente catalítico de enzima ativa que catalisa a hidrólise de adenosinatrifosfato	Diminuída
	Subunidade alfa-1 de ATPase transportadora de sódio/potássio	Cria gradiente eletroquímico de íons de sódio e potássio, fornecendo energia para transporte ativo de vários nutrientes	Diminuída
	Domínio FAST quinase contendo proteína 2	Respiração celular	Aumentada
	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	Membrana mitocondrial de ATP sintase	Aumentada
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Membrana mitocondrial de ATP sintase	Aumentada
	Catalase	Ocorre em quase todos os organismos que respiram aerobicamente e serve para proteger células dos efeitos tóxicos de peróxido de hidrogênio	Aumentada
	Glutamato desidrogenase 2, mitocondrial	Importante para a reciclagem do neurotransmissor excitatório principal, glutamato, durante a neurotransmissão	Aumentada
	Glutamato desidrogenase 1, mitocondrial	Glutamato desidrogenase mitocondrial que converte a L-glutamato em alfa-cetoglutarato	Aumentada

continua

conclusão

Respiração celular		
Hidroxiácido oxidase 1	Tem atividade de oxidase de 2-hidroxiácido	Aumentada
Acetil-Coenzima A acetiltransferase, mitocondrial	Desempenha papel importante no metabolismo de corpos cetônicos	Aumentada
Carbamoil-fosfato sintase, mitocondrial	Envolvida no ciclo da ureia de animais ureotéticos, desempenhando papel importante na remoção celular do excesso de amoníaco	Aumentada
Glicina amidinotransferase, mitocondrial	Catalisa a biossíntese de guanidinoacetato	Aumentada
Citocromo b5	Hemoproteína ligada à membrana que funciona como carreadora de elétrons para diversas oxigenases ligadas à membrana	Aumentada

Legenda – *Diminuída: proteínas alteradamente expressas apenas no grupo antes do tratamento; e Aumentada: proteínas alteradamente expressas apenas no grupo depois do tratamento; ATP: adenosinatrifosfato; NADPH: fosfato de nicotinamida adenina.

Figura 7A - Análise de Interactome mostrando alterações funcionais de alterações funcionais da via de transporte intracelular de lipídios no fígado, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com sombra verde. Antes (A) não observou função de transporte enriquecido. Em B, mostra as vias biológicas ligação lipídica e phosphatidylethanolamine ligando função enriquecida associada com a proteína FABPL e PEBP1, respectivamente; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após tratamento com n-3 PUFA. O aumento da ligação de ácidos gordos, ligação à fosfatidiletanolamina e ligação aos ácidos biliares sugere uma atenuação significativa da lipotoxicidade hepática. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 7B - Análise de Interactome mostrando alterações funcionais de alterações funcionais da via de transporte intracelular de lipídios no fígado, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com sombra verde. Antes (A) não observou função de transporte enriquecido. Em B, mostra as vias biológicas ligação lipídica e fosfatidylethanolamine ligando função enriquecida associada com a proteína FABPL e PEBP1, respectivamente; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após tratamento com n-3 PUFA. O aumento da ligação de ácidos gordos, ligação à fosfatidilethanolamina e ligação aos ácidos biliares sugere uma atenuação significativa da lipotoxicidade hepática. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 8A - Análise de Interactome mostrando a via antioxidante no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com cor de rosa. Antes de (A) observar a função antioxidante não enriquecida, e aumentar a função superóxido dismutase atividade associada com a presença de aumento da proteína de expressão SOD em proteoma antes do tratamento com n-3 PUFA. Em B, mostra a função enriquecida das vias biológicas atividade antioxidante, atividade de peroxidase, atividade de catalase e atividade de glutathione peroxidase associada à proteína FABPL, CAT, PRDX6; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após tratamento com n-3 PUFA, sugerindo uma atenuação significativa do estresse oxidativo. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 8B - Análise de Interactome mostrando a via antioxidante no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com cor de rosa. Antes de (A) observar a função antioxidante não enriquecida, e aumentar a função superóxido dismutase atividade associada com a presença de aumento da proteína de expressão SOD em proteoma antes do tratamento com n-3 PUFA. Em B, mostra a função enriquecida das vias biológicas atividade antioxidante, atividade de peroxidase, atividade de catalase e atividade de glutathione peroxidase associada à proteína FABPL, CAT, PRDX6; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após tratamento com n-3 PUFA, sugerindo uma atenuação significativa do estresse oxidativo. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 9 - Análise de Interactome mostrando modulação do retículo endoplasmático em tecido hepático de pacientes com HNA, após o tratamento com PUFA n-3. As funções discutidas neste relatório são indicadas com sombra roxa.

Após o tratamento com PUFA n-3, observou-se a ligação de proteína mal enrolada enriquecida e a proteína de ligação à chaperona, e aumentou a ligação à proteína de misfolded de função associada com a presença de proteína de expressão aumentada HSPA5 no proteoma após tratamento com n-3 PUFA. A proteína HSPA5 provavelmente desempenha um papel na facilitação da montagem de complexos de proteínas multiméricas dentro do retículo endoplasmático. O HSPA5 está envolvido no dobramento correto de proteínas e na degradação de proteínas mal dobradas, sugerindo uma atenuação significativa do estresse do retículo endoplasmático no fígado. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 10A - Análise de Interactome mostrando a modulação da via respiratória celular no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com cor azul. Antes (A), do lado esquerdo, observou-se atividade de oxidorreductase não enriquecida e aumentou a atividade da função L-lactato desidrogenase associada à presença de proteína de expressão aumentada LDHC. LDHC o que está envolvido no processo de biossíntese de ATP por meio deste subpathway é parte da fermentação do pyruvate do trajeto ao lactato, que é ele mesmo parte da fermentação da pilha. No lado direito, observou-se aumento da função beta-enolase e a atividade da frutose-bisfosfato aldolase associada à presença de aumento da proteína de expressão ENO3 e ALDOB. Ambos, ENO3 e ALDOB, participam na gliconeogênese. Em B, mostra a atividade oxidorreductase enriquecida e a atividade de glutamato desidrogenase de função enriquecida associada com a proteína GLUD1 e a proteína GLUD2; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após o tratamento com n-3 PUFA, sugerindo modulação significativa da via respiratória celular no tecido hepático. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

Figura 10B - Análise de Interactome mostrando a modulação da via respiratória celular no tecido hepático de pacientes com NASH, antes (A) e após (B) tratamento com n-3 PUFA.

As funções discutidas neste relatório são indicadas com cor azul. Antes (A), do lado esquerdo, observou-se atividade de oxidorreductase não enriquecida e aumentou a atividade da função L-lactato desidrogenase associada à presença de proteína de expressão aumentada LDHC. LDHC o que está envolvido no processo de biossíntese de ATP por meio deste subpathway é parte da fermentação do trajeto ao lactato, que é ele mesmo parte da fermentação da pilha. No lado direito, observou-se aumento da função beta-enolase e a atividade da frutose-bisfosfato aldolase associada à presença de aumento da proteína de expressão ENO3 e ALDOB. Ambos, ENO3 e ALDOB, participam na gliconeogênese. Em B, mostra a atividade oxidoreductase enriquecida e a atividade de glutamato desidrogenase de função enriquecida associada com a proteína GLUD1 e a proteína GLUD2; Significativamente regulada na proteômica de pacientes com NASH após o tratamento com n-3 PUFA, sugerindo modulação significativa da via respiratória celular no tecido hepático. As funções moleculares são representadas por círculos e os processos principais são destacados pelo tamanho da fonte de seus nomes; Quanto maior o círculo, maior o número de genes envolvidos na função; Quanto mais forte a cor do círculo, maior a ativação da função. Nenhuma função biológica ativada é representada por círculos brancos, enquanto as funções de ativação são representadas por olheiras que variam de amarelo (menos ativo) a laranja (mais ativo).

4.4 Resposta lipídômica plasmática à suplementação com AGPIs n-3

Na presente pesquisa, ao lado das alterações nas concentrações plasmáticas de AGPIs (aumento de ALA e DHA, e diminuição de AA e razão n-6/n-3), encontramos, por meio de análise por *OPLS-DA*, separação dos

perfis de classes de lipídios plasmáticos entre os grupos AT e DT (**Figura 12**). Foram escolhidos nove lipídios VIPs para compor o modelo do perfil lipidômico. Dentre eles, apenas uma classe fez parte do perfil do grupo AT e oito classes de lipídeos foram mais representadas no perfil do grupo DT (**Figura 13**). Esta mudança aponta a influência do tratamento de AGPI N-3 na modificação do perfil lipidômico. A classe principal de lipídeos representada no grupo AT correspondeu à de triadilglicerol. Das oito classes principais encontradas no grupo DT, sete fizeram parte da categoria de glicerofosfolípides (**Tabela 6**).

Gráfico 1 - Perfil lipidômico (OPLS-DA) de pacientes com esteato-hepatite não alcóolica tratados por meio de suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

Gráfico 2 - *Variable importance projection* (VIP) dos lipídios plasmáticos de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados com suplementação de ácidos graxos ômega-3.

Tabela 6 - Classes lipídicas com maior representatividade identificadas em amostras plasmáticas de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica antes (AT) e após (DT) tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, conforme identificação por análise de OP.

Grupo	Massa Absoluta*	Erro	Classe Principal
AT	740,5955	18	Triacilglicerois (GL03)
	743,489	24	Glicerofosfoetanolaminas (GP02)
	769,5258	0,9	Glicerofosfoserinas (GP03)
	770,5826	28,5	Glicerofosfatos (GP10)
DT	803,6404	31,48	Glicerofosfocolinas (GP01)
	828,588	46,2	Glicerofosfogliceróis (GP04)
	829,6197	11,3	Glicerofosfoserinas (GP03)
	856,6581	3,7	Triradilgliceróis (GL03)
	857,651	9,4	Glicerofosfoserinas (GP03)

*Moléculas identificadas pelo *lipid maps*, com erro de massa < 50 ppm

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Da contribuição científica

NASH é relevante problema de saúde pública, por sua crescente incidência e ser considerada condição pré-neoplásica do fígado. A aderência e eficácia da terapêutica atual de *NASH* são baixas, tornando necessário identificar novos agentes farmacológicos para o tratamento de seus portadores. AGPIs n-3 têm sido estudados experimental e clinicamente em *NASH*, mas com resultados contraditórios. Portanto, compreender mecanismos de ação de AGPIs n-3 é parte importante do desenvolvimento de terapias alvo-específicas envolvendo seu emprego em pacientes com *NASH*.

Pacientes com *NASH* possuem assinatura proteômica e lipidômica sistêmica diferente de indivíduos normais, que parece estar relacionada com a fisiopatologia da doença⁸⁵⁻⁸⁷. O presente estudo foi pioneiro em mostrar alterações do perfil proteômico do tecido hepático em paralelo à alteração do perfil lipidômico plasmático de pacientes com *NASH*, após tratamento com AGPIs n-3. Em conjunto, nossos dados proteômicos e lipidômicos sugerem que, em *NASH*, AGPIs n-3 modulam vias moleculares associadas com melhora da lipotoxicidade, atividade antioxidante, ERE e de vias de regulação da homeostase energética, pela regulação da função mitocondrial. A alteração simultânea e complementar entre marcadores locais e sistêmicos dessas vias apontam modificação do sistema biológico em *NASH* por AGPIs n-3.

5.2 Do método

Até onde vai nosso conhecimento, os estudos proteômicos em *NASH* foram realizados apenas em amostras de soro e em células de tecido adiposo. Além disso, os estudos disponíveis buscaram identificar proteínas alteradas pela progressão da doença, biomarcadores preditivos e de diagnóstico; enquanto o presente estudo avaliou alterações proteômicas hepáticas associadas ao tratamento com AGPIs n-3, buscando identificar vias moleculares moduladas por esses AGPIs em *NASH*⁶⁵.

A coleta periódica de biópsias hepáticas esbarra em aspectos éticos, o que poderia justificar a falta de estudos de proteômica no tecido hepático em *NASH*. Essa condição também foi uma limitação no presente estudo, pois utilizamos biópsias hepáticas emblocadas em parafina previamente coletadas e arquivadas no Departamento de Patologia da FMUSP para diagnóstico de grau e progressão da *NASH*. O tamanho limitado de material hepático disponível nessas biópsias obrigou-nos a analisá-las em *pools* de tecido hepático.

Desta forma, avaliamos a resposta proteômica hepática global ao tratamento com AGPIs n-3, por meio da comparação de *pools* de biópsias coletadas antes e após a terapia. Por outro lado, como não foi possível identificar o perfil histológico proteômico de cada um dos pacientes com *NASH*, não pudemos associar e identificar mudanças proteômicas com resposta direta ao tratamento. Mesmo frente a essa limitação, nossas análises permitiram identificar vias moleculares do tecido hepático de pacientes com *NASH* moduladas significativamente pelo tratamento com AGPIs n-3 e que, portanto, podem ser consideradas alvo para o tratamento da doença.

No presente estudo, ferramentas metodológicas de última geração permitiram identificar proteínas exclusivamente e/ou diferencialmente expressas no tecido hepático de pacientes com *NASH* após tratamento com AGPIs n-3, comparando com aquelas expressas antes do referido tratamento. A interpretação de dados de proteômica hepática é dificultada

pelo número elevado de proteínas do fígado e sua complexa caracterização (por modificações pós-traducionais e por variações de *splicing*) e por diversas variáveis de confusão, uma vez que lesões hepáticas podem ser acompanhadas por acúmulo de gordura, inflamação, necrose, apoptose, proliferação e fibrose⁶⁶. No entanto, no presente estudo, a análise interactoma foi eficiente na identificação de vias em que essas proteínas se inserem e que se mostraram significativamente alteradas após o tratamento com AGPIs n-3.

Finalmente, em paralelo com a análise da proteômica hepática, foi desenvolvida uma análise lipidômica plasmática. A análise lipidômica descreve quantitativamente alterações espaciais e temporais do conteúdo e da composição de diferentes espécies moleculares lipídicas, que podem refletir alterações de funções celulares⁶⁸. Sabidamente, a conjunção de dados proteômicos com dados lipidômicos permite abordagem mais complexa de sistemas biológicos, para a melhor compreensão de vias metabólicas de interesse.

5.3 Dos resultados

Na presente pesquisa, vias moleculares do tecido hepático de pacientes com *NASH* foram alteradas pelo tratamento com AGPIs n-3 e incluíram vias de metabolismo lipídico, ERE e função mitocondrial. Essas alterações foram acompanhadas por mudanças lipidômicas sistêmicas, caracterizadas pelo aumento de diferentes classes de glicerofosfolípides em paralelo com aumento de concentrações plasmáticas de *ALA* e *DHA*, e diminuição de *AA*.

As alterações proteômicas hepáticas refletiram a modulação de proteínas-chave de regulação das vias alteradas pelo tratamento com AGPIs n-3. Portanto, embora se tenha buscado avaliar a resposta molecular global desse tratamento, vale destacar funções individuais dessas proteínas. A mudança significativa da via do metabolismo lipídico hepático foi

acompanhada por mudanças na expressão de cinco proteínas-chave envolvidas em atividades [como transporte de AG, transporte reverso de colesterol, remodelamento de cadeia de glicerofosfolípides (do Inglês, *GPL*) e inibição de lipogênese] que, em conjunto, sugerem atenuação de lipotoxicidade. Particularmente, proteína ligante de ácidos graxos, fígado (do Inglês, *FABPL*)⁸⁸ e peroxiredoxina 6 (do Inglês, *PRDX6*)^{89,90} possuem funções antioxidantes, e a maior expressão dessas proteínas após tratamento com AGPIs n-3 aponta efeito protetor à lipotoxicidade.

FABPL é a proteína hepática mais abundante, mas se encontra marcadamente sub-representada em pacientes com *NASH*⁹¹. A menor expressão de *FABPL* em *NASH* ocorre por ativação de lipogênese hepática⁹², provavelmente decorrente a ERE crônico que, por sua vez, já foi associado com inibição dessa proteína⁹³. A *PRDX6* é uma enzima bifuncional com atividades glutatona peroxidase e fosfolipase, que desempenha papel de proteção contra lesão oxidativa e regulação do volume de *GPL*^{94,95}. A regulação de *GPL* por *PRDX6* parece estar envolvida no efeito antioxidante promovido por AGPIs n-3. Evidências experimentais mostram que a remodelação de *GPL* associada a AGPIs n-3 se acompanhou de diminuição significativa de lipídios potencialmente tóxicos (como colesterol de caveola de membranas)⁹⁶ e síntese de ceramidas⁹⁷.

Em paralelo, encontramos significativa sub-representação de receptor de progesterona associada à membrana 1 (do Inglês, *PGRM1*) observada após tratamento com AGPIs n-3, que sugere regulação negativa de lipogênese hepática. Essa observação é consistente com trabalhos anteriores, que relataram inibição direta de fatores de transcrição envolvidos na ativação da via de lipogênese celular após tratamento com AGPIs n-3⁹⁸. Adicionalmente, a significativa sobreexpressão de proteína ligante de fosfatidiletanolamina 1 (do Inglês, *PEBP1*) e apolipoproteína J (*APO J*), também observada, na presente pesquisa, após tratamento com AGPIs n-3 sugere modulação de resistência insulínica (RI) e melhora do transporte de lipídios por HDL, respectivamente, ambos alterados em *NASH*.

A *PEBP1* é um ligante de fosfatidiletanolamina, que mantém ativado o sinal da insulina no fígado⁹⁹. Trabalhos experimentais mostram resultados positivos na melhora de RI após tratamento com AGPIs n-3, mas ainda não existem relatos comprovados de benefício clínico¹⁰⁰. É possível que ausência de benefícios clínicos de AGPI N-3 na RI se deva à inflamação característica do *NASH*, já que foi recentemente demonstrado que estímulo inflamatório pode ocasionar a ligação de PEBP1 com araquidonato lipoxigenase15 (do Inglês, ALOX15) e inibir via de sinalização da insulina, neutralizando seu efeito^{101, 102}.

A proteína *ApoJ* participa do transporte reverso de colesterol e interage com uma subpopulação de HDL (apolipoproteína M)¹⁰³. Esta interação confere proteção contra oxidação de LDL, estimula o efluxo de colesterol HDL com eficiência e atua como regulador (ativação e inibição) de NF-κB por mecanismos ainda pouco compreendidos¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

Em conjunto, essas observações indicam que o tratamento com AGPIs n-3 parece atuar na correção de distúrbios do metabolismo de lipídios associados à *NASH*. Distúrbios do metabolismo lipídico, particularmente lipogênese aumentada, estão diretamente relacionados com ERE¹⁰⁸. Chama a atenção que aumento da razão n-6/n3 induz ERE e está associado à *NASH*¹⁰⁹. No presente estudo, observamos diminuição significativa da razão n-6/n-3 plasmática após tratamento com AGPIs n-3. Também encontramos diminuição significativa da expressão de conjunto de proteínas associadas à via de degradação de proteínas. Essa alteração proteômica ocorreu em paralelo com o aumento significativo de conjunto de proteínas associadas à estabilidade e proteção a proteínas, apontando atenuação de ERE. Em conformidade, evidências experimentais sugerem que o aumento da expressão de proteína de proteção se correlaciona com inibição de vias de lipogênese e consequente melhora do ERE¹¹⁰. Além disso, Jump e cols. mostraram que o tratamento com *DHA* inibiu lipogênese por meio de inibição da via de degradação do sistema proteossoma 26S¹¹⁰.

As observações já referidas contribuem para reforçar a aparente relação bidirecional entre ERE e metabolismo de lipídeos, e sugerem que a

melhora do ERE possa ter ocorrido por diferentes mecanismos inter-relacionados com alterações de vias de metabolismo lipídico presentemente encontradas após tratamento com AGPI n-3 (ex.: inibição de lipogênese e consequente diminuição de sobrecarga lipídica). ALA, componente das cápsulas de AGPI N-3 em nosso estudo, tem também ação na redução da sobrecarga lipídica hepática ao reduzir absorção intestinal de lipídios no ciclo-entero-hepático¹¹¹. Neste sentido, a melhora do ERE também poderia ter sido influenciada por efeitos sistêmicos de ALA e se relacionar com melhoras histológicas observadas em pacientes com maiores níveis plasmáticos desse AGPI.

O RE e a mitocôndria conectam-se por meio da membrana mitocondrial associada ao retículo endoplasmático (do Inglês, *MAM*) que regula o metabolismo celular. A integridade de *MAM* depende da via de sinalização do mecanismo-alvo da rapamicina (do Inglês, *mTOR*) com o complexo 2 dessa proteína (do Inglês, *mTORC2*) e proteína quinase B (do Inglês, *Akt*); via envolvida na sinalização da insulina^{108, 112}. Estudo clínico revelou significativo desarranjo sistêmico da via *mTOR/mTORC2/Akt* em pacientes com *NASH* que, posteriormente, integrou modelo clínico-proteômico de biomarcadores da doença^{113,114}. Também já foi reportado que, em comparação com controles saudáveis, pacientes com *NASH* apresentam níveis sistêmicos reduzidos de GPL (especialmente glicerofosfolina), subclasse de lipídios amplamente sintetizada na *MAM*¹¹².

Portanto, a manutenção de RE, mitocôndria e de sua conexão (*MAM*) parece ser essencial para regulação do metabolismo celular e manutenção da homeostase energética, bem como, ser mecanismo central preventivo da desregulação metabólica associada à *NASH*. Consistente com essa hipótese, a presente investigação constatou que a melhora de ERE observada após tratamento com AGPIs n-3 se acompanhou de melhora da função mitocondrial, expressa pelo significativo aumento da expressão de um conjunto de proteínas envolvidas na respiração celular aeróbica; em especial, proteínas mitocondriais como a FAST quinase domínio 2 (do Inglês, *FASTKD2*).

A FASTKD2 faz parte de um complexo de proteínas que interage com proteínas associadas a diferentes vias de respiração celular envolvidas na recuperação da homeostase energética, frente a condições de estresse celular (como pode ocorrer nos hepatócitos de pacientes com *NASH*). Em nossa investigação, o aumento da expressão de FASTKD2 foi acompanhado pelo aumento da expressão de proteínas integrantes de sua rede de interação, envolvidas em várias etapas da respiração celular, incluindo intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico [do Inglês ATC – hidroxíácido oxidase 1 (do Inglês, HAOX1_HUMAN), família 4 aldeído desidrogenas, membro 1 (do Inglês, ALDH4A1_HUMAN) e carbamoil fosfato sintase M (do Inglês, CPSM_HUMAN)], produção de NADH para a cadeia de transporte de elétrons no ciclo do ATC [isocitrato desidrogenas 3A (IDH3A_HUMAN) e tiamina (do Inglês, THIM_HUMAN)] e produção de gradiente de prótons para produzir o ATP no complexo 5 da cadeia respiratória (do Inglês, ATP5A1_HUMAN).

Todos esses achados proteômicos concordam com observações de estudo experimental com ratos, em que o tratamento com EPA e DHA melhorou a beta-oxidação que se associou à maior incorporação de DHA em membranas mitocondriais¹¹⁵.

Nossos achados lipidômicos destacaram aumento significativo de diferentes classes de GPL após tratamento com AGPIs n-3, o que mostra profunda coerência com melhora de diferentes etapas da via de fosforilação oxidativa (aeróbia), com produção de ATP. Ocorre que a ativação de vias anabólicas associadas à biogênese de lipídios no RE depende da produção adequada de ATP pela mitocôndria¹¹⁶.

O elo dos benefícios do tratamento com AGPIs n-3, altamente insaturados, no funcionamento mitocondrial, parece ser sua capacidade de alterar a composição de saturação dos lipídios de membranas celulares. Membranas mitocondriais apresentam associação positiva entre índice de insaturação de lipídeos de membrana e maior taxa de oxidação de palmitato¹¹⁷.

Em totalidade, essas observações sugerem que, no presente estudo, o tratamento com AGPIs n-3 modulou vias comuns que conectam o metabolismo lipídico e RE (incluindo biogênese de lipídios), mas que também impactam na função mitocondrial. Consistentemente, o perfil proteômico favorável da via de respiração celular aeróbica após tratamento com AGPIs n-3 também incluiu diminuição da expressão de proteínas de vias catabólicas, como proteínas associadas a vias de fermentação (do Inglês, LDHC), e de gliconeogênese e glicólise [fosfoenolpiruvato carboxiquinase 2, mitocondrial (PCK2), enolase 3 (do Inglês, ENO3), fosfoglicomutase 1 (do Inglês, PGM1), gliceraldeído 3-fosfato (do Inglês, G3P), peptidilprolil isomerase A (do Inglês, PPIA), Aldolase frutose-bisfosfato B (do Inglês, ALDOB), triosefosfato isomerase (do Inglês, TPIS), carbonil redutase 1 (do Inglês, CBR1), piruvato quinase (do Inglês, KPYR)], juntamente com concentrações plasmáticas de ácido araquidônico (AA) diminuídas.

A redução de AA observada no presente estudo tem especial interesse. Isto porque a ativação das via de fermentação e de AA estimulam gliconeogênese¹¹⁸. É possível que a diminuição hepática da lactato desidrogenase (LDHC) e dos níveis plasmáticos de AA se associe com melhora da via de respiração aeróbica após tratamento com AGPIs n-3.

A regulação positiva de respiração celular associada à melhora da função mitocondrial pode inibir estímulos catabólicos da via de gliconeogênese para obtenção de energia. O remodelamento da cadeia acil é descrita como dependente de AA livre¹¹⁹, de modo que as reduções de GPL, especificamente do tipo Glicerofosfocolina (do Inglês, GPC) em *NASH*¹⁷, podem estar associadas com altas concentrações de AA livre. Nesse cenário, AA conduziria ao aumento de DAG e TAG; substratos potencialmente lipotóxicos¹⁷. É possível, portanto, que a melhora de ERE, via de gliconeogênese e remodelamento da cadeia de glicerofosfolípides apontados pelo proteoma hepático após tratamento com AGPIs n-3 esteja, ao menos parcialmente, ligado à consequente diminuição das concentrações plasmáticas de AA.

Finalmente, cabe ressaltar que ambas as vias de fermentação e glicolítica se associam à hepatocarcinogênese, por estimularem vias lipogênicas¹²⁰. Segundo relatório publicado descrevendo assinatura proteômica e lipidômica de CHC associado à *NASH*, modulações de proteínas de vias lipogênicas podem desempenhar papel-chave na sua progressão¹²⁰. Com base nessas informações, pode se considerar que a alteração da expressão de proteínas mitocondriais, presentemente observada após tratamento com AGPIs n-3, pode ser relevante para prevenir a progressão de *NASH* para *CHC*.

Em concordância com essa hipótese, em animais deficientes em proteína homóloga de fosfatase e tensina (do Inglês, PTEN) específica de hepatócitos, o tratamento com EPA melhorou *NASH* e inibiu o desenvolvimento de adenoma hepático e *CHC*; e o tratamento com DHA apresentou correlação inversa com carga tumoral¹²¹. No entanto, até o momento, nenhum trabalho descreveu se a sugestiva proteção da evolução do *NASH* a *CHC* por AGPIs n-3 está associada com inibição de vias de fermentação, gliconeogênese e glicólise; mas é sabido que alterações do metabolismo celular maligno podem ser importantes para a progressão tumoral.

Em resumo, os dados do perfil proteômico hepático da presente pesquisa trazem contribuições importantes do ponto de vista do sistema biológico, por apresentar a influência do tratamento com AGPI n-3 na modulação da expressão de proteínas que compõem vias metabólicas interdependentes e bidirecionais associadas ao metabolismo lipídico, atenuação de ERE e disfunção mitocondrial no contexto de *NASH*. O destaque da modulação de AGPI n-3 em *NASH* confirma-se no lipidoma sistêmico, que apontou claramente que o aumento representativo da produção de GPL somado à redução de AA indicam melhores funções de RE e mitocondrial após AGPI n-3.

O conjunto de achados da presente pesquisa logrou atender o seu objetivo, permitindo a identificação de vias metabólicas influenciadas por AGPIs n-3 que podem ser alvo de tratamento da *NASH*. Estudos funcionais

específicos devem ser conduzidos para melhor compreensão dos benefícios de AGPI N-3 em *NASH*. Adicionalmente, nossos dados proteômicos também mostraram ativação de vias de matriz celular (intimamente envolvidas com fibrose) que não foi revertida após tratamento com AGPIs n-3 utilizado no presente estudo (eventualmente influenciando a ausência de melhora histológica global em nossos pacientes com *NASH*).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, o tratamento de pacientes com NASH com AGPIs n-3 influenciou o perfil proteômico hepático e lipidômico sistêmico. Em conjunto, essas alterações sugerem melhora da função de retículo endoplasmático e mitocondrial, com potencial impacto na homeostase celular, por meio da modulação de diferentes vias biológicas.

ANEXOS

A decorative flourish consisting of three interlocking loops, resembling a stylized infinity symbol or a calligraphic scroll, positioned centrally below the word 'ANEXOS' and above a horizontal line.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Aprovação do protocolo do estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de GASTROENTEROLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão datada de 19.06.13 a execução do subprojeto intitulado: **"Avaliação lipídômica e proteômica de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) suplementados com ácidos graxos ômega - Estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado"**, que será tese de Doutorado da aluna **Lívia Samara dos Reis Rodrigues**, tendo como orientador **Dr. Dan Linetzky Waitzberg**

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0681/09**, intitulado **"ACIDO GRAXO OMEGA 3 NO TRATAMENTO DA ESTEATOHEPATITE NÃO ALCOÓLICA (NASH)"**, tem como Pesquisador Responsável: **Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira**

CAPPesq, 19 de Junho de 2013.

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

7.2 Anexo B – Lista complementar de proteínas alteradamente (versus antes do tratamento) expressas no tecido hepático de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica após o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

Nome	Função	Condição*
Matriz Celular		
Prelamin-A/C	Structural molecule activity	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 6B	Structural constituent of cytoskeleton	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 6A	Structural constituent of cytoskeleton	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 6C	Structural constituent of cytoskeleton	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 8	Scaffold protein binding structural molecule activity	Diminuída
PDZ and LIM domain protein 1	Cytoskeletal protein that may act as an adapter that brings other proteins (like kinases) to the cytoskeleton	Diminuída
Neurofilament heavy polypeptide	Neurofilaments usually contain three intermediate filament proteins: L, M, and H which are involved in the maintenance of neuronal caliber	Diminuída
Neurofilament light polypeptide	Neurofilaments usually contain three intermediate filament proteins:	Diminuída
Vimentin	Vimentins are class-III intermediate filaments found in various non-epithelial cells, especially mesenchymal cells	Diminuída
Actin, alpha skeletal muscle	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Diminuída
Tubulin beta chain	Ubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain	Diminuída
Tubulin beta-2A chain	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain	Diminuída
Tubulin beta-2B chain	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain	Diminuída
Tubulin beta-3 chain	Ubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain	Diminuída
		continua

continuação

Nome	Função	Condição*
Matriz Celular		
Heat shock protein beta-1	Involved in stress resistance and actin organization	Diminuída
Tropomyosin alpha-4 chain	Binds to actin filaments in muscle and non-muscle cells	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 79	Structural constituent of cytoskeleton	Diminuída
Beta-actin-like protein 2	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Diminuída
Keratin, type II cytoskeletal 7	Blocks interferon-dependent interphase and stimulates DNA synthesis in cells. Involved in the translational regulation of the human papillomavirus type 16 E7 mrna (HPV16 E7)	Diminuída
Tubulin alpha-1C chain	Tubulin is the major constituent of microtubules	Aumentada
Tubulin alpha-1C chain	Tubulin is the major constituent of microtubules	Aumentada
Keratin, type II cytoskeletal 5	Structural constituent of cytoskeleton	Aumentada
Keratin, type I cytoskeletal 18	Involved in the uptake of thrombin-antithrombin complexes by hepatic cells (By similarity)	Aumentada
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	Robably contributes to terminal cornification. Associated with keratinocyte activation, proliferation and keratinization	Aumentada
Actin, cytoplasmic 2	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Aumentada
Actin, aortic smooth muscle	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Aumentada
Actin, cytoplasmic 1	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Aumentada
Actin, alpha cardiac muscle 1	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Aumentada
Actin, gamma-enteric smooth muscle	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.	Aumentada
Tubulin beta-4A chain	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.	Aumentada

continuação

Nome	Função	Condição*
Matriz Celular		
Tubulin beta-4B chain	Ubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.	Aumentada
Tubulin beta-4A chain	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.	Aumentada
Tubulin beta-4B chain	Ubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.	Aumentada
Keratin, type I cuticular Ha5	Structural molecule activity	Aumentada
Profilin-1	Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton	Aumentada
Keratin, type II cytoskeletal 75	Essential component of keratin intermediate filaments in the companion layer of the hair follicle.	Aumentada
Tubulin alpha-3E chain	Tubulin is the major constituent of microtubules.	Aumentada
Protein disulfide-isomerase A6	May function as a chaperone that inhibits aggregation of misfolded proteins.	Aumentada
Keratin, type I cytoskeletal 9	Plays a role in keratin filament	Aumentada
Fibrinogen beta chain	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix	Aumentada
Histona		
Histone H2B type 2-F	DNA-binding	Diminuída
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	DNA-binding	Diminuída
Histone H2B type 1-D	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2B type 1-H	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2B type 1-K	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2B type 1-L	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2B type 1-M	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2B type 1-N	Core component of nucleosome	Diminuída

continuação

Nome	Função	Condição*
Matriz Celular		
Histone H2B type F-S	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H1.4	Histone H1 protein binds to linker DNA between nucleosomes forming the macromolecular structure known as the chromatin fiber	Diminuída
Histone H1.2	Histone H1 protein binds to linker DNA between nucleosomes forming the macromolecular structure known as the chromatin fiber	Diminuída
Histone H4	Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin,	Diminuída
Histone H2B type 3-B	Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin,	Diminuída
Histone H2A.J	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1	Core component of nucleosome.	Diminuída
Histone H2A type 1-A	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1-B/E	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1-C	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1-D	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1-H	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 1-J	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2A type 2-B	Core component of nucleosome	Diminuída
Histone H2AX	Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes	Diminuída
Histone H2A.Z	Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes	Diminuída
Histone H2A.V	Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes.	Diminuída
Putative histone H2B type 2-D	Core component of nucleosome	Aumentada
Putative histone H2B type 2-C	Core component of nucleosome	Aumentada

continuação

Nome	Função	Condição*
Matriz Celular		
Histone H1.3	Histone H1 protein binds to linker DNA between nucleosomes forming the macromolecular structure known as the chromatin fiber	Aumentada
Histone H2A type 2-C	Core component of nucleosome.	Aumentada
Histone H2A type 2-A	Core component of nucleosome.	Aumentada
Histone H2A type 3	Core component of nucleosome.	Aumentada
Folato		
POTE ankyrin domain family member I	Retina homeostasis	Diminuída
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	Folate-dependent enzyme, that displays both transferase and deaminase activity.	Diminuída
POTE ankyrin domain family member E	Retina homeostasis	Diminuída
POTE ankyrin domain family member F	Retina homeostasis	Diminuída
Sistema imunológico		
Ig gamma-2 chain C region	Antigen binding	Diminuída
Ig gamma-3 chain C region	Antigen binding	Diminuída
Gamma-glutamyltransferase 5	Cleaves the gamma-glutamyl peptide bond of glutathione conjugates, but maybe not glutathione itself. Converts leukotriene C4 (LTC4) to leukotriene D4 (LTD4).	Diminuída
Ig gamma-1 chain C region	Antigen binding	Diminuída
Ig gamma-4 chain C region	Antigen binding	Diminuída
Ig kappa chain C region	Antigen binding	Diminuída
Macrophage migration inhibitory factor	Pro-inflammatory cytokine. Involved in the innate immune response to bacterial pathogens	Aumentada

continuação

Nome	Função	Condição*
Detoxificação		
Fumarylacetoacetase, desintoxicação	4-fumarylacetoacetate + H ₂ O = acetoacetate + fumarate	Diminuída
Superoxide dismutase [Cu-Zn], AMPK	Destroys radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems.	Diminuída
Thiosulfate sulfurtransferase, desintoxicação de mitocôndria	Formation of iron-sulfur complexes, cyanide detoxification or modification of sulfur-containing enzymes.	Diminuída
Liver carboxylesterase 1 Reticulo desintoxicação	Involved in the detoxification of xenobiotics and in the activation of ester and amide prodrugs.	Diminuída
Arginase-1	L-arginine + H ₂ O = L-ornithine + urea	Diminuída
Ciclo celular		
BTB/POZ domain-containing protein KCTD4 X	Protein homooligomerization	Aumentada
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	May play a role in the regulation of mrna stability.	Aumentada
DNA polymerase alpha subunit B	May play an essential role at the early stage of chromosomal DNA replication by coupling the polymerase alpha/primase complex to the cellular replication machinery	Aumentada
Zinc finger protein 771	May be involved in transcriptional regulation.	Aumentada
BTB/POZ domain-containing protein KCTD4 X	Protein homooligomerization	Aumentada
Apoptose		
Clusterin, ante-agregação e apoptose	Isoform 1 functions as extracellular chaperone that prevents aggregation of nonnative proteins. Prevents stress-induced aggregation of blood plasma proteins.	Aumentada
F-box only protein 10, apoptose	Substrate-recognition component of the SCF-type E3 ubiquitin ligase complex.	Aumentada

		conclusão
Nome	Função	Condição*
Geral		
RCC1 domain-containing protein 1	Organism-specific databases	Diminuída
Hemopexin	Binds heme and transports it to the liver for breakdown and iron recovery, after which the free hemopexin returns to the circulation.	Diminuída
Type-1 angiotensin II receptor	Receptor for angiotensin II. Mediates its action by association with G proteins that activate a phosphatidylinositol-calcium second messenger system	Diminuída
Myelin basic protein, esclerose múltipla	The classic group of MBP isoforms (isoform 4-isoform 14) are with PLP the most abundant protein components of the myelin membrane in the CNS.	Diminuída
Myosin regulatory light chain 12A	Myosin regulatory subunit that plays an important role in regulation of both smooth muscle and nonmuscle cell contractile activity via its phosphorylation	Aumentada
Myosin regulatory light chain 12B	Myosin regulatory subunit that plays an important role in regulation of both smooth muscle and nonmuscle cell contractile activity via its phosphorylation	Aumentada
Hemoglobin subunit alpha	Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues.	Aumentada
Hemoglobin subunit delta	Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues.	Aumentada
Serum albumin	Serum albumin, the main protein of plasma, has a good binding capacity for water, Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , fatty acids, hormones, bilirubin and drugs.	Aumentada
Protein SAAL1	Organism-specific databases	Aumentada
NUT family member 2F	Organism-specific databases	Aumentada

* Diminuída: proteínas alteradamente expressas apenas no grupo antes do tratamento e Aumentada: proteínas alteradamente expressas apenas no grupo depois do tratamento (DT)

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch.* 2004;444:3-12.
2. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Seminars in Liver Disease.* 2001;21:17-26.
3. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Non-alcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 1980;55:434-8.
4. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
5. Tilg and Moschen. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5).
6. 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(4):917-23.
7. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012;197:857–67.
8. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:519–29.
9. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2010;285:22027–35.
10. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010;140:900–17.
11. Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, *et al.* Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 2006;174:915–21.
12. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science.* 1998;280:1763–6.

13. De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456:605–10.
14. Kato H, Nishitoh H. Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. *Front Oncol*. 2015 Apr 20;5:93.
15. Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM, *et al.* Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol*. 2008;48:300-7.
16. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, *et al.* Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol*. 2007;47:711-7.
17. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, *et al.* A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46:1081-90.
18. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:1499-507.
19. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, *et al.* Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci*. 2004;106:635-43.
20. Vuppalanchi R, Cummings OW, Saxena R, Ulbright TM, Martis N, Jones DR, *et al.* Relationship among histologic, radiologic, and biochemical assessments of hepatic steatosis: a study of human liver samples. *J Clin Gastroenterol*. 2007;41:206-10.
21. Holum RJ. *Lipids in fundamentals of general, organic and biological chemistry*, Wiley, J. and sons Inc. Eds. 1994;566-82.
22. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:433-46.
23. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories. *Curr Opin Clin Nut. Metab. Care*. 1999;2:105-7.
24. Switzer KC, McMurray DN, Morris JS, Chapkin RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in murine T lymphocytes. *J Nutr*. 2003;133:496–503.

25. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *Journal Immunol.* 2005;174:4345-55.
26. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 2002;61:345-58.
27. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Throm.* 1994;14:1829-36.
28. Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. n₃ Fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(suppl):S1520-5.
29. Yaqoob P. fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol.* 2003;24:639-45.
30. Sanderson P, Calder PC. Dietary fish oil appears to prevent the activation of phospholipase C in lymphocytes. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1392:300-8.
31. Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem.* 1994;269:18767-72.
32. Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999;60:351-6.
33. Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, M.McKinnon, Ahwah SM, Pardini RS. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor- related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis.* 2010;31(9):1523-30.
34. Murase T, Ioki M, Tokimitsu I. Supplementation with alpha-linolenic acid rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an upregulation of β -oxidation in Zucker rats. *Biochimica et Biophys.*
35. Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB Journal.* 2009 Jun;23(6):1946-57.

36. Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem*. 2000;275:36703-7.
37. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, *et al*. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003;38:1529-39.
38. Ishii H, Horie Y, Ohshima S, Anezaki Y, Kinoshita N, Dohmen T, *et al*. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. *J Hepatol*. 2009;50:562-71.
39. Lombardo YB, Hein G, Chicco A. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids*. 2007;42:427-37.
40. Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. 2009;80:229-38.
41. Kim HJ, Lee KT, Park YB, Jeon SM, Choi MS. Dietary docosahexaenoic acid-rich diacylglycerols ameliorate hepatic steatosis and alter hepatic gene expressions in C57BL/6J-Lep(ob/ob) mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008;52:965-73.
42. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids.[see comment]. *Am J Cardiol*. 2006;98:2733.
43. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:317-40.
44. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 2000;16:459-81.
45. Roth U, Jungermann K, Kietzmann T. Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *Biochem J*. 2002;365:223-8.
46. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foulle F, Dyck JR, *et al*. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006; 55:2159-70.

47. Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, *et al.* Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem* 2007; 282:2529–37.
48. El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Omega 3-Omega 6: What is right for the liver?. *J Hepatol* 2007; 47:718-25.
49. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19:242-7.
50. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 1999;3:397-403.
51. Pawar A, Jump DB. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278:35931-9.
52. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, *et al.* Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol*. 2006;536:182-91.
53. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation*. 2007;115:518-33.
54. Watts GF, Dimmitt SB. Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:561-74.
55. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, Christian B. Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids*. 2008;153:3-13.
56. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2004;39:1286-96.
57. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12737-42.
58. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125-31.

59. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Foufelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J*. 2000;350:389-93.
60. Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB. Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasomedependent pathways. *J Lipid Res*. 2006;47:181-92.
61. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*. 1997 Mar 1;99(5):846-54.
62. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*. 1999; 274:23577-83.
63. Worgall TS, Sturley SL, Seo T, Osborne TF, Deckelbaum RJ. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem*. 1998;273:25537-40.
64. Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP 1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem*. 1999;274:25892-8.
65. Martel C, Esposti DD, Bouchet A, Brenner C, Lemoine A. Alcoholic steatohepatitis: new insights from OMICS studies. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:726-35.
66. Parent R, Beretta L. Proteomics in the study of liver pathology. *J Hepatol*. 2005;43:177–83.
67. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Giacco L, Schlauch K, Born TL, Elariny H, Gorreta F, VanMeter A, Younoszai A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42(3):665-74.
68. Maroun Bou Khalil, Weimin Hou, Hu Zhou, Fred Elisma, Leigh Anne Swayne, Alexandre P. Blanchard, Zemin Yao, Steffany A.L. Bennett, and Daniel Figeys. Lipidomics Era: Accomplishments and Challenges. *Mass Spec Rev*. 2010;29:877–929.

69. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJ, Dennis EA. 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009;50(Suppl):S9–14.
70. Xin YN, Xuan SY, Zhang JH, Zheng MH, Guan HS. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Med Hypotheses.* 2008;71:820-1.
71. Itoh M, Suganami T, Satoh N, Tanimoto-Koyama K, Yuan X, Tanaka M, *et al.* Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1918-25.
72. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, *et al.* A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol.* 2006;169:846-60.
73. Babcock T, Helton WS, Espat NJ. Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory omega-3 fat with potential clinical applications. *Nutrition.* 2000 Nov;16:1116-8.
74. Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol.* 1995;163:120-8.
75. Broughton KS, Wade JW. Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice. *J Nutr.* 2002;132:88-94.
76. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2006;49:394-7.
77. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4753–9.
78. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, *et al.* Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology.* 2003;38:1529–39.
79. Levy JR, Clore JN, Stevens W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology.* 2004;39:608–16.

80. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, *et al.* Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1143-51.
81. Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, *et al.* Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2008;40:194-9.
82. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012;56: 944–51.
83. Nogueira MA, Oliveira CP, Ferreira Alves VA, Stefano JT, Rodrigues LS, Torrinhas RS, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids in treating non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr.* 2015.
84. Nirmalan NJ, Harnden P, Selby PJ, Banks RE. Development and validation of a novel protein extraction methodology for quantitation of protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using western blotting. *J Pathol.* 2009 Mar;217(4):497-506.
85. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007;46(4):1081-90.
86. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, Li Y, Zhang X, He F, Jiang Y. A proton nuclear magnetic resonance metabolomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Proteome Res.* 2011;10(6):2797-2806.
87. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, Milburn M. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2011;60(3):404-13.
88. Wang G, Gong Y, Anderson J, Sun D, Minuk G, Roberts MS, *et al.* Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology.* 2005;42:871-9.
89. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem.* 2000;275:28421-7.
90. Kainu V, Hermansson M, Somerharju P. Electrospray ionization mass spectrometry and exogenous heavy isotope-labeled lipid species provide detailed information on aminophospholipid acyl chain remodeling. *J Biol Chem.* 2008;283:3676-87.

91. Charlton M, Viker K, Krishnan A, Sanderson S, Veldt B, Kaalsbeek AJ, *et al.* Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49:1375-84.
92. Guzmán C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, García-Mediavilla MV, Martínez-Chantar ML, *et al.* The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; and repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:803-18.
93. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:1499-507.
94. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 2000;275:28421-7.
95. Kainu V, Hermansson M, Somerharju P. Electrospray ionization mass spectrometry and exogenous heavy isotope-labeled lipid species provide detailed information on aminophospholipid acyl chain remodeling. *J Biol Chem*. 2008;283:3676-87.
96. Ma DW, Seo J, Davidson LA, Callaway ES, Fan YY, Lupton JR, *et al.* n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J*. 2004;18:1040-2.
97. Opreanu M, Lydic TA, Reid GE, McSorley KM, Esselman WJ, Busik JV. Inhibition of cytokine signaling in human retinal endothelial cells through downregulation of sphingomyelinases by docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:3253-63.
98. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem*. 2002;277:1705-11.
99. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, *et al.* Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*. 2001;21:7207-17.

100. Franekova V, Angin Y, Hoebers NT, Coumans WA, Simons PJ, Glatz JF, *et al.* Marine omega-3 fatty acids prevent myocardial insulin resistance and metabolic remodeling as induced experimentally by high insulin exposure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;308:C297-307.
101. Tang H, Park S, Sun SC, Trumbly R, Ren G, Tsung E, *et al.* RKIP inhibits NF-kappaB in cancer cells by regulating upstream signaling components of the IkappaB kinase complex. *FEBS Lett.* 2010;584:662-8.
102. Zhao J, O'Donnell VB, Balzar S, St Croix CM, Trudeau JB, Wenzel SE. 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:14246-51.
103. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevana M, *et al.* Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:9613-8.
104. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, *et al.* Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7207-17.
105. Tang H, Park S, Sun SC, Trumbly R, Ren G, Tsung E, *et al.* RKIP inhibits NF-kappaB in cancer cells by regulating upstream signaling components of the IkappaB kinase complex. *FEBS Lett.* 2010;584:662-8.
106. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301:215-90.
106. Santilli G, Aronow BJ, Sala A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity. *J Biol Chem.* 2003;278:38214-9.
107. Zoubeidi A, Ettinger S, Beraldi E, Hadaschik B, Zardan A, Klomp LW, *et al.* Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2010;8:119-30.
108. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301:215-90.

109. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2006;147:943-51.
110. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, Christian B. Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids*. 2008;153:3-13.
111. Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2013. 33:231-48.
112. Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, Hall MN. Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:12526-34.
113. Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, *et al*. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg*. 2008;18:1430-7.
114. Younossi ZM, Baranova A, Stepanova M, Page S, Calvert VS, Afendy A, *et al*. Phosphoproteomic biomarkers predicting histologic nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *J Proteome Res*. 2010;9:3218-24.
115. Bargut TC, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. *Lipids*. 2014;49:431-44.
116. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature*. 2012 April;13:251-62.
117. Holloway GP, Fajardo VA, McMeekin L, LeBlanc PJ. Unsaturation of mitochondrial membrane lipids is related to palmitate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Membr Biol*. 2012;245:165-76.
118. Cheng L, Yu Y, Zhang Q, Szabo A, Wang H, Huang X-F. Arachidonic acid impairs hypothalamic leptin signaling and hepatic energy homeostasis in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015.
119. MacDonald JI, Sprecher H. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1084:105-21.
120. Muir K, Hazim A, He Y, *et al*. Proteomic and lipidomic signatures of lipid metabolism in NASH-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 2013;73(15):10.

121. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S,. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 Jun; 142(7):1468-75.