



CAROLINA SOLON DA SILVA

**APOPTOSE INDUZIDA POR PALMITATO EM  
CÉLULAS HEPG2 DEPENDE DA PRODUÇÃO  
DE TNF-ALFA**

CAMPINAS  
2012





**UNICAMP**

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

CAROLINA SOLON DA SILVA

# **APOPTOSE INDUZIDA POR PALMITATO EM CÉLULAS HEPG2 DEPENDE DA PRODUÇÃO DE TNF-ALFA**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. GABRIEL FORATO ANHE

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
CAROLINA SOLON DA SILVA, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE.

---

Assinatura do Orientador

CAMPINAS  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Si38a Silva, Carolina Solon da, 1982-  
Apoptose induzida por palmitato em células HEPG2  
depende da produção de TNF-Alfa / Carolina Solon da  
Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Gabriel Forato Anhô.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espécies de oxigênio reativas. 2. Doenças  
mitocondriais. 3. Esteato hepatite não alcoólica. I. Anhô,  
Gabriel Forato, 1980-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Palmitate-induced apoptosis in HEPG2 cells is dependent on the increased production of TNF-Alpha.

**Palavras-chave em inglês:**

Reactive oxygen species

Mitochondrial diseases

Non alcoholic steatohepatitis

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gabriel Forato Anhô [Orientador]

Luciana Chagas Caperuto

Eliana Pereira de Araujo

**Data da defesa:** 13-08-2012


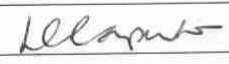
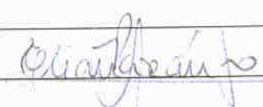
**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

# Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

CAROLINA SOLON DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe

## Membros:

Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe		Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe Dep'to. de Farmacologia/FCM Mat. 295540
Profa. Dra. Luciana Chagas Caperuto		Profa. Dra. Luciana Chagas Caperuto Departamento de Ciências Biológicas UNIFESP - Campus Diadema
Profa. Dra. Eliana Pereira de Araujo		

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/09/2012

# Dedicatória



Ao meus pais  
Silvia e Marcos

Aos meus irmãos  
Carina e João

Aos meus amigos  
Crup, Rafael, Tiago e Zé  
Ana, Andrezza, Carol Mesquita, Danilo e Thyelli

Ao meu orientador

Com muita dedicação

# **Agradecimientos**

---



Á FAPESP pelo suporte financeiro e apoio que foi fundamental para realização deste trabalho.

Ao Professor Gabriel que me aceitou como aluna, agradeço imensamente por me ensinar ser cientista.

Á minha mãe que me apoiou e incentivou todos os dias.

Á minha irmã Carina que me ajudou e me ajuda em tudo na minha vida.

Ao Professor Lício Augusto Velloso que gentilmente me permitiu fazer uso de seus laboratórios sendo fundamental para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Edson Antunes por sempre me receber em seu laboratório com muita cortesia e atenção.

Aos amigos que adquiri nesta jornada Carol Mesquita, Danilo, Thyelli, André Reno, Marcos, Aninha, Camila, Dani Razzoli, Letícia, Ju Contin, Livia, Andressa, Bruna, Rodrigo, Mari, Rafa, Érika, Gerson, Luiz, Marina Nath e Gabi.

As amigas Ana e Andrezza que me ensinaram muito e sempre me agüentaram falando sem parar com muita paciência.

Á Josi pelo carinho, amizade, compreensão e PCR.

Aos meus amigos de longa data que sempre me incentivaram muito, mesmo estando ausente em alguns momentos especiais, Talita, Dani, Tota, Ale, Vi, Vivi, Cubinho, Doug, Fogo, Malhada, Huck, Alemão, Pompom, Leilinha, Amanda, Geléia, Brocha, Gi, Eltinho, Bia, Flavinha, Colestra, Camilão, Lulu, Yaya, Tica, Bilinho, Tati, Carol, Laix, Gui, e Zaline que é um exemplo de cientista.

# Sumário

---

<b>Lista de Figuras</b>	xiii
<b>Lista de Abreviaturas</b>	xv
<b>Resumo</b>	xviii
<b>Abstract</b>	xx
<b>1. Introdução</b>	22
<b>2. Justificativa</b>	32
<b>3. Objetivos</b>	34
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	35
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	35
<b>4. Materiais &amp; Método</b>	37
<b>4.1 Cultura de células</b>	38
<b>4.2 Imunoblotting</b>	39
<b>4.3 PCR em tempo real</b>	40
<b>4.4 Citometria de fluxo</b>	41
<b>5. Resultados</b>	44
<b>5.1 Apoptose causada pelo palmitato em células HepG2</b>	45
<b>5.2 O tratamento com palmitato aumenta a expressão do RNAm para o TNF-<math>\alpha</math></b>	46
<b>5.4 O palmitato induz a produção de EROs em células HepG2</b>	48
<b>5.5 Disfunção mitocondrial causada pelo tratamento com palmitato.</b>	49
<b>5.6 Análise das vias de sinalização inflamatórias após tratamento com Ciclohexamida na presença e ausência de palmitato.</b>	50
<b>5.7 Bloqueio da ação do TNF-<math>\alpha</math> utilizando Infliximabe</b>	54
<b>6. Discussão</b>	59
<b>7. Conclusões</b>	67
<b>7.1 Sumário</b>	68

7.2	Conclusão Geral	68
8	. Referências Bibliográficas	69

# Lista de Figuras

---

1.	Via transmissão de sinal do TNF- $\alpha$ .....	24
2.	Tratamento de células HepG2 com palmitato causa apoptose.....	44
3.	Tratamento de células HepG2 com palmitato aumenta a expressão de TNF- $\alpha$ .....	45
4.	Palmitato ativa a via do TNF- $\alpha$ em células HepG2.....	46
5.	Palmitato aumenta a produção de EROS em células HepG2.....	47
6.	Disfunção mitocondrial causada pelo tratamento com palmitato em células HepG2.....	48
7.	O tratamento concomitante de Ciclohexamida e palmitato atenua a apoptose induzida pelo ácido graxo.....	50
8.	Tratamento simultâneo de palmitato com Ciclohexamida diminuiu a ativação da via do TNF- $\alpha$ .....	51
9.	Diminuição da produção de EROS em células HepG2 tratadas com palmitato concomitantemente com ciclohexamida.....	52
10.	Tratamento com Infiximabe inibe a apoptose causada pelo palmitato.....	54
11.	O tratamento com Infiximabe diminui a atividade das proteínas da via do TNF- $\alpha$ ativadas pelo palmitato.....	55
12.	Diminuição da produção de EROS em células HepG2 tratadas com palmitato concomitantemente com Infiximabe.....	56
13.	Infiximabe diminui a disfunção mitocondrial em células HepG2 causada pelo tratamento com palmitato.....	57
14.	Palmitato aumenta a razão Bax/Bcl-2 de RNAm de maneira dependente da produção de TNF- $\alpha$ .....	57

# **Lista de Abreviaturas**

---

AP-1 - Activator protein – 1

BSA - albumina bovina sérica

CHX - Ciclohexamida

DCFH - 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2

DMEM - Meio de cultivo celular Dulbecco

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EROs - espécies reativas de oxigênio

ERE - Estresse de retículo endoplasmático

FBS - Soro fetal bovino

I $\kappa$ K - Kinase do Inibidor do NF- $\kappa$ B

I $\kappa$  $\beta$  Inibidor do NF- $\kappa$ B

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IRS-1 - Substrato 1 do receptor de insulina

JNK - c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal quinase



KDa - Quilodalton

MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

NAFLD – Non alcoholic fatty liver disease

NASH – Non Alcoholic Esteat- Hepatitis

NFκB - Fator de transcrição nuclear kappa B

PCR - Reação da polimerase em cadeia

PI - Iodeto de propídeo

RNAm - RNA mensageiro

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

# Resumo



A prevalência de esteato hepatite não alcólica (NASH) aumenta de 20% em indivíduos magros para 80% em pacientes obesos com inflamação hepática caracterizada por elevados níveis de TNF- $\alpha$ . Um dos eventos que caracteriza a evolução para NASH é a marcante morte de hepatócitos resultante da ação do excesso de ácidos graxos livres circulantes. O mecanismo pelo qual o palmitato induz a apoptose é dependente, entre outros parâmetros, do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS). O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a apoptose de hepatócitos induzida pelo palmitato é dependente do aumento da produção de TNF- $\alpha$ . Para testar tal hipótese, utilizamos o Infleximabe, um anticorpo monoclonal específico anti-TNF- $\alpha$ , como ferramenta farmacológica para reverter as injúrias provocadas pelo palmitato. Foi observado que após 6 horas de tratamento com o palmitato houve um aumento de expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  levando a um aumento de apoptose 24 horas após à exposição com o ácido graxo. Este fenômeno concordou temporalmente com um aumento na fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK, indicativo de ativação da via de sinalização do TNF- $\alpha$ . A apoptose induzida pelo palmitato foi revertida pela adição de um inibidor geral de síntese proteica (Ciclohexamida) ou de um anticorpo neutralizante para o TNF- $\alpha$  circulante. Além disso, a produção de EROs e a disfunção mitocondrial induzidas pelo palmitato também foram revertidos por estas estratégias farmacológicas. Com base em tais resultados, concluímos que a apoptose, o acúmulo de EROs e da disfunção mitocondrial induzidas pelo palmitato em células HepG2 são dependentes da produção de TNF- $\alpha$ .

# **Abstract**



In the last three decades, the prevalence of overweight and obesity has been continuously increasing. Obesity is a risk factor for developing a series of diseases such as whole-body insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Adipose tissue, originally considered merely energy storage, today is recognized as an endocrine organ able of secreting a variety of cytokines, hormones and other substances with specific biological activities, such as saturated fatty acids. Both long chain saturated fatty acids, like palmitate, and the pro-inflammatory cytokines, as TNF- $\alpha$ , are known to activate signaling pathways that promote apoptosis. The mechanism by which the palmitate induces apoptosis is dependent on cell type, for example, human hepatocellular carcinoma line (HepG2) treated with palmitate led lipotoxicity and to increased levels of reactive oxygen species (ROS). Thus, the objective of this study was to evaluate whether apoptosis in HepG2 cells is dependent on increased production of TNF- $\alpha$  induced by treatment with palmitate. To test this hypothesis, we used the Infliximab, a monoclonal antibody anti-TNF- $\alpha$ , as a pharmacological tool to reverse injuries caused by palmitate. We observed that palmitate increased the mRNA for TNF- $\alpha$  and phosphorylation of I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  and JNK, all indicative of activation of inflammatory signaling pathways. Apoptosis induced by palmitate was suppressed by simultaneous treatment with cycloheximide or infliximab. Furthermore, the production of ROS and mitochondrial dysfunction induced by palmitate were also suppressed by these two pharmacological strategies. Based on these results, we conclude that apoptosis and related events such as increased ROS production and mitochondrial dysfunction induced by palmitate in HepG2 cells are dependent on autocrine action of TNF- $\alpha$ .

# **1. Introdução**

---

Desde o século XIX a obesidade é foco de estudo de diversos pesquisadores. Como o pesquisador Perry que em 1903 publicou um estudo que buscava entender a origem, o desenvolvimento e um possível tratamento desta doença tão complexa.

Já recentemente, a Organização Mundial da Saúde publicou em 2011, que a obesidade e o sobrepeso vêm se tornando um problema de saúde pública mundial e esta prevalência está associada ao estilo de vida sedentário e à dieta rica em gorduras e açúcares. Estima-se que 1,46 milhões de adultos são obesos e apresentam uma redução da expectativa de vida de até sete anos quando comparados com indivíduos com peso normal (Swinburn *et al.*, 2011; Peeters *et al.*, 2003).

A obesidade é considerada uma pandemia, de modo que assumiu grande relevância científica e social trazendo desafios relacionados à sua complexidade e suas comorbidades associadas como hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) entre outras. Somado a isto, os elevados níveis de ácidos graxos saturados livres e adipocinas em indivíduos obesos desempenham um papel importante nestas alterações fisiopatológicas (Bastard *et al.*, 2006; Glandt & Raz 2011).

Indivíduos obesos apresentam aumento da massa adiposa que excede a capacidade máxima de estocagem de gordura pelo adipócito, este tecido então adota uma característica lipolítica, desencadeando um aumento de secreção de ácidos graxos livres, que por sua vez exercem ações tóxicas em outros tecidos (fenômeno conhecido como lipotoxicidade) (Queiroz *et al.*, 2009).

O tecido adiposo é o principal reservatório para o excesso de calorias ingeridas, podendo sofrer inúmeras alterações funcionais bem caracterizadas em indivíduos obesos (Ahima & Flier, 2000). Os adipócitos possuem uma capacidade adaptativa frente ao excesso de nutrientes podendo sofrer hipertrofia (aumento tamanho) e hiperplasia (aumento

replicação celular) estes mecanismos são gerados no sentido de minimizar ou até mesmo evitar a lipotoxicidade sistêmica induzida pela obesidade (Lefterova & Lazar, 2009).

Os adipócitos hipertrofiados apresentam características que se assemelham as células do sistema imune, tais como a produção de alguns tipos de citocinas (Cinti *et al.*, 2005). O tecido adiposo também tem a capacidade de interagir e recrutar outras células do sistema imune, tais como os macrófagos (Hotamisligi, 2006; Deiluiis *et al.*, 2011). Harford e colaboradores (2011) sugerem que a infiltração de macrófagos no tecido adiposo contribui para a manutenção da resposta inflamatória da obesidade, pois estes liberam citocinas tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentando o estímulo inflamatório.

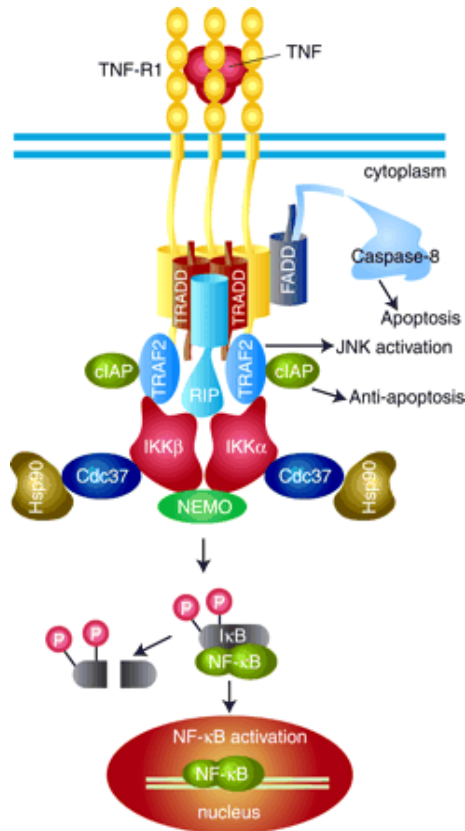
O Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pleiotrópica que induz respostas celulares tais como a proliferação celular, a produção de mediadores inflamatórios, a morte celular e resistência à insulina (Schwabe & Brenner, 2006; Hotamisligil, 2005). Esta citocina é produzida por células do sistema imunológico, pelos adipócitos e também por hepatócitos (Choi *et al.*, 2011; Ajuwon & Spurlock, 2005).

Uma vez secretado, o TNF- $\alpha$  atua preferencialmente por meio de dois receptores, o TNF-R1 e o TNF-R2. A ligação do TNF- $\alpha$  a estes receptores induz a transmissão do sinal intracelular que pode resultar na ativação de diferentes eventos como regulação de apoptose e ativação da transcrição de genes de resposta inflamatória, inclusive genes codificadores de outras citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 IL-10 e o próprio TNF- $\alpha$  (Hotamisligil, 2003).

Um dos mais importantes alvos da sinalização do TNF- $\alpha$  é o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que tem sido identificado como um dos principais mediadores da resposta inflamatória (Aggarwal, 2004). Em um trabalho de Ichikawa (2004), a inibição de NF- $\kappa$ B promoveu uma diminuição da expressão gênica de diversas proteínas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-6.



Vários estudos têm sido realizados para explorar detalhadamente o mecanismo pelo qual o NF- $\kappa$ B é ativado após o estímulo com TNF- $\alpha$  (Schwabe e Brenner, 2006) (Figura 1). De maneira geral acredita-se que o estímulo de células com TNF- $\alpha$  desencadeia a ativação de NF- $\kappa$ B através de várias proteínas incluindo TRAF2, RIP e a do complexo I $\kappa$ K.



**Figura 1. Via transmissão de sinal do TNF- $\alpha$ .** Adaptado de Chen & Goeddel. Science 2002.

A ligação do TNF- $\alpha$  com o seu receptor TNF-R1 resulta na formação de um complexo receptor-proximal contendo proteínas adaptadoras importantes tais como TRADD, TRAF2, RIP e FADD. Estas proteínas adaptadoras, por sua vez, recrutam proteínas específicas (por exemplo, caspase-8 e I $\kappa$ K $\beta$ ) formando um complexo ativo.

O aumento da expressão de TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante para o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008). Camundongos modificados geneticamente com deficiência da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  apresentam maior sensibilidade a insulina protegendo da RI induzida

por uma dieta rica em gordura, confirmando que esta resposta inflamatória tem um papel crítico no desenvolvimento do DM2 (Uysal, *et al.*, 1998).

A prevalência de DM2 vem aumentando em escala mundial, assim como a obesidade, já que estão intimamente associadas. A causa da DM2 é uma ineficiência da ação da insulina, ou resistência a esse hormônio (RI), em tecidos metabolicamente importantes como: adiposo, hepático e muscular (Boden, 2008).

Já é sabido que os ácidos graxos saturados, em especial aqueles de cadeia longa, desempenham um importante papel no estabelecimento do DM2, contribuindo para a morte das células beta-pancreáticas e para a resistência à ação da insulina no tecido muscular e adiposo (Alkhateeb *et al.*, 2007; Laybutt *et al.*, 2007).

A inflamação presente em indivíduos obesos causa um bloqueio na ação da insulina em adipócitos contribuindo para o desenvolvimento de IR e DM2, podendo promover também lipólise gerando um aumento dos ácidos graxos livres (Xu *et al.*, 2003).

O plasma contém uma variedade de ácidos graxos de cadeia longa, sendo 35% saturados e 65% insaturados. Muitos trabalhos mostram que ácidos graxos podem causar ações adversas nas funções celulares (Watt *et al.*, 2012). O Palmitato é um termo usado para sais e ésteres de ácido palmítico. Ele é um ácido graxo saturado com 16 átomos de carbono encontrado em animais e vegetais sendo o principal componente do óleo de palma. Existem diversas vias de sinalização intracelular descritas como alvos dos ácidos graxos e de seus metabólitos, de modo que os mecanismos pelos quais estes efeitos se estabelecem são relativamente bem conhecidos (Hirabara *et al.*, 2007; Cnop *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Rigazio e colaboradores (2008) foi demonstrado que uma diminuição de ácidos graxos livres liberados pelo tecido adiposo provocou uma diminuição na captação de triglicérides, melhorando a sensibilidade hepática e sistêmica à insulina.

Há relativamente pouco tempo o fígado tem sido reconhecido como um importante alvo de lesões em pacientes com resistência à insulina sendo que esta adaptação fisiopatológica está associada ao acúmulo de gordura neste órgão (NAFLD) (Wei *et al.*, 2008,).

A NAFLD resulta de elevadas concentrações séricas de ácidos graxos livres que conseqüentemente acumula-se no território hepático excedendo a capacidade de exportação por meio da síntese de partículas de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e  $\beta$ -oxidação. A esteatose hepática pode ser reversível ou evoluir para um quadro de hepatite NASH que, em situações mais avançadas, caracteriza-se por fibrose, marcada taxa de apoptose, acúmulo de leucócitos e alta prevalência de carcinomas (Neuschwander-Tetri, 2005).

Os ácidos graxos saturados podem ser a chave principal do mecanismo de apoptose em hepatócitos. A ativação de proteínas pró-apoptóticas como a Bax e JNK promove um aumento da expressão do gene do TNFR e da produção das espécies reativas de oxigênio, todos estes fenômenos vêm sendo descritos como relacionados ao desenvolvimento de NASH (Ribeiro *et al.*,2004). Por exemplo, a expressão de TNF- $\alpha$  está aumentada em indivíduos obesos e o aumento dessas concentrações séricas são frequentemente encontradas em pacientes com NASH (Kern *et al.*,1995).

Em hepatócitos de indivíduos obesos, o alto índice de apoptose, que prepondera em indivíduos com NASH (diferentemente de NAFLD), é um fator chave que medeia a resposta inflamatória do órgão e a fibrose (Jaeschke, 2006; Syn et al., 2009).

A apoptose, ou morte celular programada, é um tipo de morte celular altamente organizada crucial para o desenvolvimento embrionário, regulação do sistema imune e homeostasia celular (Park, 2012).Esta resposta é caracterizada por inúmeras alterações morfológicas, como condensação da cromatina e seu deslocamento para membrana celular,

diminuição do corpo celular, fragmentação de DNA, alterações na membrana e degradação de proteínas específicas, resultante da ativação de várias enzimas intracelulares como proteases e endonuclease. Ao fim do processo a célula é fragmentada e envolvida por vesículas denominadas corpos apoptóticos, sendo fagocitadas por macrófagos completando assim o processo de renovação celular (Guicciardi & Gores 2004; Kerr *et al.*, 1972).

Para que a morte celular programada seja eficiente é preciso que vias moleculares específicas sejam ativadas. Classicamente dividem-se as vias que culminam no evento apoptótico em pertencentes à via intrínseca ou extrínseca. Ambas vias de sinalização culminam em uma etapa comum caracterizada pela ativação da Caspase-3 (Kim *et al.*, 2000). Apesar de não se conhecer exatamente os mecanismos, sabe-se que o *burst* apoptótico causado por excesso de ácidos graxos é um evento chave que sensibiliza os hepatócitos à morte induzida por citocinas inflamatórias (Henaó-Mejia *et al.*, 2012).

Segundo o trabalho de Jin e colaboradores (2008) o TNF- $\alpha$  aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e este aumento é apontado como um possível mecanismo pelo qual esta citocina causa a apoptose.

As evidências científicas atuais destacam a necessidade de investigar a interação entre o estresse oxidativo e a inflamação subclínica envolvida com obesidade bem como as interações entre suas complicações metabólicas, sendo uma causa ou consequência da obesidade.

Fatores ambientais como cigarro, radiação, poluentes, componentes da dieta, alterações metabólicas como hiperglicemia, entre outros, são conhecidos pela capacidade comum de induzir estresse oxidativo, ativação de proteínas pró apoptóticas como as caspases, perda do potencial de membrana celular e a liberação do citocromo c. Todos esses eventos resultam em alterações na função mitocondrial, e essa disfunção pode induzir apoptose em diversos tipos celulares (Marchi *et al.*, 2012; Park, 2012; Vander *et al.*, 1997).

Há evidências *in vitro* indicando que elevadas concentrações de ácidos graxos livres apresentam efeitos adversos sobre a função mitocondrial, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (Zhang *et al.*, 2010), sendo agravadas por prejudicar as defesas antioxidantes endógenas, diminuindo a expressão de agentes antioxidantes como glutathione redutase. (Evans *et al.*, 2002).

Outros trabalhos relatam também que ácidos graxos livres medeiam a geração de EROs em vários tipos celulares, como ilhotas pancreáticas, miócitos cardíacos e adipócitos (Morgan *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2009).

A presença de EROs, em concentrações pequenas e moderadas, assume relevante importância em processos fisiológicos como na defesa contra agentes infecciosos. Contudo, em níveis elevados pode gerar danos irreversíveis aos tecidos (Valko *et al.*, 2007). Além disto, a falta de equilíbrio entre agentes antioxidantes e EROs, é vista como um passo fundamental para ocorrência da resistência à insulina e desenvolvimento do DM2 (Nakamura *et al.*, 2009).

A via de sinalização celular na qual as EROs causam prejuízo na homeostasia glicêmica ainda estão sendo investigadas, mas segundo Gao e colaboradores (2010) esse prejuízo ocorre por meio da ativação da cascata de sinalização do TNF- $\alpha$  e ativação da proteína JNK que resulta em interrupção do sinal da insulina.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), causada por distúrbios na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, e alterações nas defesas antioxidantes, têm sido relatados em situações de obesidade e DM2 (Bondia-Pons *et al.*, 2012). Logo, o distúrbio mitocondrial vem sendo associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , onde a inibição da expressão de antioxidante pode ser mediador dessa disfunção (Adachi *et al.*, 2006).

O TNF- $\alpha$  parece ser fundamental no desenvolvimento de doenças hepáticas crônicas como NAFLD e NASH, sendo um ponto comum entre elas. Como demonstrado por Feldstein e colaboradores (2003) pacientes com NASH apresentaram aumento da expressão de receptores da proteína Fas (receptor Fas participa da principal via que dispara apoptose em células) e TNFR, isso pode indicar um aumento da apoptose em hepatócitos por intermédio das duas vias apoptóticas: extrínseca e intrínseca. Sendo assim essa citocina mostrou-se um importante alvo terapêutico.

O Infliximabe é um anticorpo monoclonal específico anti TNF- $\alpha$ , é um agente biológico aprovado para uso em várias doenças relacionadas ao sistema imune estando licenciado para o tratamento de doenças como artrite reumatóide, psoríase, e doença de *Crohn* (Blackmore & Harris, 2012).

Diversos estudos fazem uso do Infliximabe para experimentação *in vitro*. O tratamento de células de linhagens de fibroblasto e músculo liso demonstrou a reversão da ação inibitória da expressão de EC-SOD causada por TNF- $\alpha$ . EC-SOD é uma enzima que protege proteínas estruturais da matriz celular contra o estresse oxidativo, esta enzima aparece em baixas concentrações no líquido sinovial de pacientes com artrite (Adachi *et al.*, 2006).

Esta droga também vem sendo testada em pesquisas para melhorar sensibilidade da sinalização da insulina. No trabalho de Araújo e colaboradores (2007) em que camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica foram tratados com Infliximabe, foi observado uma melhora na sensibilidade à glicose, diminuição na ativação da proteína JNK e na fosforilação em serina 307 de IRS1 no músculo esquelético, fígado, hipotálamo e tecido adiposo. Outro trabalho de Barbuio e colaboradores (2007) mostrou que ratos wistar com obesidade induzida por dieta hiperlipídica tratados com Infliximabe

apresentaram uma diminuição da expressão de proteínas inflamatórias, redução da esteatose e de fibrose hepática melhorando a sinalização da insulina.

As evidências científicas atuais destacam a necessidade de investigar a interação entre o estresse oxidativo e a inflamação subclínica envolvidas com obesidade, DM2 e esteatose hepática, bem como as interações entre tais fatores, quer como causa ou consequência da obesidade.

Sendo o TNF- $\alpha$  um elo entre o desenvolvimento da obesidade e as comorbidades associadas a NASH, este estudo intentou verificar se apoptose gerada pelo palmitato em células de hepatoma humano HepG2 é dependente desta citocina, e quais mecanismos estariam envolvidos nessa morte.

## **2. Justificativa**

---



É descrito o envolvimento do TNF- $\alpha$  em diversas situações fisiopatológicas, como RI, inflamação sub-clínica, estatoze hepática e obesidade, porém nenhum trabalho até o momento descreve a participação do TNF- $\alpha$  no mecanismo de apoptose induzida por ácidos graxos.

### **3. Objetivos**

---

### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi verificar se a apoptose gerada por palmitato em células HepG2 é dependente do aumento da expressão e da ação do TNF- $\alpha$ .

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  mediante tratamento com palmitato nas células HepG2.
- Avaliar a fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK em células HepG2 tratadas com palmitato.
- Avaliar a produção de EROs em células HepG2 tratadas com palmitato.
- Avaliar a apoptose em células HepG2 tratadas simultaneamente com palmitato e Ciclohexamida.
- Avaliar a fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK em células HepG2 tratadas simultaneamente com palmitato e Ciclohexamida.
- Avaliar a produção de EROs em células HepG2 tratadas simultaneamente com palmitato e Ciclohexamida.
- Avaliar a apoptose em células HepG2 mediante tratamento simultâneo de palmitato e Infiximabe.
- Avaliar a fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK em células HepG2 tratadas com palmitato e infliximabe.

- Avaliar a produção de EROs induzida pelo tratamento com palmitato e Infiximabe em células HepG2.
- Avaliar a disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento com palmitato e Infiximabe em células HepG2.
- Avaliar a razão da expressão de RNAm das proteínas anti e pró-apoptóticas Bax e Bcl-2.

## **4. Materiais & Método**

---

#### 4.1 Cultura de células

Foi utilizado em nosso estudo células da linhagem HepG2 (compradas no Banco de Células do Rio de Janeiro) derivadas de um hepatoma Humano. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM acrescido de 5,6 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (FBS-Vitrocell), 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Vitrocell, cód. 00025) em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C.

As células HepG2 foram usadas entre as passagens 92 e 100, mantidas em garrafas de plástico de 75 cm<sup>2</sup> até atingirem confluência de aproximadamente 90% para serem então repicadas ou tratadas. O palmitato utilizado foi da Sigma (St Louis, MO, USA) (Ácido Palmítico, cód. P0500).

O Infliximabe é classificado como um inibidor de TNF- $\alpha$ . Foi utilizado o Remicade 100mg, Schering-Plough (lote ORMKA85301). A concentração final de infliximabe usada foi de 200 $\mu$ g/ml. O inibidor de síntese proteica Ciclohexamida foi utilizado na concentração final de 40 $\mu$ M. O veículo usado tanto para o Infliximabe quanto para a Ciclohexamida (CalBiochem, cód. #07175) foi água destilada.

Os tratamentos das células HepG2 foram realizados na presença ou na ausência de Ácido Palmítico cujo veículo foi o etanol absoluto (0,5%). Foi utilizada como dose para o tratamento 250 $\mu$ M em intervalos que variaram entre 6 e 48 horas. Durante estes tratamentos o meio de cultura foi acrescido de BSA 1% (Sigma cód. A2153) e o FBS foi removido.

## 4.2 Immunoblotting

Garrafas de 25 cm<sup>2</sup> confluentes de células foram lavadas com tampão Krebs e em seguida as células foram removidas com uso de rodinho apropriado. As amostras de células foram então transferidas para um tubo de 1,5mL e precipitadas com uma breve centrifugação de 1000xg por 10 min. O pellet de células foi acrescido de tampão de extração (SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 100mM), submetido a sonicação para romper as membranas celulares e, em seguida, incubadas à 96°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, parte do sobrenadante das amostras foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA) e o restante foi acrescido de tampão Laemmli 5X e incubado à 96°C por 10 min. A mesma quantidade de proteínas totais de cada amostra tratada com Laemmli foi fracionada por SDS-PAGE (2,6%C e 8-12%T) em aparelho para minigel (Mini-Protean, Bio-Rad). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad, CA, USA).

As membranas foram então bloqueadas com uma solução contendo BSA 5%, Tris-Base, NaCl e Tween-20 por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos (St<sup>a</sup> Cruz Biotechnology) específicos contra pIkK $\alpha$ (Ser32), pIkK $\alpha$ / $\beta$ (Thr 23), pJNK(Thr183) ou GAPDH por 4 horas à temperatura ambiente. As proteínas foram normalizadas por pelo controle endógeno GAPDH. Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, USA). Antes da detecção, as membranas foram incubadas por 1 minuto com uma solução

contendo luminol (Sigma cód.123072), ácido p-cumárico (Sigma cód. C9008) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, então, expostas durante tempos variados à filmes de raio-X. Depois de revelados, esses filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo software Scion Image (Scioncorp, NIH, USA).

### **4.3 PCR em tempo real**

*Extração de RNA* - Após lavar as células aderidas às garrafas com tampão Krebs, cada frasco recebeu 1ml de Trizol. Com o auxílio de uma micro-pipeta de 1ml a solução de Trizol foi misturada até que as células da garrafinha ficassem totalmente em solução.

As amostras foram transferidas para tubo de 1,5ml. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio por 1 mL de Trizol sob agitação vigorosa por 15 segundos com posterior incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação a 14.000g por 15 minutos à 4°C, a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde o RNA foi precipitado com 0,5 ml de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos à 4 °C. O precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 75 % e a amostra centrifugada a 7.500 g, por 5 minutos à 4 °C. Em seguida, o pellet de RNA foi diluído em 50µL de água livre de RNase e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. A integridade do RNA obtido foi verificada submetendo as amostras à eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

*Reação de transcrição reversa* – A fita-molde de cDNA foi obtida através de uma reação de transcrição reversa. Para tanto, as amostras de RNA total foram submetidas à transcrição com a enzima transcriptase reversa (Applied Biosystems) e oligo dT. O cDNA obtido foi utilizado em PCR em tempo real.



*PCR quantitativo (qPCR)* -- As reações utilizaram o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems) que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Os kits utilizados foram os seguintes:

- Gene TNF: assay Hs: 00174128\_m1
- Gene Bcl-2: assay Hs: 00153350\_m1
- Gene Bax: assay Hs: 00180261\_m1

O gene que codifica para a *GAPDH* (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi usado como controle endógeno da reação. A Sonda para este respectivo primer estava marcada com o fluoróforo VIC.

Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

#### **4.4 Citometria de fluxo**

Citometria de fluxo foi usada para avaliar a fragmentação de DNA, a produção EROs e a disfunção mitocondrial. O citômetro de fluxo utilizado foi da marca BD, modelo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) equipado com laser de argônio (comprimento de onda fixado em 488 nm) e software versão CellQuest 3.3 (BD Biosciences). Para todas as amostras foram adquiridos 10.000 eventos. A dispersão de luz

foi detectada em escala linear, sendo registrados num gráfico de pontos com dois parâmetros, enquanto a fluorescência foi detectada em escala logarítmica.

*Fragmentação de DNA* - Foram semeadas  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 6 poços. Depois dos tratamentos as células foram lavadas com tampão Krebs e removidas com uso de rodinho apropriado. Em seguida, as amostras com as células em suspensão foram transferidas para um tubo de 1,5mL e precipitadas com uma breve centrifugação de  $2000 \times g$  por 10 min. O pellet de células foi acrescido de tampão de fragmentação de DNA (Triton 0,1%, citrato 0,4mM, de sódio e iodeto de propídeo  $60 \mu M$  em PBS) e então incubadas por 24 horas para a marcação do DNA. Após a incubação, o iodeto de propídeo incorpora no DNA emitindo fluorescência. A intensidade do fluorescência indica se o DNA está íntegro ou fragmentado. As células foram ressuspensas novamente e analisadas no citômetro de fluxo no canal FL2. Os valores foram expressos em porcentagem de eventos com fluorescência média menor que aquela do DNA diplóide e tetrapóide.

*Produção de EROs* - Mediante os mesmos tratamentos e mesmas condições de remoção, as células foram usadas também para ensaio da produção EROs. Após a centrifugação de 10 minutos o pellet de células foi acrescido de tampão de Krebs contendo 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH, Sigma, cód. D6883) na concentração de  $5 \mu mol/L$ . As amostras foram incubadas por 15 minutos protegidas da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em tampão Krebs e analisadas no citômetro de fluxo no canal FL1. Os valores foram expressos em intensidade de fluorescência média por número de eventos.

*Disfunção mitocondrial* - Para avaliar a disfunção mitocondrial, as amostras passaram pelo mesmo tratamento e protocolo de extração como descrito anteriormente para os protocolos de citometria. A disfunção mitocondrial foi analisada a partir do acúmulo de

Rodamina 123 em mitocôndrias íntegras. As amostras foram incubadas por 30 minutos com a sonda na concentração de 1 $\mu$ M em temperatura ambiente. Após isto as células foram então lavadas com Krebs e analisadas a partir da intensidade de fluorescência em FL2. A partir das leituras das amostras associadas à Rodamina 123, a intensidade média da fluorescência foi apresentada em histograma e detectada no canal FL1.

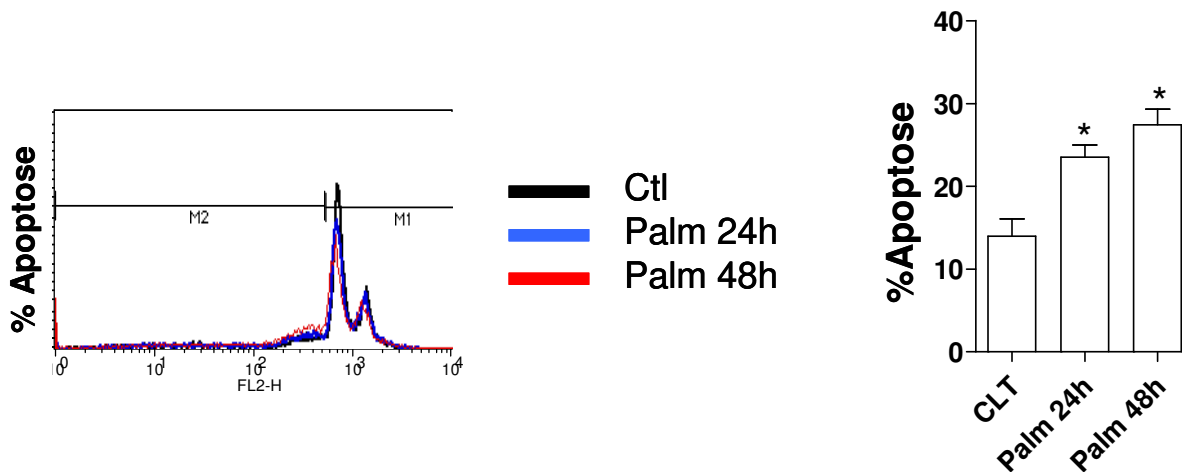
*Análise estatística* - Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, ou duas vias com pós-teste de *T Student*, quando apropriado). Também foi realizado, quando adequado, o teste de *T Student*. Em todos os resultados foram adotados 5% como limite de significância estatística ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 para Windows.

## **5. Resultados**

---

## 5.1 Apoptose causada pelo palmitato em células HepG2

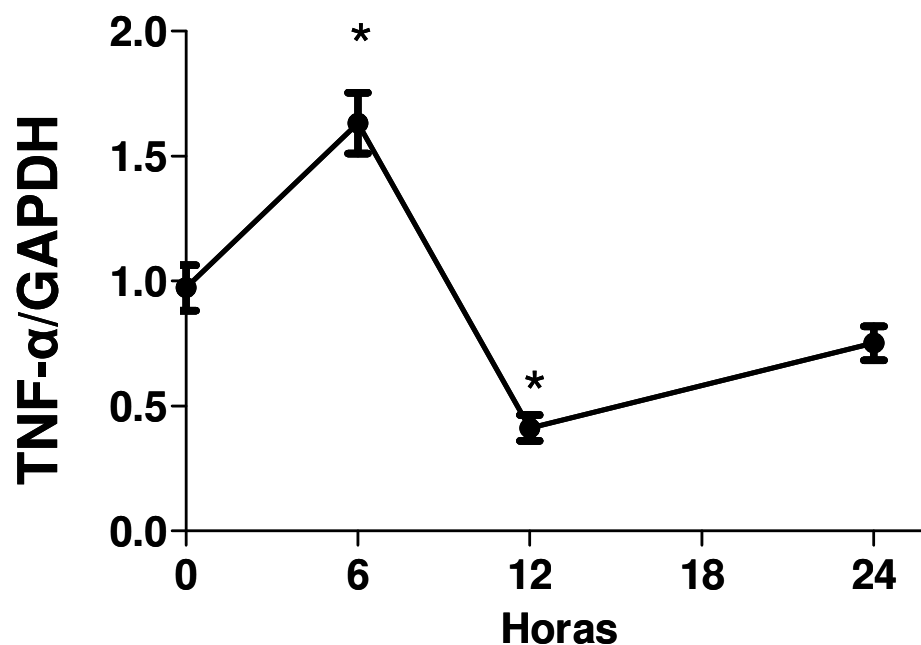
Inicialmente, para investigar o efeito do tratamento com palmitato em células HepG2, avaliamos a morte celular. A figura 2 apresenta a porcentagem de apoptose gerada a partir do tratamento com palmitato na concentração de 250 $\mu$ M por 24 e 48 horas. Como pode ser observado a apoptose no grupo tratado por 24 horas com palmitato foi 68,1% maior que a do grupo de células não tratadas. Já as células tratadas com palmitato por 48 horas apresentaram uma apoptose 95,8% maior que a do grupo não tratado.



**Figura 2. O tratamento de palmitato em células Hepg2 causa apoptose.** Para determinar a fragmentação de DNA em células HepG2, foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M por 24 e 48 horas. Após o tratamento foram incubadas por 24 horas com tampão PBS contendo iodeto de propídeo, em seguida mensurada por citometria de fluxo. (n=9). \* p < 0.05 vs. Ctl. O gráfico representa a média $\pm$  EPM dos três grupos. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras

## 5.2 O tratamento com palmitato aumenta a expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$

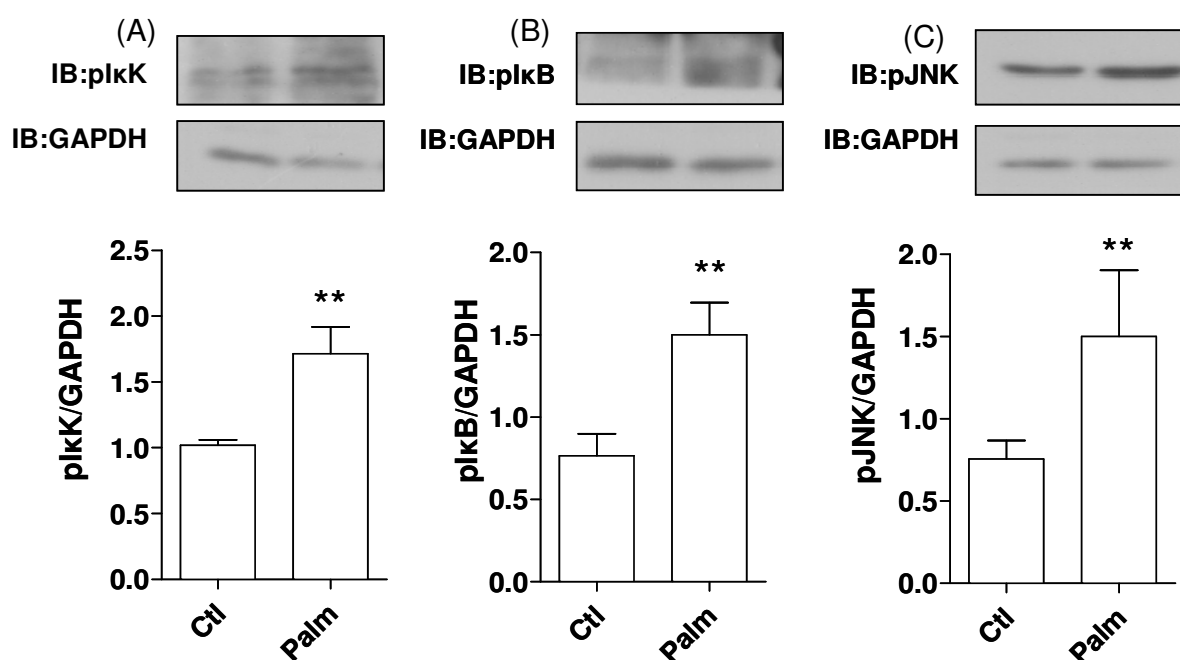
Após um ensaio experimental onde as células HepG2 foram tratadas com palmitato nos tempos de 6, 12 e 24 horas, analisamos a expressão de RNAm para a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (Figura 3). Observou-se um aumento de 67,6% nas células tratada por 6 horas em relação às células não tratadas. Foi observada uma diminuição de 57,6% após 12 horas de tratamento com palmitato em relação às células não tratadas. Após 24 horas de tratamento com palmitato o RNAm para o TNF- $\alpha$  mensageiro voltou à níveis semelhantes aos das células não tratadas.



**Figura 3. O tratamento com palmitato aumenta a expressão de TNF- $\alpha$ .** Células HepG2 tratadas com Palm 250 $\mu$ M, por 6, 12 e 24 horas. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=4). \* P < 0.05 vs. Ctl.

### 5.3 O palmitato ativa a via do TNF- $\alpha$ em células HepG2

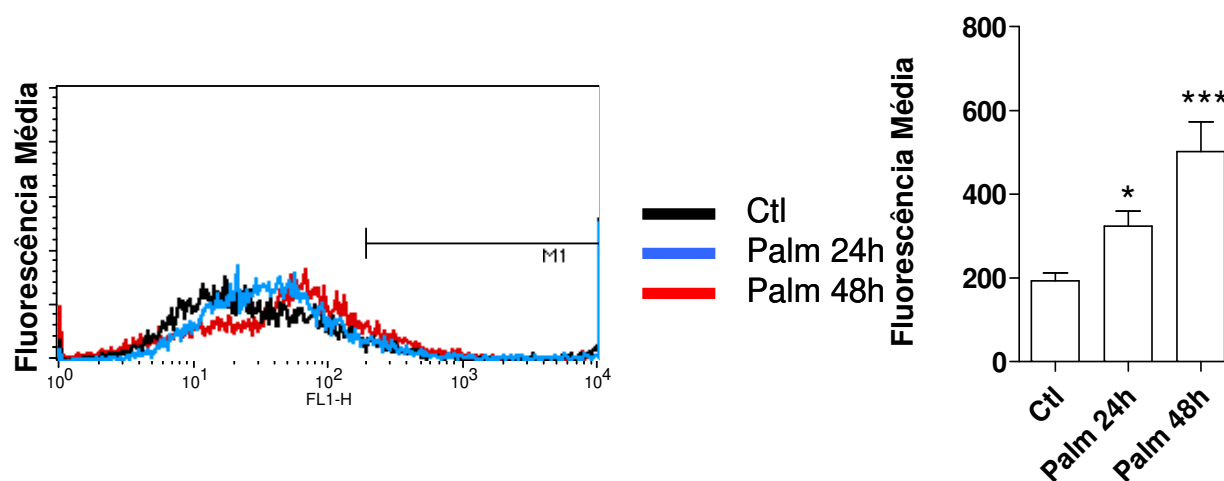
A fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$ B e JNK foram analisadas pela técnica de Western blotting. As células foram tratadas com palmitato 250 $\mu$ M por 24 horas. A figura 4A mostra um aumento de 68% na fosforilação da proteína I $\kappa$ K no grupo tratado com palmitato em relação ao grupo de células não tratadas. Na Figura 4B observa-se um aumento de 79,6% na fosforilação de I $\kappa$  $\beta$  em relação ao grupo de células não tratadas. De maneira semelhante observamos um aumento de 89,5% na fosforilação de JNK em relação ao grupo de células não tratadas (Figura 4C).



**Figura 4. O palmitato ativa a via do TNF- $\alpha$  em células HepG2.** Avaliação da fosforilação de I $\kappa$ K(A), I $\kappa$ B (B) e JNK(C) analisadas por Western blotting e normalizadas por GAPDH. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=6). \*\* P < 0.002 vs. Ctl

## 5.4 O palmitato induz a produção de EROs em células HepG2

O tratamento das células HepG2 com palmitato na concentração de 250 $\mu$ M nos tempos de 24 e 48 horas aumentou a produção de EROs de maneira progressiva (aumento de 68,1% após 24 horas e aumento de 183,2% após 48 horas (Figura 5).

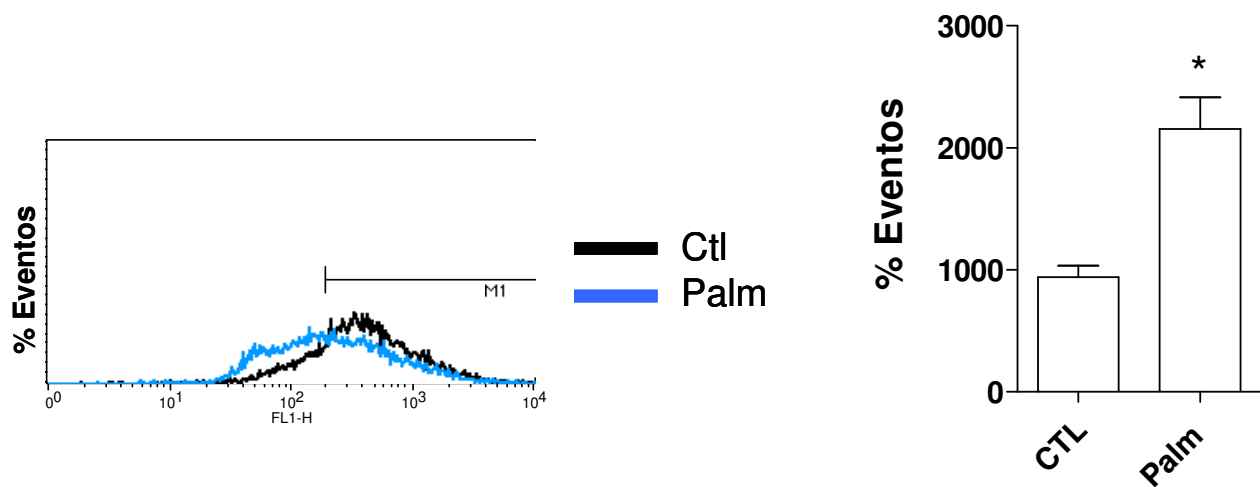


**Figura 5. Produção de EROs em células HepG2 tratadas com Palmitato.** Para determinar a produção de EROs as células foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M por 24 e 48 horas. Após o tratamento as células foram incubadas com DCFH 5 $\mu$ M por 30 minutos e depois mensuradas por citometria de fluxo. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=9). \* p < 0.05 vs. Ctl. \*\*\* p < 0.0001 vs.Ctl. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras



## 5.5 Disfunção mitocondrial causada pelo tratamento com palmitato.

Buscamos investigar por citometria de fluxo a disfunção mitocondrial promovida pelo tratamento com palmitato por 24 horas, já que o aumento das espécies reativas de oxigênio está intimamente ligado a disfunção mitocondrial. Como podemos observar na figura 6, houve um aumento na disfunção mitocondrial de 126,9% no grupo de células tratadas em relação ao grupo de células não tratadas.



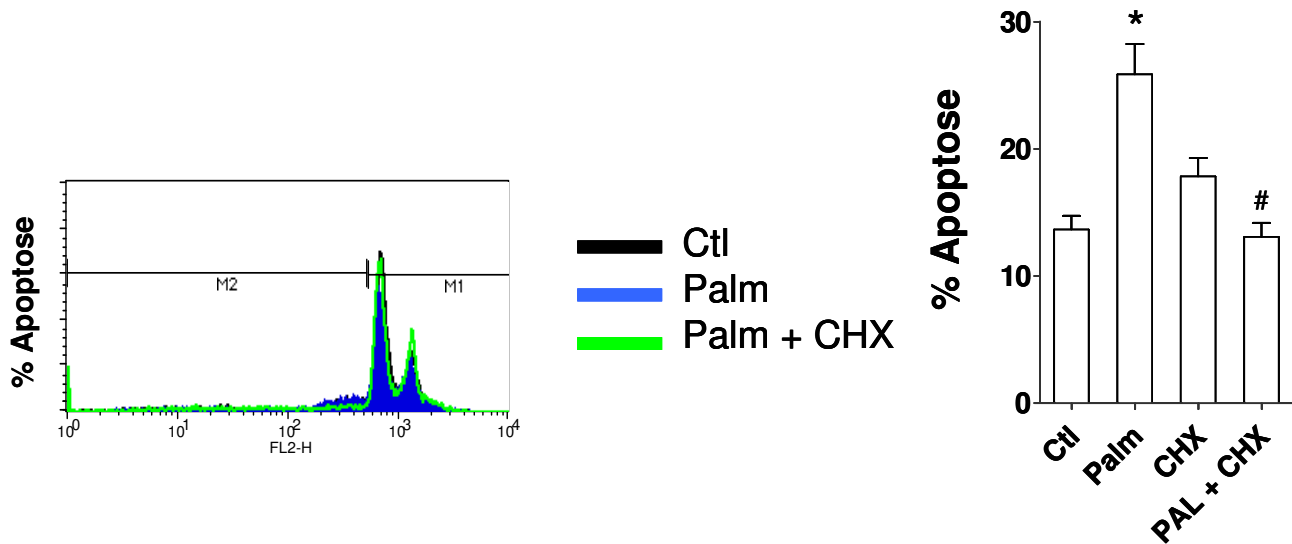
**Figura 6. Disfunção mitocondrial causada pelo tratamento com palmitato.** Para determinar a disfunção mitocondrial as células foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M por 24 horas, e incubadas com Rodamina 123, 1 $\mu$ M por 10 minutos em seguida mensurados por citometria de fluxo. O controle foi tratado por 24 horas com o veículo. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=6). \* P < 0.05 vs. Ctl. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras

## **5.6 Análise das vias de sinalização inflamatórias após tratamento com Ciclohexamida na presença e ausência de palmitato.**

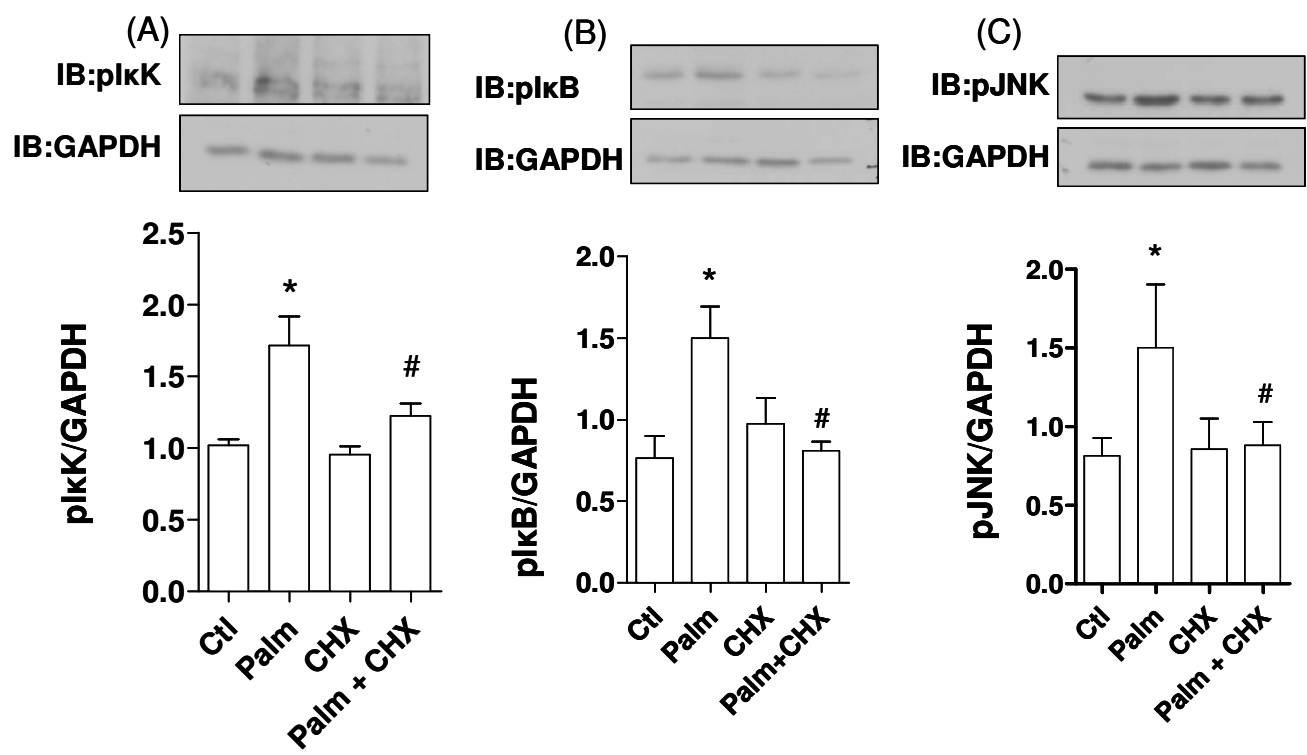
Nestes protocolos procuramos investigar se a inibição da síntese proteica mediada pelo tratamento das células com Ciclohexamida na concentração de 40 $\mu$ M, reverteria os efeitos do palmitato. A figura 7 representa a fragmentação de DNA promovida pelo tratamento das células HepG2 com palmitato e/ou ciclohexamida por 24 horas. As células tratadas com palmitato e ciclohexamida apresentaram uma diminuição da apoptose de 49,5% em relação as células tratadas somente com palmitato.

A figura 8 mostra que a inibição da síntese proteica diminuiu a ativação das proteínas da via do TNF- $\alpha$  estimuladas pelo palmitato. Assim, foi observada uma diminuição de 29,5% na fosforilação da proteína I $\kappa$ K no grupo de células tratado com palmitato e Ciclohexamida em relação ao grupo de células tratados somente com palmitato (Figura 8A). A figura 8B demonstra uma diminuição de 46% na fosforilação de I $\kappa$  $\beta$  no grupo de células tratadas com Ciclohexamida e palmitato em relação ao grupo tratado somente com palmitato. A figura 8C apresenta uma diminuição de 49,9% na fosforilação da proteína JNK no grupo de células tratadas com ciclohexamida e palmitato em relação ao grupo de células tratadas somente com palmitato.

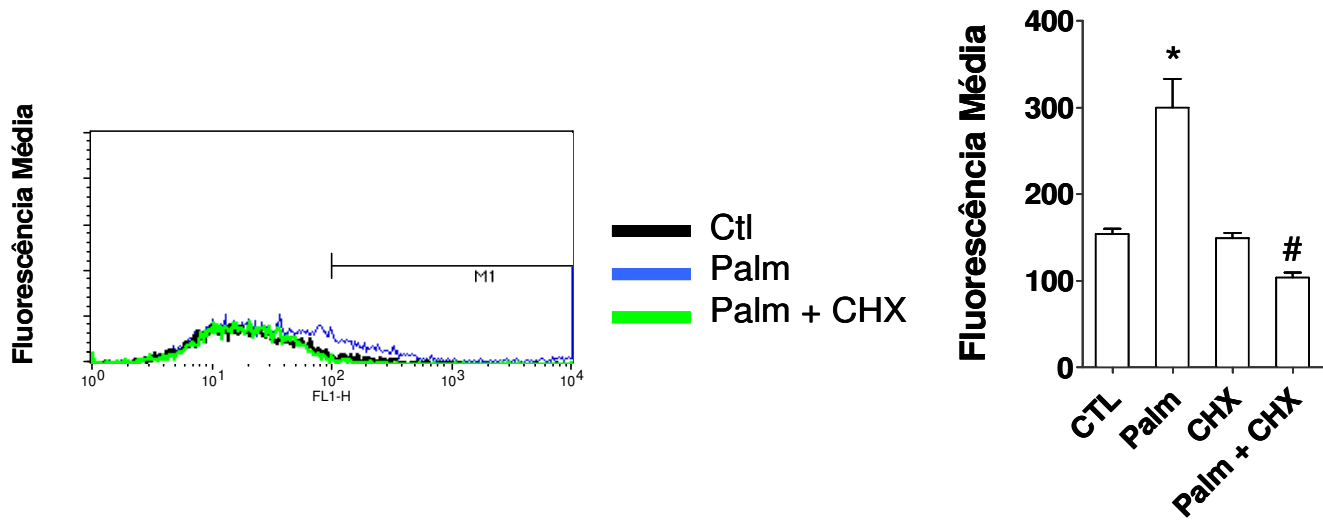
A produção de EROs mostrou-se diminuída 65,4% nas células tratadas com ciclohexamida e palmitato por 24 horas em relação ao grupo de células tratadas com palmitato (Figura9).



**Figura 7. Tratamento concomitante de Ciclohexamida e palmitato, atenua a apoptose.** Para determinar a fragmentação de DNA as células HepG2 foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e CHX 40 $\mu$ M por 24 horas, e incubadas por 24 horas com tampão PBS contendo 20 $\mu$ M/ml de iodeto de propídeo, em seguida mensurada por citometria de fluxo. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=10). \* p < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras



**Figura 8. Tratamento simultâneo de palmitato com Ciclohexamida diminuiu a ativação da via do TNF- $\alpha$ .** Análise da fosforilação de I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK por Western blotting normalizadas por GAPDH. Em células HepG2 tratadas com Palm 250 $\mu$ M e CHX 40 $\mu$ M por 24 horas. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n = 4). \* P < 0.05 vs. Ctl, # p < 0.05 vs. Palm



**Figura 9. Diminuição da produção de EROs em células HepG2 tratadas com palmitato concomitantemente com ciclohexamida.** Para determinar a produção de EROs, as células foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e CHX 40 $\mu$ M por 24 horas. Os valores apresentados são média+EPM (n=6). \* p < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras

## 5.7 Bloqueio da ação do TNF- $\alpha$ utilizando Infiximabe

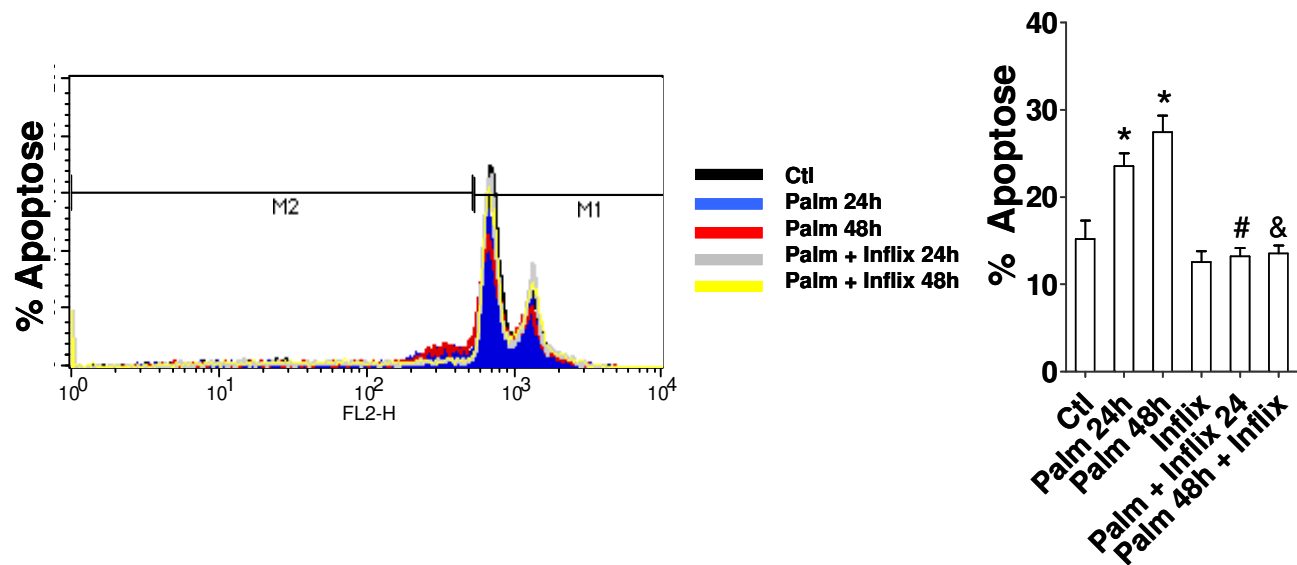
Podemos observar na figura 10 que as células tratadas com Infiximabe e palmitato por 24 e 48 horas apresentaram, respectivamente, taxas de apoptose de 13,5% e 11,8%. Isso representa, respectivamente, uma diminuição de 49,3% e 50,6% em relação ao grupo de células tratada com palmitato por 24 e 48 horas.

A proteína I $\kappa$ K apresentou uma diminuição de 57,3% na fosforilação no grupo tratado com palmitato mais Infiximabe em relação ao grupo de células tratadas com palmitato (Figura 11A). A proteína I $\kappa$  $\beta$  apresentou uma diminuição de 63,5% na sua fosforilação no grupo tratado com palmitato em relação às tratadas com palmitato mais Infiximabe (Figura 11B). A proteína JNK apresentou uma diminuição de 69,6% na sua fosforilação no grupo tratado com palmitato em relação às tratadas com palmitato mais infiximabe (Figura 11B).

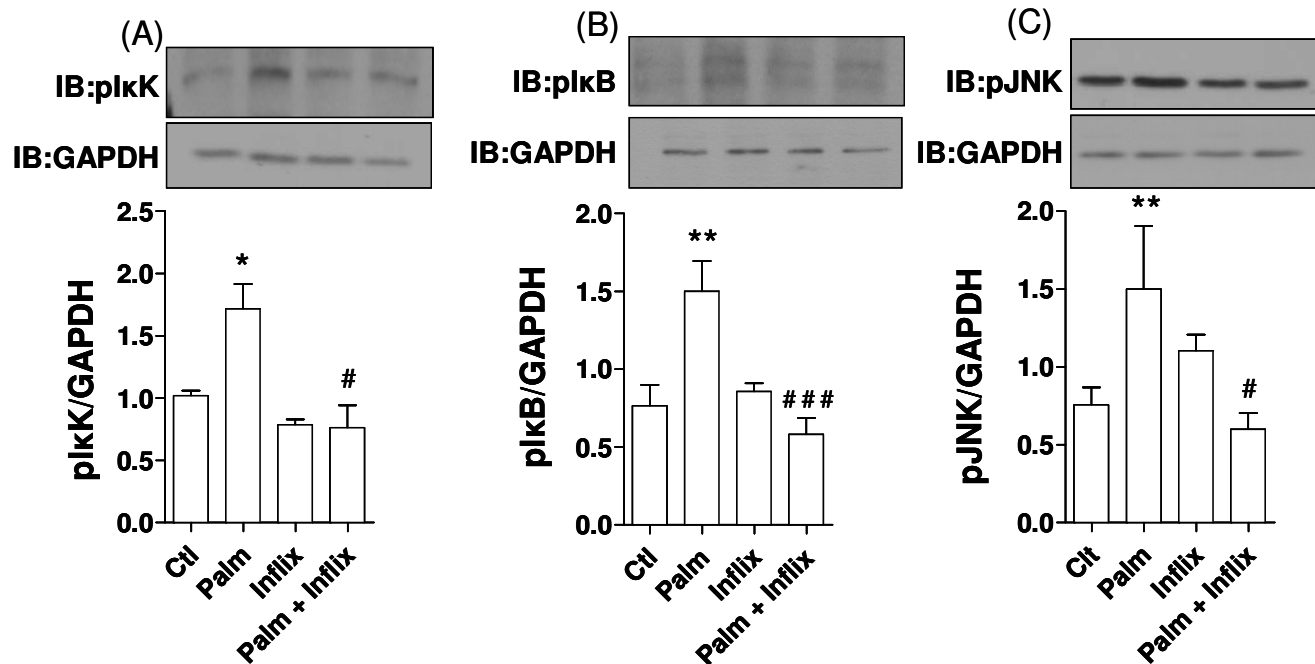
A figura 12 demonstra uma diminuição na produção de EROs de 22,8% e 28,7% em relação as células tratadas somente com palmitato nos grupos de células tratadas com Infiximabe e palmitato por 24 e 48 horas respectivamente

A figura 13 mostra que o tratamento de 24 horas com Infiximabe e palmitato aumenta a integridade da membrana mitocondrial em 43% comparado ao grupo de células tratadas com palmitato.

Outro marcador para disfunção mitocondrial é a razão entre proteínas pró e anti-apoptóticas Bax/Bcl-2. Foi observado um aumento de 109% na razão Bax/Bcl-2 em células tratadas com palmitato em relação ao grupo de células não tratadas. O tratamento simultâneo com Infiximabe reverteu parcialmente esta modulação (Figura 14).

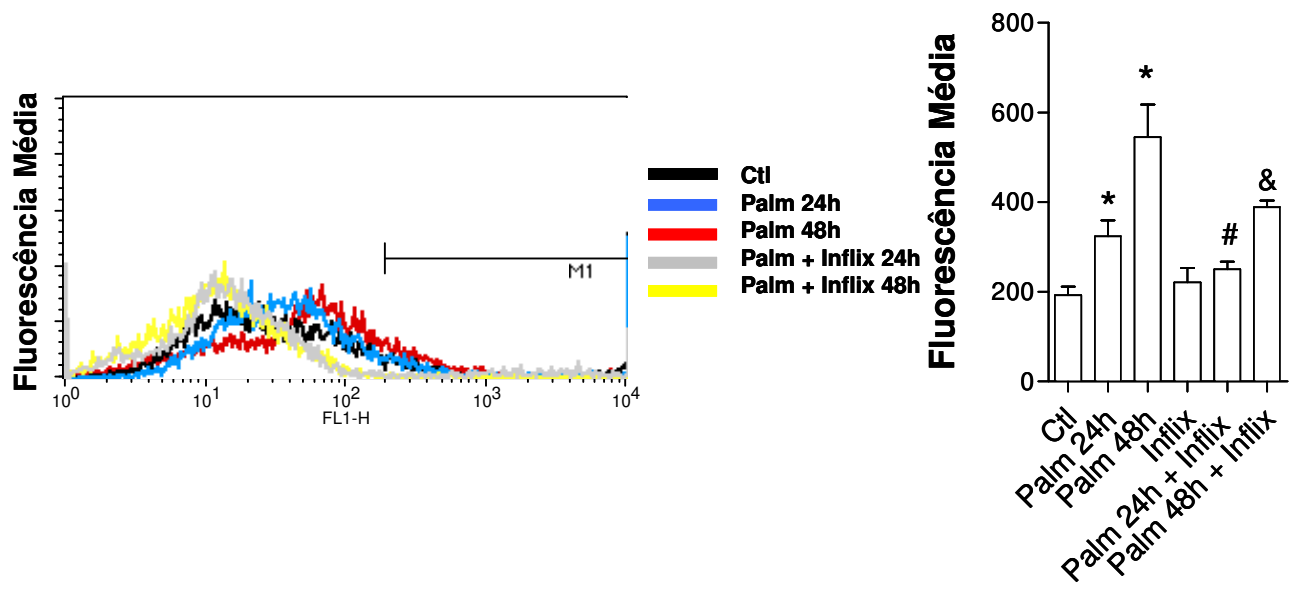


**Figura 10. Tratamento com Infiximabe reverte a apoptose causada pelo palmitato.** Para determinar a fragmentação de DNA as células HepG2 foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e Infiximabe 200 $\mu$ g/ml, por 24 e 48 horas, e incubadas por 24 horas com tampão PBS contendo iodeto de propídeo, em seguida mensurada por citometria de fluxo. O controle foi tratado por 48 horas com o veículo (n=9). \* p < 0.05 vs. Ctl, # p < 0.05 vs. Palm 24h, & p < 0.05 vs. Palm 48h. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM dos três grupos. O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras

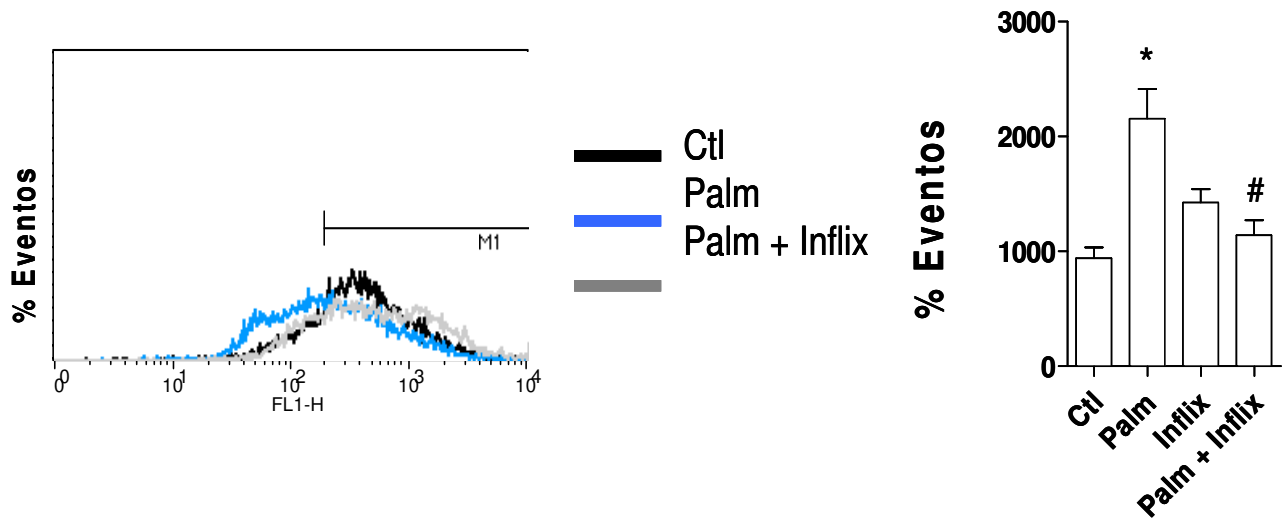


**Figura 11. O tratamento com Infliximabe diminui a atividade das proteínas da via do TNF- $\alpha$  ativadas pelo palmitato.** Foi analisada a fosforilação de I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK por western blotting, normalizadas por GAPDH. As células HepG2 foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e Infliximabe 200 $\mu$ g/ml, por 24 horas. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=6). \* p < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm. ### p < 0.0001 vs Ctl. \*\* p < 0.006 vs. Ctl.

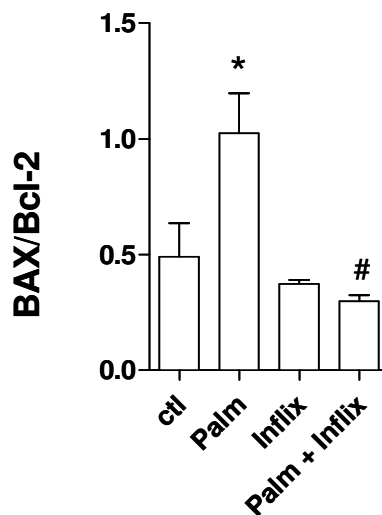




**Figura 12. Diminuição da produção de EROS em células HepG2 tratadas com palmitato concomitantemente com Infiximabe.** Para determinar a produção de EROs as células foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e 200 $\mu$ g/ml de Infiximabe por 24 e 48 horas. Após o tratamento. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=9). \* p < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm 24h. & p < 0.05 vs. Palm 48h. . O histograma ao lado é uma figura ilustrativa que representa o gráfico de barras



**Figura 13. Infiximabe diminui a disfunção mitocondrial causada pelo tratamento com palmitato .** Para determinar a disfunção mitocondrial as células foram tratadas com Palm 250 $\mu$ M e Infiximabe por 24 horas, e incubadas com Rodamina 123, 1 $\mu$ M por 30 minutos em seguida a fluorescência foi mensurada por citometria de fluxo. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=6). \* p < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm.



**Figura 14. Palmitato aumenta a razão Bax/Bcl-2 de RNAm e o tratamento concomitante de Infiximabe reverte essa razão.** Células HepG2 tratadas com Palm 250 $\mu$ M, e 200 $\mu$ g/ml de Infiximabe por 24 horas. Os valores apresentados são média $\pm$ EPM (n=4). \* P < 0.05 vs. Ctl. # p < 0.05 vs. Palm.

## **6. Discussão**

---

Os resultados deste estudo ajudam a entender o possível mecanismo de apoptose induzido por palmitato em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). De maneira análoga, tais resultados permitem interpretações sobre a progressão da NAFLD para o quadro de NASH.

Na primeira parte do trabalho, buscamos avaliar a apoptose gerada pelo palmitato por meio da técnica de citometria de fluxo. Esta técnica permite avaliar a porcentagem de morte celular por meio de ensaio de fragmentação do DNA com iodeto de propídeo. De maneira geral, nossos dados mostram que o palmitato aumenta a fragmentação de DNA em células HepG2. Estes dados são concordantes com a literatura, na qual diversos trabalhos associam a morte celular e ativação dose dependente de caspase 3 em tratamentos com palmitato (Yang & Chan, 2009, Li *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010).

Alem disto, Rho e colaboradores (2007) demonstraram que uma dose sub-tóxica de palmitato, mas não de oleato, induziu a liberação de TNF- $\alpha$  em músculo liso vascular, gerando fragmentação do DNA. No mesmo sentido, Choi e colaboradores (2011) observaram um aumento na expressão e secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em cultura de HepG2, após tratamento com palmitato sem, no entanto, descrever a relevância funcional para este evento. Dessa forma, os trabalhos demonstram forte relação entre tratamento com palmitato, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e o conseqüente desencadeamento do processo apoptótico. Contudo, a comprovação experimental da referida hipótese não foi testada até o presente momento em hepatócitos.

O passo seguinte de nossa investigação consistiu deste modo, em avaliar se o palmitato altera a expressão de TNF- $\alpha$ . Observamos um aumento transitório da expressão RNA mensageiro de TNF- $\alpha$ . Assim, pudemos afirmar que o aumento da expressão RNAm de TNF- $\alpha$  é tempo dependente para o tratamento com palmitato a 250  $\mu$ M. Nas primeiras 6 horas houve um aumento evidente na expressão, o que pode indicar uma resposta das

células frente a um agente inflamatório. No entanto, após 12 horas de tratamento, uma situação de estresse de retículo endoplasmático pode ter se estabelecido levando a uma diminuição da síntese proteica e por consequência do TNF- $\alpha$ . Este é um quadro geralmente encontrado em células expostas a excesso de nutrientes ou a processos inflamatórios, os quais podem desencadear ativação de proteínas da via de resposta à proteínas mal dobradas (conhecida como via da UPR – *unfolded protein response*) na tentativa de restabelecimento da homeostase. Nesta busca pela sobrevivência da célula, há uma diminuição generalizada da síntese proteica favorecendo proteínas específicas da via da UPR (Ron & Walter, 2007).

A partir do aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e a apoptose gerada pelo palmitato, o próximo passo foi analisar a atividade de proteínas envolvidas na via de sinalização do TNF- $\alpha$ , avaliando a fosforilação de I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK. Estas proteínas sofrem ativação quando o TNF- $\alpha$  se liga ao seu receptor. Para tanto, utilizamos a técnica de western blot, após o tratamento com palmitato 250 $\mu$ M por 24 horas. A escolha deste tempo baseou-se na suposição de que se possíveis alterações na via de sinalização em decorrência da ação do TNF- $\alpha$  deveriam ocorrer após o momento máximo de sua expressão.

Os resultados obtidos mostraram aumento na fosforilação de I $\kappa$ K e I $\kappa$  $\beta$ , uma proteína alvo da I $\kappa$ K. Após a degradação da proteína I $\kappa$ B, o fator de transcrição NF $\kappa$ B é liberado, este último se transloca para o núcleo, onde é responsável pela transcrição de vários genes tais com o da iNOS (Traenckner *et al.*, 1995, Ghosh & Karin, 2002).

Outra proteína, também ativada pela cascata de sinalização do TNF- $\alpha$  é a JNK, que apresentou um aumento na sua fosforilação depois do tratamento com palmitato. Esta proteína, após ativação, regula negativamente a via de sinalização da insulina, e, por isso, está intimamente ligada à resistência a este hormônio (Taniguchi, 2006). Além disto, a sua ativação está relacionada à produção de EROs (Nakamura *et al.*, 2009).

Malhi e colaboradores (2006) observaram que o tratamento com palmitato, tanto em células HepG2 quanto em cultura primária de hepatócitos de camundongos, gerou um aumento da produção de EROs, e isso manteve a proteína JNK ativa por mais tempo. Concordante a isto, Gao e colaboradores (2010) evidenciaram um aumento na produção de EROs nas células HepG2, quando tratadas com palmitato, levando a ativação da JNK de maneira dose dependente. Estes trabalhos apontam um papel fundamental da ativação da proteína JNK na apoptose.

O aumento da fosforilação desta proteína apresenta uma estreita relação com a apoptose, pois uma vez ativada, a JNK ativa a proteína pró-apoptótica Bax. Situada na membrana da mitocôndria, a Bax sofre uma alteração conformacional, aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial e liberando citocromo c (Wang, *et al.*,2008).

Esta estreita relação entre a ativação da JNK e a produção de EROs nos levou a realizar um experimento de citometria de fluxo para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio. Como pudemos observar, as células HepG2 tratadas com palmitato apresentaram um aumento expressivo na geração de EROs.

O aumento da produção de EROs nos levou a investigar possíveis alterações na disfunção mitocondrial. Para tanto, as células foram tratadas com palmitato por 24 horas e posteriormente incubadas com Rodamina 123, sonda que emite fluorescência na presença de membrana mitocondrial íntegra. Como pudemos observar o palmitato diminuiu a integridade da membrana mitocondrial.

Baseado nos estudos citados acima, parece que o acúmulo e o aumento na produção de EROs são fundamentais para que ocorra a morte celular em resposta a sinalização do TNF- $\alpha$ . Para avaliar a importância da produção de TNF- $\alpha$  na apoptose em resposta ao tratamento com o palmitato. Para tanto, usamos um fármaco chamado Ciclohexamida, e analisamos a repercussão da inibição da síntese de TNF- $\alpha$ . Esta ferramenta farmacológica

age se ligando ao ribossomo subunidade 60S, impedindo assim a síntese de proteínas. O uso dessa droga se restringe a pesquisas laboratoriais *in vitro*, devido aos seus efeitos tóxicos.

As células HepG2 tratadas com palmitato por 24 horas e Ciclohexamida apresentaram uma diminuição na apoptose de 66,1% quando comparadas ao grupo de células tratadas somente com palmitato. Com este resultado podemos concluir que a inibição da síntese proteica foi responsável pela proteção as células contra a apoptose gerada pelo palmitato.

Dando sequência, fomos investigar a atividade das proteínas da via inflamatória para nos certificar que o TNF- $\alpha$  foi inibido pelo tratamento com Cicloheximida. Com isto, observamos que o palmitato não estimulou a fosforilação de I $\kappa$ K, I $\kappa$ B e JNK na presença de ciclohexamida. A diminuição da atividade destas proteínas nos pareceu como um primeiro indício de que a apoptose pode ser depende de TNF- $\alpha$ .

Visto que o tratamento com Ciclohexamida diminuiu a apoptose causada pelo palmitato em células HepG2, como próximo experimento analisamos, por citometria de fluxo, a produção de EROs em células tratadas com palmitato e Ciclohexamida. Concordante ao wertern blot, verificamos uma diminuição de 47,5% em relação ao grupo de células tratadas com palmitato.

Apesar do tratamento com Ciclohexamida apresentar uma reversão de todos os parâmetros que foram alterados com o tratamento com palmitato, como o aumento da apoptose, o aumento da expressão RNAm TNF- $\alpha$ , o aumento da atividade de proteínas alvo dessa citocina, além do aumento das EROs, isto não permitiu afirmar que a apoptose das células, causada pelo palmitato, seja dependente do TNF- $\alpha$ , uma vez que o tratamento com Ciclohexamida leva à inibição completa da síntese proteica.

Com os achados obtidos através da inibição da síntese proteica, buscamos então uma ferramenta farmacológica mais específica, a fim de tentar comprovar a nossa hipótese de que a apoptose em células HepG2 tratadas com palmitato seria dependente da ação do TNF- $\alpha$ . Para tanto, incubamos as células HepG2 com Infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico que inibe diretamente a ligação do TNF- $\alpha$  aos receptores nas membranas celulares.

No estudo desenvolvido por Barbuio e colaboradores (2007), ratos que comeram dieta hiperlipídica tratados com Infliximabe demonstraram uma diminuição no depósito de gordura no fígado, sugerindo que a diminuição deste depósito está envolvido com a diminuição da ação da citocina pró inflamatória TNF- $\alpha$  promovido pelo tratamento com Infliximabe.

A compreensão dos mediadores moleculares que causam lesões hepáticas promovidas por ácidos graxos devem ajudar no desenvolvimento de intervenções terapêuticas, usando como base o mecanismo em que se desenvolve a doença. Um destes possíveis mecanismos de intervenção terapêutica pode ser o anticorpo anti TNF- $\alpha$ , como o Infliximabe.

Através de citometria de fluxo, observamos uma diminuição na apoptose em 50% em células tratadas com associação palmitato e Infliximabe por 24 e 48 horas, respectivamente, em relação as células tratadas com palmitato. Assim, podemos afirmar que a apoptose causada pelo palmitato em células HepG2 depende da ação desta citocina.

Mediante a diminuição da apoptose após o bloqueio do TNF- $\alpha$ , investigamos a fosforilação das proteínas da via do TNF- $\alpha$ , foi possível confirmar uma diminuição nas fosforização da I $\kappa$ K, da I $\kappa$  $\beta$  e da JNK quando realizado tratamento com a associação palmitato e Infliximabe por 24 horas.



Schlatter e colaboradores (2011) demonstram a relação entre a fosforilação de JNK com a produção EROS. Quando há a ação por parte do TNF- $\alpha$ , ocorre inativação de MKPs mediada por ROS, prejudicando assim a desfosforilação de JNK e, conseqüentemente levando a sua ativação persistente. De maneira concordante com estes achados, mostramos que a produção de EROs e a ativação da JNK estimulados pelo palmitato em células HepG2 também é totalmente dependente da produção de TNF- $\alpha$ .

Como a disfunção mitocondrial é uma importante fonte de EROs (Lockman, *et al.*, 2012), nós em seguida investigamos um parâmetro de integridade de função mitocondrial. Nossos resultados demonstram que a perda de integridade mitocondrial induzida por palmitato também é totalmente dependente da produção de TNF- $\alpha$ . Um dos mecanismos pelo qual o palmitato gera disfunção mitocondrial seguida de apoptose decorre do aumento da razão Bax/Bcl-2. De maneira anti-apoptótica, a proteína Bcl-2 age de forma a minimizar a formação de produção de EROs, protegendo a mitocôndria com uma ação antioxidante, e assim, conservando a integridade da mitocôndria (Lei, *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012). Nossos dados demonstraram que o aumento da razão Bax/Bcl-2 estimulado por palmitato também depende da produção de TNF- $\alpha$ .

O NF- $\kappa$ B desempenha papel anti ou pró apoptótico dependente do tipo de estímulo e tipo celular (Karin & Lin, 2002). Em células  $\beta$  pancreáticas o NF- $\kappa$ B quando ativado promove apoptose, sendo que esta morte celular está relacionada com o desenvolvimento do DM1 (Heimberg, *et al.*, 2001; Ortis *et al.*, 2006). A via do NF- $\kappa$ B pode causar morte celular por mecanismos independente da atividade deste fator de transcrição. Por exemplo, a proteína I $\kappa$ K pode diminuir a sinalização da insulina resultando em menor ativação da AKT e liberação da atividade transcripcional do FOXO1, sabido fator de transcrição da Bax (Kim *et al.*, 2005). Além disto, estudos *in vivo* mostram que camundongos infectados com *Plasmodium* apresentaram um aumento na ativação de NF- $\kappa$ B no fígado e este aumento se dá devido aumento do estresse oxidativo e da ativação da via I $\kappa$ k/I $\kappa$  $\beta$  levando a morte dos hepatócitos (Dey *et al.*, 2012). Nossos resultados

sugerem que, como em células  $\beta$ , a ativação do NF- $\kappa$ B pode mediar a apoptose induzida pelo palmitato.

Ao contrário da via do NF- $\kappa$ B, já relativamente bem estabelecido que a ativação da JNK, seja ela *downstream* ou *upstream* a produção de EROs, culmina na ativação de eventos apoptóticos. Assim, o fato da ativação da JNK pelo palmitato ser dependente de TNF- $\alpha$ , sugere que esta via deve participar da apoptose induzida por palmitato.

Resumidamente, nossos achados mostram que quatro eventos parecem desempenhar papel importante para o aumento da apoptose induzida pelo palmitato em hepatócitos, sendo estes, pela ordem, aumento da produção de TNF- $\alpha$ , ativação de sinalizações pró-inflamatória mediadas por esta citocina, produção de espécies reativas de oxigênio e a disfunção mitocondrial. É possível ainda que a produção de EROs potencialize a ativação específica do JNK, contribuindo para apoptose.

## **7. Conclusões**

---

## 7.1 Sumário

- O palmitato aumenta a apoptose, a produção EROs e disfunção mitocondrial em células HepG2.
- O palmitato aumenta a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ , sendo este um processo anterior a fosforilação de proteínas relacionadas a inflamação e apoptose (I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK).
- O bloqueio da síntese protéica com CHX suprime o efeito apoptótico, a produção de EROs, e também a fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK mediados pelo palmitato em células HepG2.
- A neutralização do TNF- $\alpha$  por Infliximabe suprime o efeito apoptótico, a produção de EROs, a disfunção mitocondrial e também a fosforilação das proteínas I $\kappa$ K, I $\kappa$  $\beta$  e JNK mediados pelo palmitato em células HepG2.

## 7.2 Conclusão Geral

Com estes resultados podemos concluir que a apoptose causada pelo Palmitato em células HepG2 é dependente de TNF- $\alpha$ . O mecanismo gerador de EROs ativado pelo palmitato e seu efeito de redução da integridade da membrana mitocondrial também são secundários ao estímulo da produção do TNF- $\alpha$ .

## **8. Referências Bibliográficas**

---

ADACHI T, TOISHI T, TAKASHIMA E, HARA H. Infliximab neutralizes the suppressive effect of TNF-alpha on expression of extracellular-superoxide dismutase in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(10):2095-8.

AGGARWAL BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004; 6(3):203-8.

AHIMA RS, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ *Trends Endocrinol Metab.* 2000 ;11(8):327-32.

AJUWON KM, SPURLOCK ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr.* 2005; 135(8):1841-6.

ALKHATEEB H, CHABOWSKI A, GLATZ JF, LUIKEN JF, BONEN A. Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(3):E783-93.

ARAÚJO EP, DE SOUZA CT, UENO M, CINTRA DE, BERTOLO MB, CARVALHEIRA JB, SAAD MJ, VELLOSO LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal modelo f diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology.*2007;148(12):5991-7.

BARBUIO R, MILANSKI M, BERTOLO MB, SAAD MJ, VELLOSO LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol.* 2007;194(3):539-50.

BASTARD JP, MAACHI M, LAGATHU C, KIM MJ, CARON M, VIDAL H, CAPEAU J, FEVE B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17(1):4-12.

BLACKMORE L, HARRIS A. A prospective study of inflixima with drawal after 12 months of treatment in patients with Crohn's disease: how will NICE guidance affect patient care? *Clin Med.* 2012; 12(3):235-8.

BODEN G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008; 37(3):635-46, viii-ix.

BONDIA-PONS I, RYAN L, MARTINEZ JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem.* 2012

CHEN G, GOEDDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 2002; 31; 296(5573):1634-5.

CHOI YJ, CHOI SE, HA ES, KANG Y, HAN SJ, KIM DJ, LEE KW, KIM HJ. Involvement of visfatin in palmitate-induced upregulation of inflammatory cytokines in hepatocytes. *Metabolism*. 2011 ;60(12):1781-9.

CHOI YJ, CHOI SE, HA ES, KANG Y, HAN SJ, KIM DJ, LEE KW, KIM HJ. Involvement of visfatin in palmitate-induced upregulation of inflammatory cytokines in hepatocytes. *Metabolism*. 2011; 60(12):1781-9.

CINTI S, MITCHELL G, BARBATELLI G, MURANO I, CERESI E, FALOIA E, WANG S, FORTIER M, GREENBERG AS, OBIN MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans .*J Lipid Res*. 2005; 46:2347–2355

CNOP M, IGOILLO-ESTEVE M, CUNHA DA, LADRIÈRE L, EIZIRIK DL. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(Pt 5):909-15.

DAVIS JE, GABLER NK, WALKER-DANIELS J, SPURLOCK ME. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res*. 2009; 41(7):523-30.

DEIULIIS J, SHAH Z, SHAH N, NEEDLEMAN B, MIKAMI D, NARULA V, PERRY K, HAZEY J, KAMPFRATH T, KOLLENGODE M, SUN Q, SATOSKAR AR, LUMENG C, MOFFATT-BRUCE S, RAJAGOPALAN S. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS One*. 2011; 26;6(1):e16376.

DEY S, BINDU S, GOYAL M, PAL C, ALAM A, IQBAL MS, KUMAR R, SARKAR S, BANDYOPADHYAY U. Impact of Intravascular Hemolysis in Malaria on Liver Dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF $\kappa$ B activation, and neutrophil infiltration. *J Biol Chem*. 2012 3;287(32):26630-46.

EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002; 23(5):599-622.

FELDSTEIN AE, CANBAY A, ANGULO P, TANIAI M, BURGART LJ, LINDOR KD, GORES GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003; 125(2):437-43.

GAO D, NONG S, HUANG X, LU Y, ZHAO H, LIN Y, MAN Y, WANG S, YANG J, LI J. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*. 2010; 24;285(39):29965-73.

GHOSH S, KARIN M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002; 109 Suppl:S81-96.

GLANDT M, RAZ I. Present and future: pharmacologic treatment of obesity. *J Obes*. 2011;2011:636181.

GUICCIARDI ME, GORES GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005; 54(7):1024-33.

HARFORD KA, REYNOLDS CM, MCGILLICUDDY FC, ROCHE HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 2011; 70(4):408-17.

HEIMBERG H, HEREMANS Y, JOBIN C, LEEMANS R, CARDOZO AK, DARVILLE M, EIZIRIK DL. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2001; 50(10):2219-24.

HENAO-MEJIA J, ELINAV E, JIN C, HAO L, MEHAL WZ, STROWIG T, THAISS CA,KAU AL, EISENBARTH SC, JURCZAK MJ, CAMPOREZ JP, SHULMAN GI, GORDON JI, HOFFMAN HM, FLAVELL RA. .Inflammasome- mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012; 1;482(7384):179-85.

HIRABARA SM, SILVEIRA LR, ABDULKADER F, CARVALHO CR, PROCOPIO J, CURI R. HIRABARA SM, SILVEIRA LR, ABDULKADER F, CARVALHO CR, PROCOPIO J, CURI R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol*. 2007; 210(1):7-15.

HOTAMISLIGIL GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 14;444(7121):860-7.

HOTAMISLIGIL GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27 Suppl 3:S53-5.

HOTAMISLIGIL GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S73-8.

ICHIKAWA H, TAKADA Y, MURAKAMI A, AGGARWAL BB. Identification of a novel blocker of I kappa B alpha kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF-kappa B-regulated gene products. *J Immunology*. 2005; 1;174(11):7383-92.

JAESCHKE H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290(6):G1083-8.



JIN S, RAY RM, JOHNSON LR. TNF-alpha/cycloheximide-induced apoptosis in intestinal epithelial cells requires Rac1-regulated reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.2008;294(4):G928-37.

KARIN M, LIN A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002; 3(3):221-7.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

KIM DS, JEON BK, LEE YE, WOO WH, MUN YJ. Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 981675.

KIM SJ, WINTER K, NIAN C, TSUNEOKA M, KODA Y, MCINTOSH CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *J Biol Chem*. 2005; 10;280(23):22297-307.

KIM TH, ZHAO Y, BARBER MJ, KUHARSKY DK, YIN XM. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem*. 2000; 15;275(50):39474-81.

LAYBUTT DR, PRESTON AM, AKERFELDT MC, KENCH JG, BUSCH AK, BIANKIN AV, BIDEN TJ. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007; 50(4):752-63

LEFTEROVA MI, LAZAR MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20(3):107-14.

LEI K, NIMNUAL A, ZONG WX, KENNEDY NJ, FLAVELL RA, THOMPSON CB, BAR-SAGI D, DAVIS RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(13):4929-42.

LI J. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*. 2010; 24;285(39):29965-73

LOCKMAN KA, BAREN JP, PEMBERTON CJ, BAGHDADI H, BURGESS KE, PLEVRIS-PAPAIOANNOU N, LEE P, HOWIE F, BECKETT G, PRYDE A, JAAP AJ, HAYES PC, FILIPPI C, PLEVRIS JN. Oxidative stress rather than triglyceride accumulation is a determinant of

mitochondrial dysfunction in vitro models of hepatic cellular steatosis. *Liver-Int.* 2012; 32(7):1079-92.

MALHI H, BRONK SF, WERNEBURG NW, GORES GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoptosis. *J Biol Chem.* 2006 28;281(17):12093-101.

MARCHI S, MARINELLO M, BONONI A, BONORA M, GIORGI C, RIMESSI A, PINTON P. Selective modulation of subtype III IP<sub>3</sub>R by Akt regulates ER Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Cell Death Dis.* 2012 3; 3:e304.

MATSUI H, YOKOYAMA T, SEKIGUCHI K, IJIMA D, SUNAGA H, MANIWA M, UENO M, ISO T, ARAI M, KURABAYASHI M. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes. *PLoS One.* 2012; 7(3):e33283.

MORGAN D, OLIVEIRA-EMILIO HR, KEANE D, HIRATA AE, SANTOS DA ROCHA M, BORDIN S, CURI R, NEWSHOLME P, CARPINELLI AR. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia.* 2007; 50(2):359-69.

NAKAMURA S, TAKAMURA T, MATSUZAWA-NAGATA N, TAKAYAMA H, MISU H, NODA H, NABEMOTO S, KURITA S, OTA T, ANDO H, MIYAMOTO K, KANEKO S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009; 29;284(22):14809-18.

NEUSCHWANDER-TETRI BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005;330(6):326-35.

NIETO-VAZQUEZ I, FERNÁNDEZ-VELEDO S, KRÄMER DK, VILA-BEDMAR R, GARCIA-GUERRA L, LORENZO M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem.* 2008; 114(3):183-94.

ORTIS F, CARDOZO AK, CRISPIM D, STÖRLING J, MANDRUP-POULSEN T, EIZIRIK DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(8):1867-79.

PARK HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4807-18.

PEETERS A, BARENDREGT JJ, WILLEKENS F, MACKENBACH JP, AL MAMUN A, BONNEUX L. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med.* 2003; 7;138(1):24-32.

PERRY AW. Nature and Treatment of Obesity. Cal State J Med. 1903; 1(12):356-9.

QUEIROZ JC, ALONSO-VALE MI, CURI R, LIMA FB. Control of adipogenesis by fatty acids Arq Bras Endocrinol Metabol.2009; 53(5):582-94.

RHO MC, AH LEE K, MI KIM S, SIK LEE C, JEONG JANG M, KOOK KIM Y, SUN LEE H, HYUN CHOI Y, YONG RHIM B, KIM K. Sensitization of vascular smooth muscle cell to TNF-alpha-mediated death in the presence of palmitate. Toxicol Appl Pharmacol.2007 1;2;20(3):311-9

RIBEIRO PS, CORTEZ-PINTO H, SOLÁ S, CASTRO RE, RAMALHO RM, BAPTISTA A, MOURA MC, CAMILO ME, RODRIGUES CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. Am J Gastroenterol.2004;99(9):1708-17.

RIGAZIO S, LEHTO HR, TUUNANEN H, NÅGREN K, KANKAANPAA M, SIMI C, BORRA R, NAUM AG, PARKKOLA R, KNUUTI J, NUUTILA P, IOZZO P. The lowering of hepatic fatty acid uptake improves liver function and insulin sensitivity without affecting hepatic content in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 295(2):E413-9.

RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8(7):519-29.

SCHLATTER R, SCHMICH K, LUTZ A, TREFZGER J, SAWODNY O, EDERER M, MERFORT I. Modeling the TNF $\alpha$ -induced apoptosis pathway in hepatocytes. PLoS One. 2011 20;6(4):e18646

SCHWABE RF, BRENNER DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006; 290(4):G583-9

SWINBURN BA, SACKS G, HALL KD, MCPHERSON K, FINEGOOD DT, MOODIE ML, GORTMAKER SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet 2011; 378:804–814.

SYN WK, CHOI SS, DIEHL AM. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. Clin Liver Dis. 2009; 13(4):565-80.

TANIGUCHI CM, EMANUELLI B, KAHN CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(2):85-96.

TRAENCKNER EB, PAHL HL, HENKEL T, SCHMIDT KN, WILK S, BAEUERLE PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. EMBO J.1995 15; 14(12): 2876–2883.

UYSAL KT, WIESBROCK SM, HOTAMISLIGIL GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology*. 1998; 139(12):4832-8.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84

VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB. Bcl- regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*.1997. 28;91(5):627-37.

WANG Y, AUSMAN LM, RUSSELL RM, GREENBERG AS, WANG XD. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr*. 2008; 138(10):1866-71.

WATT MJ, HOY AJ, MUOIO DM, COLEMAN RA. Distinct roles of specific fatty acids in cellular processes: implications for interpreting and reporting experiments. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(1):E1-3.

WEI Y, WANG D, GENTILE CL, PAGLIASSOTTI MJ. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid- mediated endoplasmicreticulum stress and cell death in liver cells. *Mol Cell Biochem*.2009;331(1-2):31-40.

XU H, BARNES GT, YANG Q, TAN G, YANG D, CHOU CJ, SOLE J, NICHOLS A, ROSS JS, TARTAGLIA LA, CHEN H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821–1830.

YANG X, CHAN C. Repression of PKC mediates palmitate-induces apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2. *Cell Res*. 2009;19(4):469-86.

ZHANG L, SEITZ LC, ABRAMCZYK AM, CHAN C. Synergistic effect of cAMP and palmitate in promoting altered mitochondrial function and cell death in HepG2 cells. *Exp Cell Res*. 2010 10;316(5):716-27.