

DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA

***INTEGRAÇÃO ENTRE VIAS METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS DURANTE
A DE ESTEATOSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA***

CAMPINAS

2008

DENNYS ESPER CORRÊA CINTRA

***INTEGRAÇÃO ENTRE VIAS METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS DURANTE
A ESTEATOSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA***

Tese de Doutorado apresentada a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, na área de Ciências Básicas

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C493i Cintra, Dennys Esper Corrêa
Integração entre vias metabólicas e inflamatórias durante a
esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica / Dennys Esper
Corrêa Cintra. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Diabetes. 2. Resistência à insulina. 3. Esteatose hepática. 4.
Inflamação. 5. Interleucina-10. I. Velloso, Lício Augusto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês: Integration between metabolic and inflammatory
pathways during hepatic steatosis induced by hiperlipidic diet**

Keywords: • Diabetes
• Insulin resistance
• Hepatic steatosis
• Inflammation
• IL-10

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni
Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro
Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi
Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Data da defesa: 04 - 12 - 2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Dennys Esper Corrêa Cintra

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros:

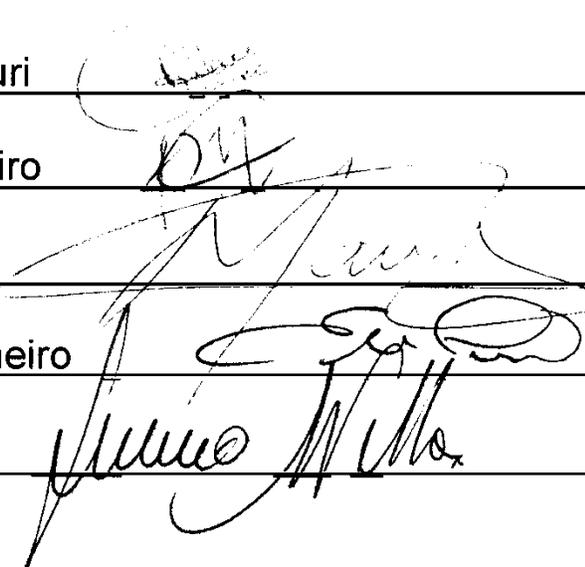
1. Prof^a. Dr^a. Tânia Cristina Pithon Curi

2. Prof^a. Dr^a. Jaqueline Pontes Monteiro

3. Prof. Dr. Marcio Albero Torsoni

4. Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

5. Prof. Dr. Lício Augusto Velloso



The image shows five handwritten signatures in black ink, each corresponding to one of the members listed on the left. The signatures are written over horizontal lines that align with the member names. The signatures are: 1. Tânia Cristina Pithon Curi, 2. Jaqueline Pontes Monteiro, 3. Marcio Albero Torsoni, 4. Everardo Magalhães Carneiro, and 5. Lício Augusto Velloso.

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

Data: 04/12/2008

À memória de Ricardo Vinícius Ledesma Contarteze – o diabo lôro – Como parte dos meus agradecimentos, dedico essa Tese a ti amigo! Frases suas como... —Só espero a reciprocidade; ou —Porque o que é..é! Extrapolam os discursos filosóficos de quem as compreendem. Cuide de nós. Porque o que é, é. Um abraço.

À “dona” Shirley e ao “seu” Daniel. Uma cientista natural e um inventor por natureza. Que bom que também esses genes se manifestaram em mim! Se os conhecimentos gerados por essa Tese puderem algum dia ajudar alguém, então realmente a parte a que me cabe dela merece ser dedicada a vocês, que doaram suas vidas com integralidade ao próximo, seja através da educação, mãe, ou pela essência, pai. Aprendi a amar meu trabalho vendo como amam os seus, vivendo por eles e se rejuvenescendo com eles. Portanto, dedico também cada segundo de prazer que senti na construção desse conhecimento a vocês. Muito obrigado.

Certamente no começo fez-se a luz. Se *Big Bang* ou o estalar de dedos do Criador, não importa, pois é a dúvida que nos diverte. Agradeço imensamente a Deus, por não deixar que as dúvidas se encerrem. Suas curiosas manifestações em minha vida continuam a me impulsionar. E por não me deixar desistir, Dedico-a.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Dom Quixote lutou até contra seus imaginários e imensos moinhos de vento, em nome de uma sociedade mais justa. Certamente o cavaleiro errante sentir-se-ia embaraçado ao ver que técnicas mais simples como competência, serenidade, educação e amor ao trabalho podem, juntas, ser mais eficazes pelo bem comum, sem a necessidade de tanto “barulho”. Seja perante o microscópico meio intracelular, na sociedade dos homens ou em qualquer outra proporção do Universo, os fins nunca justificam os meios. É isso que aprendi de forma sutil e diária com o caráter de um homem nobre. Mestre, ao seu lado e sob seus olhos, me desconstruí para poder me reconstruir um pouco melhor. Ao lado da ciência justa e em busca das curas, estaremos juntos e reafirmo meu compromisso. Lício, muito obrigado.

À Angélica querida, exemplo de socializadora. Mãe absoluta e inata. Perfeita.

AGRADECIMENTOS

Aos Animais Experimentais, com todo respeito e gratidão.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, que com toda sua excelência, abriu um cantinho para me abrigar. Universidade à qual o meu orgulho será eterno. Muito obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, que com sua extrema seriedade, compromisso e competência de seus dirigentes, oferecem a esse e muitos outros trabalhos em nosso laboratório, uma chance. À essa Fundação à qual muito me orgulho de fazer parte desse país, muito obrigado.

À creche CECI, que cuidou durante toda minha estada aqui na Unicamp, do pequeno Pedro, possibilitando a segurança dele e tornando então possível a construção dessa obra. Essa creche é o exemplo mais convincente de que tanto o cuidado com os pequenos quanto a educação que é dada a eles, não necessita mais de dinheiro do que de pessoas competentes. Cercada de pessoas muito capazes, de forma simples, mas categórica, essa creche desfez o paradigma capital x qualidade. Muito obrigado por cuidarem da vida do meu pequeno e ainda serem um exemplo para o país.

Ao professor Lício Augusto Velloso, que desde o primeiro almoço de chegada no Aulus, até o último puxão de orelha, educou-me e cuidou sim de nossa família como se fosse a dele. Sempre preocupado e interessado no bem estar de todos os alunos, conseguiu claramente nos proporcionar um ambiente de trabalho muito bom, e a isso também, muito obrigado.

Ao professor Everardo, com quem sempre tive ótimos momentos, desde as discussões científicas, filosóficas, e também as de outra ordem. Obrigado pelo espaço cedido em seu laboratório e em seu precioso tempo.

À Jacqueline Pontes Monteiro, que entrou em minha vida de uma forma curiosa e a manteve-se até hoje. Nesse momento, não haveria outro lugar onde eu gostaria que estivesse, a não ser ao meu lado em mais um apoio. Mas quem sabe, já já, lado a lado numa parceria por uma nutrição de mais qualidade no país que ainda é

tão carente. Eu e certamente o Brasil também nos orgulhamos de tê-la entre as mais competentes nutricionistas desse país. Pelos apoios de sempre, pela preciosidade em meus outros momentos de formação, e simplesmente pelo exemplo de pessoa que é, muito obrigado.

Ao Márcio Torsoni, pelos ensinamentos e pelas inúmeras trocas de conhecimentos às quais me deu oportunidade sempre. Admiro muito as formas com que observa o mundo biológico e mais ainda a didática de suas compreensões. Espero estarmos juntos por muito mais tempo pela bioquímica a fora. A você, minha admiração e respeito.

À Mirian Ueno, pelo exemplo máximo de organização, concentração e gosto pelo que faz. Seus cuidados com os animais são exemplos de pesquisa bem conduzida. Sinto-me muito confortado por ter por perto uma colega nutricionista de tamanha competência e com muita dedicação pela profissão em comum. Sigo seus passos.

Ao Mário Saad, a minha admiração, que não se encaixaria nessas linhas apertadas, compreenda por favor! Por mim e pelos outros dois amigos, te digo que a simplicidade com que trata todas as situações nos ajuda a controlar os ímpetus peculiares aos nossos trinta e poucos anos... Por isso e, além disso, estamos juntos, não deixando a centrífuga parar! Num dos espaços mais democráticos da UNICAMP, seu laboratório, agradeço pela oportunidade. Muito obrigado.

À minha visionária mãe, Shirley, não apenas pelos apoios maternos tradicionais, mas por botar realmente a mão na massa comigo, junto desta obra. Desde a ajuda nos esmaltes das lâminas de imunohistoquímica que construímos juntos, até os desenhos magníficos das peças que compõem os esquemas didáticos presentes nos slides desta apresentação. Obrigado por tudo.

Àquele que esteve literalmente comigo, no colo, durante a escrita de muitas das páginas desta obra. Menino curioso. Tu és pedra, Pedro. E junto de ti estarei sempre, te esperando para a vida desbravar.

Tita, Jack e Timão, irmãos queridos, obrigado por me acreditarem.

Cris e Mauro, os quais fiz seus exemplos de garra, os meus. Obrigado nada! Parabéns!

Ao Cláudio Teodoro de Souza, o Cafu, e à Eliana Araújo, meus nobres tutores, que abraçaram minha causa logo quando cheguei. Me ensinaram muito mais do que passos laboratoriais. Obrigado pelo apoio, amizade e direcionamento em muitos instantes.

Ao Rodrigo Seré - o monstro. Nobre amigo e “segundo orientador”. A ti devo muito desta tese. Acho que nunca aprendemos tanto profissionalmente quanto aqui. Nossos mestres são nossas maiores referências, mas seus ensinamentos para mim foram fundamentais, pra não dizer *ipsis litteris* aos deles. Desde os doloridos puxões de orelha, até as travessuras em nome da ciência, foram seus os ensinamentos. Sua determinação, concentração e objetivismo são privilégios que busco alcançar. Se eu não conseguir herdá-los, então que pelo menos seu afilhado os herde. Pelas baladas noturnas experimentais, pelos ratos em casa, pela panturrilha de Lavras, pelos gastos extras em nome de artigos, capítulos e livros, é que sei que, se trabalhar, dá. Por isso, vamos à luta pelo dia que nos aproximará de novo. Muito obrigado.

À Juliana, parceira incontestável. Dentro do laboratório a amizade fica em segundo plano, mas a parceria não! Corroboro seus compromissos com a verdade, o caráter e o trabalho. Sua inteligência extrapola as portas do lab. Obrigado pelas construções intelectuais. Certamente elas não seriam as mesmas sem seu brilho.

Ao Eduardo, meu jovem e silencioso amigo. Seu compromisso e seriedade com o trabalho são seus alicerces preciosos, e com isso aprendo muito. Você tem sido um exemplo nobre, o qual tento seguir. É no seu agradecimento que faço a menção para uma das melhores EQUIPES à qual eu já tive o prazer e a oportunidade de fazer parte. Foi com você, Rodrigo, Cafu e Juliana, os quais me fizeram, durante um bom tempo, ir embora impressionado para casa. Desde que nos fundamentamos como equipe, a linguagem idêntica, a vontade e a paixão pelo trabalho, e a construção melhor de nós como seres humanos, são evidentes nessa relação, seguindo o outro e fortíssimo exemplo dado pelos nossos chefes. Avante!

À Joseane Morari, pelo carinho com que adotou o Real Time e pela paciência com que o “empresta” para todos. Se todos possuíssem o cuidado que você tem com o bem público, as universidades estariam em outros patamares de conservação. Nossos debates sobre toda a experimentação à qual nos encontramos são muito instigantes. Guardarei seus ensinamentos com muito apreço. Obrigado por tudo e bem vinda para junto de nós.

Ao Marcos Bissoli, Valéria Vieira, Cláudia Amaral e Eliane Garcia, juntos, formam o mais impressionante e melhor time de professores-cidadãos, que lutam com suas vidas em nome da Universidade pública, gratuita e de qualidade. Baseado em seus princípios éticos, morais e em suas idéias e ideologias é que me encontro aqui lutando por isso também. Não há título de nobreza, de ciência ou de fé, que os qualifique ou gratifique melhores do que já são, mestres. O país e a educação carecem de vocês e os merecem mais do que quaisquer outros. Em cada linha composta nesta tese e em cada idéia utilizada nesta construção, estiveram comigo, por isso ela é de vocês também.

Ao Michel, amigo intenso. A distância não nos impediu de continuarmos a cientificar tudo o que vemos pela frente. A determinação com que conduziu sua vida, me enche de orgulho. Obrigado por estar junto, sempre!

Ao Adimilson, sua simplicidade e humildade só o tornam ainda mais especial. Isso tudo me ensinou sempre, muito e de forma grandiosa. Um cientista da vida, com quem aprendo constantemente. Um inventor, raro mesmo! Muito obrigado por estar comigo em todos os momentos e nesse também. Do começo ao fim. Obrigado amigo.

À Regiane, de Jarbas. Pelos exemplos de paixão pelas ciências da vida. Todas elas! A intensidade que possui pelos sentimentos é absurdamente memorável. Se tornei-me um dia alguém um pouco melhor do que já fui, isso foi por ter-me feito entender a nobreza daquilo que está diante dos nossos olhos e não vemos, apenas sentimos. Caiu? Levanta, sacode a poeira e dá a volta por cima. É justamente a nossa imaculada amizade que me conduz ao eterno muito obrigado. De ponta a ponta nesta tese.

Ao amigo André Vasconcelos. Os velhos tempos não deixaram as coisas boas para trás. Obrigado pelos artigos de sempre, pela presença, e pelas boas oportunidades que cria perante os olhares sob as coisas minúsculas. A ciência é intrigante mesmo. Continuemos juntos em busca da compreensão das gorduras.

À Neuza Maria Brunoro Costa, pelo enorme degrau que é o mestrado, o qual me ajudou a subir. Alguns valores são percebidos na hora, outros, bem depois! Seus ensinamentos foram e serão sempre fundamentais para a busca à qual me dedico. Espero que eu possa agradecer a você, um dia quem sabe, devolvendo alento aos que necessitarem da ciência da nutrição. Foi muito bom ter podido estar junto de ti.

À Sylvia Francescini e Sílvia Priore, pelo exuberante exemplo de profissionais. Uma luta que me convida diariamente a entrar. Seus esforços pela universidade pública de qualidade são exemplos nacionais. O respeito pelos alunos é diretamente proporcional ao carinho que têm de volta. Em muitos momentos dessa tese, me inspirei em seus ensinamentos. Fora da tese, me inspiro em todos os momentos. Muito obrigado pelo exemplo inesquecível.

À Andressa, amiga que foi fundamental no desembaraço dos nós que apareceram nesta tese e em todos os outros momentos. Nunca esquecerei que temos que começar de algum lugar. Não importa se é do fim. Um ensinamento vital para mim. Muito obrigado.

Ao Rodrigo, Fábio e Maurício – amigos presentes em absolutamente tudo em minha vida, e nesta tese, não poderiam ser diferente. Obrigado pelo apoio desde que começamos.

Ao senhor Luís Janeri. Agradeço não apenas o apoio em nossos experimentos, mas faço registrar que o senhor é um dos profissionais mais surpreendentes que já conheci. Sua dedicação pelo trabalho, sua preocupação com seus afazeres e seu rigor com horários, compromissos e também com tudo o mais que executa são brilhantes! Se todos os técnicos do funcionalismo público executassem suas obrigações como o senhor executa as suas, muito dinheiro seria economizado ou utilizado com maior propriedade. Certamente as universidades gozariam de *rankings* superiores. Ao senhor, todo o meu respeito.

Ao Márcio, Luís e Araken, pelo apoio enorme na minha tese, mas principalmente pelo cuidado e carinho com que tratam os animais experimentais. Se todos que trabalham com animais de laboratório experimentais o exercessem com a preciosidade que dedicam a eles, provavelmente não seriam mais necessários comitês de ética para experimentação animal. Com vocês, só tenho a aprender.

Ao Gérson, pelo cuidado excessivo que desempenha com o nosso patrimônio público.

Aos queridos primos Josi e Rubão, pelo nosso acolhimento inicial em Campinas. Além disso, vocês foram muito importantes em nossa segurança sentimental, longe dos nossos pais. Muito obrigado.

À dona Conceição, auxiliar de cozinha na FCM, obrigado pelos precisos cafés, que me mantiveram bem, principalmente nas pós-experimentações noturnas.

Aos colegas dos Laboratórios de Sinalização Celular (Alê, Andressa, Erika, Gabi, Giovanna... êê Giovanna, Marciane, e Talita) e de Investigação da Resistência à Insulina (Andréa, Bruno, Dioze, Guilhermão, Paula...), pela convivência agradável nesses anos todos de pesquisa.

“...que se pinte de negro, que se pinte de mulato, não só entre os alunos, mas também entre os professores; que se pinte de operário e de camponês, que se pinte de povo, porque a Universidade não é patrimônio de ninguém e pertence ao povo...”

Chê

SUMÁRIO

ÍTEM	PÁGINA
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO	44
3.1.1 ANIMAIS	44
3.1.2 CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (SENSE E ANTISENSE)	45
3.1.3 PREPARO DA DOSE DE ANTICORPO ANTI IL-10	46
3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	46
3.2.1 ELISA	46
3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO	47
3.2.3 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À GLICOSE	47
3.3 EXTRAÇÃO DOS TECIDOS	47
3.3.1 IMUNOBLOT	49

3.3.2	IMUNOPRECIPITAÇÃO	51
3.4	PCR QUANTITATIVO	52
3.5	HISTOLOGIA	54
3.5.1	HEMATOXILINA E EOSINA	54
3.5.2	IMUNOHISTOQUÍMICA	54
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4	CAPÍTULO 1 - ARTIGO 1	56
4.1	CAPÍTULO 2 - DISCUSSÃO	67
5	CONCLUSÃO	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLAS

ACC	Acetil CoA carboxilase
ACC-2	Acetil CoA Carboxilase-2 (isoforma)
ADP	Adenosina difosfato
AKT/PKB	Proteína serina/treonina quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
ChREBP	Proteína ligadora do elemento regulado por carboidrato
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAS	Ácido graxo sintase
FKHR (FOXO-1)	Fator de transcrição da família forkhead
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol 3, 4, 5 trifosfato
IR	Receptor de insulina
IRS-1/2	Substrato 1/2 do receptor de insulina
kDa	Quilodalton
<i>Kitt</i>	Constante de decaimento de glicose
NAFLD	Doença hepática do fígado gorduroso
NASH	Esteato-hepatite não-alcoólica

NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
PPAR α	Receptor α ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR γ	Receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SREBP-1c	Proteína ligadora -1c do elemento regulador de esteróide
TG	Triacilglicerol
TNF- α	Fator de necrose tumoral - α
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
UCP-2	Proteína desacopladora mitocondrial-2

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[RESUMO]

A obesidade se manifesta de forma pandêmica, acometendo milhões de pessoas, principalmente nos países ocidentais e industrializados. Além dos inúmeros aspectos comportamentais e sociais, o desenvolvimento dessa doença contribui consideravelmente para o aumento da morbidade e mortalidade em decorrência de sua freqüente associação com outras doenças que compõem a síndrome metabólica, tais como, diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia, ovários policísticos, esteatose hepática, entre outras. Os distúrbios no metabolismo de ácidos graxos frequentemente relacionados à obesidade contribuem para a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. No fígado, o simples acúmulo de gordura no parênquima (esteatose hepática) pode ser um estado transitório e benigno, facilmente reversível. Entretanto, com a perpetuação do quadro, e dependendo de algumas características genéticas ainda pouco conhecidas, ativa-se uma resposta inflamatória que desempenhará papel central na progressão da esteatose para esteato-hepatite, fibrose e cirrose, sendo esta um estágio final da doença hepática. Durante a instalação da inflamação hepática, uma série de citocinas pró-inflamatórias são expressas e participam da indução da disfunção orgânica. Entretanto, alguns estudos recentes revelam que a interleucina-10 (IL-10), uma citocina antiinflamatória, também é produzida no fígado e que sua presença nesse contexto ameniza a progressão para graus avançados de lesão hepática. O objetivo desse trabalho foi investigar como a IL-10 endógena modula alguns parâmetros inflamatórios e metabólicos no fígado de um modelo animal de obesidade, resistência à insulina e esteato-hepatite induzidos por dieta. Para tal, a IL-10 foi inibida *in vivo* por técnicas de inativação com anticorpo específico e oligonucleotídeos de cDNA modificado complementares ao RNAm dessa proteína, impedindo sua tradução. A inibição da IL-10 em animais que consumiram dieta rica em gordura acentuou a disfunção hepática, inibindo a atividade de importantes proteínas como as do receptor de insulina e seus substratos (IR, IRS-1 e IRS-2), fomentando o processo inflamatório local e ativando vias pró-apoptóticas. A partir desses resultados, conclui-se que a IL-10 endógena atua como um fator protetor, controlando vias inflamatórias durante a progressão da esteatose para esteato-hepatite não alcoólica.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[ABSTRACT]

Obesity has grown as an epidemiological phenomenon that threatens millions of people worldwide, and particularly those living in western, developed countries. Besides its multiple behavioral and social problems, obesity contributes considerably to increase morbidity and mortality due to its common association with diseases that compose the metabolic syndrome, such as diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, polycystic ovaries, hepatic steatosis, among others. The abnormalities in the metabolism of fatty acids that frequently occur in obesity, contribute to the dysfunction of a number of organs and systems. In the liver, the simple accumulation of fat in the parenchyma cells leads to steatosis which is somewhat benign and reversible. However, as far as the condition is maintained, and depending on some yet to be known genetic factors, an inflammatory response can be installed leading to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis, a terminal liver disease. During the installation of steatohepatitis, a number of proinflammatory cytokines are expressed, contributing to the progression of the liver damage. However, some recent studies have shown that interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine, is produced in the liver and plays a role in the negative modulation of the inflammatory response. The objective of the present study was to evaluate the roles of IL-10 as an endogenous factor controlling inflammatory and metabolic parameters in diet induced hepatic steatosis. IL-10 was inhibited *in vivo* by two distinct methods, a neutralizing antibody and an antisense oligonucleotide. The inhibition of IL-10 in diet induced steatohepatitis increased proinflammatory cytokine expression and worsened a number of metabolic parameters, including insulin signal transduction. Thus, IL-10 is an endogenous factor that modulates inflammatory response in diet-induced hepatic disease.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[1 – INTRODUÇÃO]

A obesidade é reconhecida hoje como um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo (WHO, 1997; Elobeid et al., 2008). Diversos estudos epidemiológicos e clínicos têm confirmado a contribuição da obesidade para o desenvolvimento e/ou avanço de diversas doenças, como hipertensão arterial e diabetes melitus (Must et al,1999), além do aumento da mortalidade por complicações cardiovasculares. O simples excesso de peso corporal já é suficiente para aumentar as taxas de mortalidade (Steavens et al, 1998). Em países desenvolvidos, a influência da obesidade e das condições a ela relacionadas (pressão arterial elevada, hipercolesterolemia e inatividade física), têm sido responsáveis pela invalidez de aproximadamente 30% da população acometida (Ezzati et al, 2002). Uma importante condição associada à obesidade e também ao diabetes é a esteatohepatite não-alcoólica, que emerge como um novo problema clínico entre esses pacientes.

A doença não alcoólica do fígado gorduroso ou NAFLD, do inglês “*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*” é uma condição clínico-patológica comum, caracterizada principalmente pela presença de macrogotículas de gordura no hepatócito (Diehl et al. 1999), devido à diminuição na oxidação das gorduras no fígado, ou pela redução na exportação dos triacilgliceróis (TG) pela lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) à partir do órgão. A NAFLD representa um amplo espectro de doenças hepáticas, que variam desde uma simples esteatose, sem qualquer evidência de inflamação e com bom prognóstico, até um grave processo necro-inflamatório, com presença considerável de fibrose e/ou cirrose. A combinação entre esteatose hepática (EH) e inflamação resulta na chamada esteato-hepatite ou NASH do inglês “*Nonalcoholic Steatohepatitis*” (Brunt, 2001). A NAFLD é talvez a causa principal de morbidade e mortalidade ligadas às doenças do fígado, com potencial para progredir para insuficiência hepática.

A NASH foi caracterizada inicialmente em 1980 por Ludwig e colaboradores (Ludwig et al, 1981), que descreveram com o nome NASH, uma síndrome observada em mulheres obesas e diabéticas que negavam o uso de

álcool, mas apresentavam alterações no fígado muito semelhantes a da hepatite alcoólica, com aumento do volume do fígado, alterações em exames laboratoriais e biópsias com macrovesículas de gordura (daí o nome esteatose, que vem de gordura) nos hepatócitos, necrose (morte celular) focal, inflamação e lesões chamadas de corpúsculos hialino de Mallory.

EPIDEMIOLOGIA

A prevalência de NAFLD ainda não está bem determinada, pois há grande variação nos dados, de acordo com a sensibilidade do instrumento utilizado para detectar a esteatose. A espectroscopia por ressonância magnética e a biópsia são as técnicas mais sensíveis para detectar a esteatose hepática, ao passo que a sensibilidade da ultrassonografia oscila entre 49% e 94%, onde a menor sensibilidade se reflete nos graus mais brandos de esteatose hepática, bem como nos indivíduos com alto índice de massa corporal (Joy et al, 2003; Mottin et al, 2004).

Admite-se que na população em geral a prevalência de NAFLD (Angulo, 2002; Browning et al, 2004; Utzschneider et al, 2006) e NASH (Browning et al, 2006) esteja entre 10 a 24% e 2,5 a 3,0% respectivamente. Embora possa haver erros nessas estimativas, a NAFLD é a doença hepática mais comum no mundo ocidental, com aumento progressivo e contínuo em sua prevalência, afetando todos os grupos raciais e étnicos, sem predileção por sexo ou idade. Em obesos, a incidência de NAFLD pode variar de 57,5 a 75% (Angulo, 2002), podendo chegar a 100% (Utzschneider et al, 2006) em indivíduos com obesidade mórbida. Estima-se que a presença de NASH acometa entre 25 e 70% (Utzschneider et al, 2006) desses indivíduos. A concomitância da obesidade com outras doenças pode tornar ainda mais grave o estado da doença hepática. Em indivíduos obesos e diabéticos, a incidência de NASH sobe de 25% (Utzschneider et al, 2006) para 50% a 75% (Angulo, 2002), e destes, 19% podem chegar à cirrose (Angulo, 2002; Utzschneider et al, 2006). Portadores de obesidade e dislipidemias variam entre 20 e 92% com algum estado de depósito hepático de lípidos (Angulo, 2002). Tais índices vêm

aumentando entre as populações menos acometidas. No Japão e na China, o acometimento pela NAFLD já chega a 14 e 15% respectivamente da população em geral. Na Itália, um a cada cinco indivíduos possuem algum grau de NAFLD (Angulo, 2007). Um estudo chinês (Fan et al, 2005) demonstrou que 48% dos pacientes com síndrome metabólica, ao serem diagnosticados por ultrassom, apresentavam depósito hepático de lipídios, caracterizando algum estado da NAFLD. Nesse mesmo estudo foi observado que 39% da incidência de NAFLD ocorreu entre indivíduos com índice de massa corporal (IMC) acima de 25. Houve ainda associação de NAFLD com 41% dos diabéticos e 32% dos dislipidêmicos.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Alterações nas enzimas hepáticas devido ao abuso de álcool, hepatites virais e hemocromatose, acometem de 2,8 a 5,5% da população americana, entretanto as alterações nessas mesmas enzimas, decorrentes da doença hepática não gordurosa correspondem de 66 a 90% dos casos. Contudo, 79% dos indivíduos com NASH podem manter níveis normais de enzimas hepáticas, principalmente AST e ALT, não sendo estes bons marcadores para a doença hepática, por subestimar sua prevalência. A doença hepática crônica e a cirrose são a décima maior causa de morbidade e mortalidade na população norte-americana, porém, a maior causa *mortis* quando avaliada apenas indivíduos na faixa dos 45 e 64 anos (Clark et al, 2003).

A obesidade é sem dúvida a principal condição predisponente à NAFLD, entretanto não a única. Existem outros importantes fatores de risco para o desenvolvimento da NAFLD como o uso prolongado da nutrição parenteral total (Fouin-Fortunet et al, 1982), o bypass jejuno-ileal (Liu et al, 2007) e restrições graves de nutrientes (desnutrição protéico-calórica) (Mittendorfer et al, 1998), além do uso de alguns fármacos (Lewis et al, 1989; Oien et al, 1999), e as hepatites virais (Goodman et al, 1995).

Estudos têm demonstrado uma forte relação entre NAFLD e resistência à insulina (RI) (Bugianesi et al, 2005; Utzschneider et al, 2006). De fato, em

alguns indivíduos com forte predisposição genética para o desenvolvimento de RI, o acúmulo de lípidos no fígado pode ocorrer mesmo sem o consumo exagerado de gordura (Bugianesi et al, 2005). De qualquer forma, o consumo elevado de calorias, principalmente oriundas de alimentos ricos em lípidos, constitui-se o mais importante fator ambiental levando ao desenvolvimento de NAFLD. O acúmulo incipiente de gordura no fígado, que nesse momento possui um prognóstico tradicionalmente caracterizado como uma condição benigna pode, entretanto, com o desenvolvimento de RI, elevar o risco de progressão grave da doença, a qual pode evoluir à cirrose ou até mesmo ao carcinoma hepato-celular, como evidenciado em um estudo recente (Andem et al, 2006). Contudo, deve-se ressaltar que a progressão para fibrose ou cirrose parece acontecer apenas em pacientes com evidência de esteatohepatite. Neste caso, a condição ambiental foi predita pela instalação do quadro de RI. Com a transição nutricional mundial, ocidentalização da alimentação, aumento abusivo do consumo de produtos ricos em gorduras, principalmente os de origem animal, e ainda com a industrialização em geral, parece estar cada vez mais difícil evitar o aparecimento de alguma forma da NAFLD.

A maneira como a doença progride ainda não é bem clara, mas novos mecanismos vêm sendo propostos para tentar explicar sua evolução. Ainda não é bem compreendido por que alguns indivíduos desenvolvem uma simples esteatose hepática, e outros desenvolvem esteatohepatite e/ou progridem com a doença. Diferenças na distribuição corporal da massa adiposa ou nos sistemas antioxidantes, possivelmente agregados à predisposição genética, podem estar entre as explicações.

Como dito anteriormente, o acúmulo de gordura no fígado está associado à RI, em diversos estudos clínicos com pacientes portadores de NAFLD. Bugianesi e colaboradores em 2005 (Bugianesi et al, 2005), num trabalho rigoroso de seleção de pacientes, conseguiram fortalecer a relação entre NAFLD e RI, demonstrando que todos os eventos componentes da síndrome metabólica são secundários em relação ao desenvolvimento de NAFLD, com exceção da RI.

A RESISTÊNCIA À INSULINA

A RI pode ser definida como um fenômeno biológico (Kahn, 1978) no qual uma concentração mais elevada do que o normal de insulina é necessária para estimular as células a captarem uma mesma quantidade de glicose e manterem (Campbell et al, 1988) também normais as respostas metabólicas e mitogênicas a esse hormônio. Interferências na transdução do sinal da insulina, como será descrito a seguir, podem caracterizar o estado de RI e ainda a condição compensatória de hiperinsulinemia. Mas para compreender como a insulina mantém íntegras as suas atividades biológicas, é necessário o entendimento da função das várias proteínas que compõem a via de sinalização da insulina.

Os mecanismos moleculares de ação da insulina vêm sendo estudados de forma mais intensa desde o início da década de 1980, quando da caracterização da atividade tirosina quinase intrínseca do seu receptor (IR) (Kasuga et al, 1982). A maioria dos estudos que geraram o conhecimento relativo à ação molecular da insulina foi desenvolvida em tecidos periféricos, tradicionais alvos da ação deste hormônio como músculo esquelético, fígado e adiposo (Saltiel et al, 2001). A insulina age no fígado da mesma forma que em vários tecidos periféricos, bem como o hipotálamo, no sistema nervoso central (Torsoni et al, 2003). Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio por esses tecidos, bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise (Xu et al, 2005). No hipotálamo, este hormônio desempenha função importante no controle da ingestão alimentar, atuando de maneira anorexigênica (Carvalho et al, 2001; Bjorbaek et al, 2001; Torsoni et al, 2003). Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese proteica, assim como na proliferação e na diferenciação celular. A compreensão das etapas moleculares de sinalização da insulina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, diabetes mellitus do tipo

2, hipertensão arterial e intolerância à glicose associada a diversas endocrinopatias.

Os sinais intracelulares ativados pela insulina se iniciam com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase intrínseca, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , denominado receptor de insulina (IR) (Bjorbaek et al, 2004) (Figura 1A). Essa ligação promove, através de alteração conformacional, a ativação de um sítio catalítico localizado na subunidade β do IR, na região que compreende as tirosinas 1145, 1150 e 1151. Uma vez ativo, o sítio catalisa a fosforilação em tirosina dos resíduos 953 e 960 e também os resíduos 1316 e 1322, o que torna o receptor apto a dar continuidade à transdução do sinal. Há então o recrutamento e ativação dos substratos do receptor de insulina, os IRSs (IRS-1 e IRS-2). A fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2 promove a associação e ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase), que conecta o sinal da insulina ao controle do ritmo metabólico intracelular (Xu et al, 2005) (Figura 1B). A ativação da PI3-quinase induz a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) (Carvalho et al, 2003), que então estimula a captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo, culminando com a síntese de glicogênio em tais tecidos e no fígado também, além de estimular a lipogênese no tecido adiposo, o aumento da expressão de neuropeptídeos anorexigênicos como o POMC e CART no núcleo arqueado do hipotálamo, reduzindo assim a fome, e inibindo a glicogenólise no tecido hepático. Portanto, a via PI3-quinase/Akt tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina.

Figura 1.

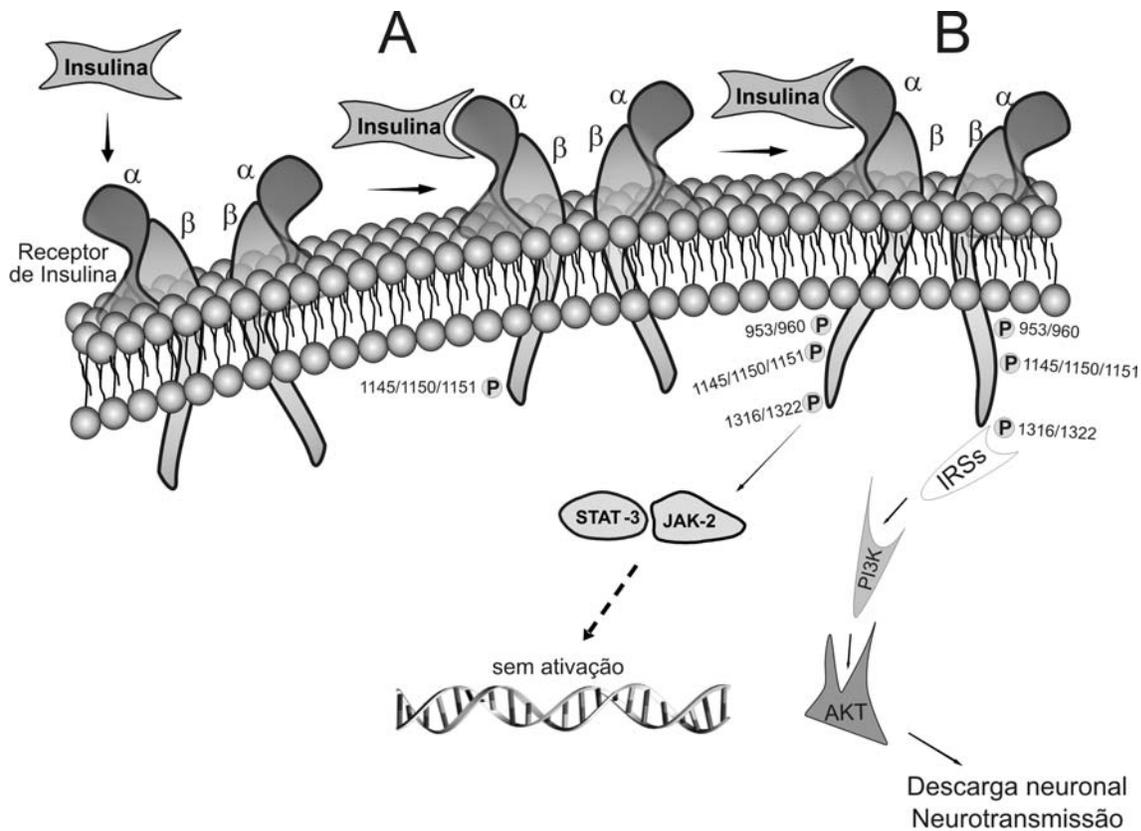


Figura 1. Sinalização da Insulina. A - A insulina se liga ao seu receptor heterotetramérico transmembrânico (IR, subunidades α e β), promovendo a ativação de sua região catalítica. Uma vez ativo, o IR catalisa sua autofosforilação, a qual o torna apto a reunir substratos intracelulares que darão continuidade ao sinal. O IR é fosforilado em tirosina nos sítios catalíticos que compreendem os resíduos 1145, 1150 e 1151. B - Tais sítios uma vez ativos possibilitam a fosforilação em tirosina dos resíduos 953 e 960 e ainda dos resíduos 1316 e 1322, dando continuidade à transdução do sinal. Com isso, proteínas subseqüentes ao IR, da família dos IRSs (especialmente IRS-2), transmitem o sinal da insulina, ativando a enzima fosfatilinositol-3-quinase (PI3K). A PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (AKT), que estimula o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, além de, no hipotálamo, controlar o ritmo de disparos neuronais e a liberação de neurotransmissores nas terminações sinápticas. O IR é capaz inclusive de atrair e ativar a proteína JAK-2. A JAK-2 se une e fosforila proteínas da família STAT (particularmente STAT-3). Uma vez fosforiladas, as proteínas STAT-3 se dimerizam e migram ao núcleo, onde atuam como fatores de transcrição controlando a expressão de genes de neurotransmissores e outras proteínas que respondem ao estímulo da insulina, sempre que exista um co-estímulo por parte da leptina.

Em contrapartida às atividades homeostáticas desempenhadas pela insulina, o estado inflamatório sub-clínico, comumente encontrado em pacientes obesos, pode dar início à interferência nas vias de sinalização mediadas pela insulina ou outros hormônios (Tilg et al, 2006). Na visão tradicional o tecido adiposo era visto como um órgão inerte, com única função de reservatório para estoque energético, mas já há algum tempo tal conceito

não é mais válido. O tecido adiposo expressa e secreta uma variedade de peptídios bioativos, conhecidos como adipocinas (adiponectina, resistina, IL-6, TNF- α etc.), os quais atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina. Através de uma rede interativa de ação, esse tecido coordena através dessas substâncias uma variedade de processos biológicos incluindo metabolismo energético, funções neuroendócrinas e imunes (Calle et al, 2004; La Cava et al, 2004; Kusminski et al, 2005; Wellen et al, 2005; Mannino et al, 2006; Weisberg et al, 2006; Pitombo et al, 2007). A hipertrofia desse tecido, como ocorre na obesidade, particularmente no compartimento visceral é associado à RI, hiperglicemia, dislipidemias, hipertensão e estados pró-trombóticos e inflamatórios. Proteínas serina-quinases ativadas por mediadores pró-inflamatórios disparados por agentes endógenos como TNF- α , IL-1 β e IL-6 ou por constituintes da própria dieta como a fração saturada dos ácidos graxos dos lipídios interferem negativamente nessas vias de sinalização, possivelmente ocasionando e instalando o quadro de RI (Wellen et al, 2005).

INFLAMAÇÃO

Estudos recentes (Alexandraki et al, 2006; Martínez, 2006; Goossens, 2008;) têm revelado a conexão entre vias pró-inflamatórias e vias controladoras do metabolismo, especificamente, vias ativadas em resposta à insulina. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β parecem desempenhar um papel central nestas conexões. Agindo através de TNFR1 (receptor 1 de TNF- α), o TNF- α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de resposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular (Gupta, 2002; MacEwan, 2002). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α é a serina quinase JNK (Dempsey et al, 2003). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (Dempsey et al, 2003). Entretanto, a atividade serina quinase da JNK pode também agir sobre

outros substratos, inclusive os substratos tradicionais do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 (Lee et al, 2003). Uma vez fosforilados em serina pela JNK a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida, o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via.

Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I κ B/NF- κ B (Shoelson et al, 2003). Esta via pode ser ativada pelo TNF- α , mas também por outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Shoelson et al, 2003). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B, mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata. O NF- κ B é formado pelo dímeros das proteínas P50 e P65. Esse complexo atua como fator de transcrição, que, uma vez liberado no citoplasma, migra até o núcleo e se conecta à regiões específicas do DNA, ativando genes responsáveis pela transcrição de diversas proteínas, entre elas, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e também anti-inflamatórias (IL-10), no intuito de regular o processo inflamatório. A intensidade da ativação dessas proteínas é que irá reger a magnitude inflamatória (Shoelson et al, 2003).

Dado o processo inflamatório e a capacidade reduzida da insulina de promover a captação de glicose pelos músculos e outros tecidos e em suprimir a lipólise, desenvolve-se então a hiperinsulinemia compensatória, além do aumento do fluxo hepático de ácidos graxos livres. Há um paradoxo relevante no papel da insulina no fígado, pois enquanto a resistência à ação do hormônio prejudica o metabolismo de glicose, o metabolismo dos lipídios é mantido (McCullough, 2006). Alguns estudos têm documentado que uma redução de 45 a 50% na glicose disponível, uma medida da sensibilidade corporal à insulina (Burgianesi et al, 2005; Marchesini et al, 2001), e uma reduzida habilidade da insulina em suprimir a produção endógena de glicose, é um indicativo de resistência hepática à insulina (Marchesini et al, 2001; Seppala-Lindroos et al, 2002; Burgianesi et al, 2005).

Em 1999, Marchesini e colaboradores (Marchesini et al, 1999) já haviam descrito a forte associação entre NAFLD e RI, e foram além, ao afirmarem que a RI é o fator mais comum no desenvolvimento da NAFLD.

A RI, a qual se torna permanente devido à presença e ação das citocinas, pode favorecer o acúmulo de gordura nos hepatócitos através de dois mecanismos: a lipólise, a qual aumenta os ácidos graxos circulantes e a hiperinsulinemia (Angulo, 2002). Com o aumento da massa dos adipócitos, há conseqüente hidrólise dos triacilgliceróis devido ao aumento da atividade da enzima lipase sensível ao hormônio (LHS), o que contribui para o aumento dos ácidos graxos livres circulantes. Caso desregulada a captação dos ácidos graxos livres pelo fígado, essa captação torna-se diretamente proporcional à concentração de ácidos graxos livres presentes no plasma (Weltman et al, 1998; Leclercq et al, 2000). Ácidos graxos nos hepatócitos são normalmente esterificados a triacilgliceróis, alguns dos quais são incorporados às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e exportados por elas (Angulo, 2002), ou oxidados para a geração de ATP (Wahren et al, 1984). Mas o aumento da captação de lipídios pelo fígado juntamente com a redução na exportação ou oxidação dessas gorduras, ou seja, o aumento na concentração local de lipídios em indivíduos com NAFLD pode ser resultado do desequilíbrio entre os sistemas enzimáticos responsáveis por tais ações. Esse aumento pode levar à sobrecarga do sistema de β -oxidação mitocondrial, com um conseqüente e novo aumento do acúmulo de lipídios no hepatócito (Angulo, 2002).

MEDIADORES MOLECULARES DA LIPOGÊNESE E SEU PAPEL NA ESTEATOSE HEPÁTICA

Uma das funções centrais do fígado é manter em equilíbrio o nível de glicose plasmática, de acordo com o estado nutricional do indivíduo. Na situação de excesso de energia, a glicose é convertida a ácidos graxos via conversão de glicose em piruvato, o qual entra no ciclo de Krebs, no interior da mitocôndria. O citrato formado no ciclo é lançado ao citoplasma, onde é

convertido em acetil-CoA pela ATP-citrato liase. Nesse momento, a acetil-CoA carboxilase-1 (ACC1) converte a acetil-CoA em malonil-CoA, o qual é utilizado pela enzima ácido graxo sintase (FAS) para a formação do ácido palmítico (C16:0). O ácido palmítico é então dessaturado pela estearoil-CoA dessaturase (SCD), formando o ácido palmitoléico (C16:1) e posteriormente alongado pela enzima alongadora de ácidos graxos de cadeia longa, para formar o ácido esteárico (C18:0), o qual pode também ser dessaturado para formar o ácido oléico (C18:1) (Horton et al, 2002; Browning et al, 2004). Esses ácidos graxos são utilizados para sintetizar triacilgliceróis, que podem ser estocados como fonte primária de energia ou transportados. Humanos (Araya et al, 2004) e camundogos (Shimomura et al, 1998) com esteatose hepática acumulam ácido oléico, o produto final da síntese *de novo* de ácidos graxos. Isto sugere que a proporção de síntese está aumentada nos indivíduos com resistência hepática à insulina. A síntese *de novo* dos ácidos graxos é regulada de forma independente pela insulina e pela glicose (Koo et al, 2001; Stoeckman et al, 2002). A habilidade da insulina em ativar a lipogênese é transcricionalmente regulada pelo fator de transcrição ligado à membrana, chamado *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) (Foretz et al, 1999; Shimomura et al, 1999). A SREBP-1c pertence a uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição (Brown et al, 1997), que quando ligadas a regiões específicas no DNA, ativam genes que são requeridos para a lipogênese (Horton et al, 2002; Horton et al, 2003). Camundongos geneticamente modificados para superexpressarem SREBP-1c desenvolvem esteatose hepática clássica, devido ao aumento da lipogênese (Shimano et al, 1997). Os trabalhos de Shimomura et al (1999) e outros (Martin, 1974; Menon et al, 1994), demonstraram que o aumento na razão de síntese hepática de ácidos graxos contribui para a deposição hepática de gordura em modelos experimentais de roedores resistentes à insulina, diabéticos e obesos.

Hiperinsulinemia e produção hepática anômala de glicose são condições comuns da resistência à insulina (Lam et al, 2003). Em geral a SREBP-1c não é ativada em estados hiperinsulinêmicos, entretanto e de forma surpreendente,

em estados de hiperinsulinemia acentuada, a insulina estimula a transcrição da SREBP-1c hepática, resultando no aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos (Shimomura et al, 1999). A contribuição da SREBP-1c para o acúmulo de triacilgliceróis no fígado tem sido explorada em alguns modelos experimentais, como por exemplo, no camundongo ob/ob. Esses camundongos são extremamente obesos e com importante resistência à insulina devido à mutação no gene da leptina e, como consequência, esses animais desenvolvem esteatose hepática (Halaas et al, 1995). A inativação do gene da SREBP-1c no fígado de camundongos ob/ob resulta na redução em aproximadamente 50% da concentração hepática de triacilgliceróis (Yahagi et al, 2002). Assim, a SREBP-1c desempenha um importante papel nesse modelo animal de resistência à insulina. Ainda, a SREBP-1c ativa a transcrição da enzima acetil coenzima A carboxilase-2 (ACC-2) (Horton et al, 2003), uma isoforma da ACC presente na membrana mitocondrial (Abu-Elheiga et al, 2003), responsável pela produção de malonil-CoA. O aumento da malonil-CoA resulta na diminuição da oxidação de ácidos graxos por inibir a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), a qual transloca ácidos graxos do citoplasma para o interior mitocondrial (McGarry et al, 1977). O papel crítico da ACC-2 no metabolismo hepático dos ácidos graxos foi revelado em animais *knockout* para o gene da ACC-2, que apresentaram importante resistência à obesidade, devido ao aumento na expressão e atividade da CPT-1, o que resultou no aumento da oxidação dos ácidos graxos (Abu-Elheiga et al, 2001; Abu-Elheiga et al, 2003). Em animais que receberam um adenovírus com o objetivo de aumentar a expressão da malonil-CoA descarboxilase, uma enzima que degrada a malonil-CoA, também houve aumento da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, reduzindo os triacilgliceróis estocados (An et al, 2004).

Carboidratos também são capazes de estimular a lipogênese, através da ativação de uma proteína sensível à concentração de carboidratos, a *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) (Yamashita et al, 2001). A glicose estimula a proteína ChREBP, que atua também como fator de transcrição, migrando ao núcleo e se conectando numa região específica do

DNA, o *E-Box motif*, que é um promotor responsável pela transcrição da enzima piruvato quinase hepática [*liver-type pyruvate kinase (L-PK)*] (Kawaguchi et al, 2002). Esta enzima possui papel-chave na regulação dos processos glicolíticos. A L-PK cataliza a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, o qual entra no ciclo de Krebs para gerar citrato, principal fonte de acetil-CoA, utilizado na biossíntese de lipídios. Como predito em ensaios *in vitro*, camundongos knockout para o gene da proteína ChREBP apresentaram uma redução de 90% na expressão da enzima L-PK. Uma revelação surpreendente foi a redução de 50% aproximadamente no nível de transcrição em RNAm de todas as enzimas envolvidas na síntese de lipídios (Iizuka et al, 2004). Isto sugere que a ChREBP pode, de forma independente, estimular a transcrição de todos os genes lipogênicos. Assim, a L-PK estimula ambos os processos de glicólise e lipogênese, facilitando então a conversão de glicose em ácidos graxos, sob condições de excesso de energia. Contudo, a ativação de genes lipogênicos mediados pela elevada atividade da ChREBP parece ser importante somente após o desenvolvimento de hiperglicemia (Browning et al, 2004).

Um terceiro fator de transcrição pode ainda participar do processo de desenvolvimento da NAFLD em roedores, chamado receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo gama (PPAR- γ), requerido na diferenciação normal de adipócitos (Tontonoz et al, 1994). Normalmente o PPAR- γ é expresso em baixos níveis no fígado, entretanto, em modelos animais com resistência à insulina e com presença elevada de lipídios no fígado, a expressão de PPAR- γ se eleva consideravelmente (Edvardson et al, 1999; Chao L et al, 2000). Alguns estudos demonstram que a SREBP-1c pode ativar transcripcionalmente o gene do PPAR- γ , e isso ocorre por intermédio de um co-ativador (Kim et al, 1998; Fajas et al, 1999). A importância do PPAR- γ no desenvolvimento da esteatose hepática foi demonstrada também por técnicas de recombinação gênica que geraram camundongos ob/ob com *knockout* tecido específico do PPAR- γ no fígado, bem como em animais lipodistróficos chamados AZIP-F-1, também com ausência de PPAR- γ no fígado (Chao et al., 2000). Ambos os

animais são resistentes à insulina, e em tais modelos houve drástica redução do depósito hepático de lipídios, independentemente da presença de hiperinsulinemia ou hiperglicemia (Gavrilova et al, 2003; Matsusue et al, 2003). O preciso mecanismo molecular pelo qual o PPAR- γ promove a deposição de triacilgliceróis no fígado ainda não está completamente descrita, entretanto, em humanos com NAFLD a expressão do PPAR- γ também se encontra elevada.

A obesidade, a RI, e o desarranjo metabólico na captação e manejo dos lípidos no fígado, são distúrbios mediados pelos desequilíbrios moleculares demonstrados anteriormente, e favorecem o acúmulo de lípidos no parênquima hepático, além de contribuírem para a progressão da doença. Como apresentado acima, diversos autores defendem que a progressão da doença de uma forma benigna de esteatose hepática para formas consideravelmente mais graves como a esteato-hepatite e, posteriormente, a fibrose e a cirrose, tem como gatilho a presença de um estado de estresse oxidativo intenso, mediado pela presença de radicais livres produzidos como decorrência de distúrbios metabólicos e inflamatórios que acompanham a evolução da doença.

ESTEATO-HEPATITE: DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

O aumento da peroxidação lipídica tem sido demonstrado em diversos modelos animais de esteatose hepática (Leclercq et al, 2000; George et al, 2003; Lieber, 2004) e em pacientes com NAFLD (Koruk et al, 2004; Videla et al, 2004). Pacientes com NASH possuem níveis elevados de vários parâmetros que caracterizam o estresse oxidativo em comparação aos pacientes com apenas esteatose (Videla et al, 2004).

Os ácidos graxos são a maior fonte de estresse oxidativo dentro do fígado desses pacientes (Marchesini et al, 2001; Sanyal et al, 2001), e a elevada concentração desses ácidos pode atuar como ligante para o receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo alfa (PPAR- α), uma proteína que regula positivamente a oxidação de ácidos graxos no interior da mitocôndria, microsossomos e peroxissomos (Clarke, 2001). Os produtos da oxidação desses ácidos graxos, como o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e os

peróxidos de lipídios, são capazes de dar início aos processos de estresse oxidativo, com subsequente incremento à peroxidação lipídica (McCullough, 2006).

Os ácidos graxos são os principais substratos e indutores das lipooxigenases microsossomais P450-2E1 e P450-4A (Wetman et al, 1998; Leclercq et al, 2000). O nível do citocromo P450-2E1 está invariavelmente aumentado no fígado de pacientes com NASH e pode resultar na produção de radicais livres capazes de induzir a peroxidação lipídica das membranas dos hepatócitos (Wetman et al, 1998). Camundongos *knockout* para P450-2E1 apresentam extensa peroxidação da membrana, mostrando assim que a enzima P450-4A também tem um importante papel nesse controle (Marchesini et al, 2001).

A evidência da peroxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos vem predominantemente de modelos animais de esteatose hepática (Rao et al, 2001; Pessayre et al, 2002). Entretanto, pacientes com NASH apresentam um aumento na β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria com elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yang et al, 2000; Angulo, 2002). Existem evidências indiretas de que a ω -oxidação de ácidos graxos pelo sistema microsossomal está aumentada em ambos, animais e pacientes, com NASH (Leclercq et al, 2000; George et al, 2003). Além disso, pacientes com NASH apresentam regulação positiva das lipooxigenases microsossomais (Angulo, 2002; McCullough, 2006).

Embora enzimas e membranas de outras organelas sejam danificadas pelo estresse oxidativo (Muoio et al, 2004; Ozcan et al, 2004), a mitocôndria é um dos sítios mais comprometidos (Sanyal et al, 2001). Ocorrem anormalidades estruturais na mitocôndria como o seu alargamento, também chamado de megamitocôndria, inclusão de corpos para-cristalinos, com composição ainda desconhecida, e desenvolvimento de polimorfismo mitocondrial. Essas anormalidades são desenvolvidas principalmente em resposta às agressões oxidativas. Há também alterações funcionais dentro da mitocôndria, que ocorrem juntamente com essas alterações estruturais

(Caldwell et al, 1999; Sanyal et al, 2001; Caldwell et al, 2004). A atividade das enzimas envolvidas na cadeia de respiração celular está diminuída em aproximadamente 50% (Perez-Carreras et al, 2003). Isso está associado ao aumento na expressão da proteína desacopladora-2 (UCP-2) mitocondrial (Chavin et al, 1999), e na ineficiente produção de ATP (Caraceni et al, 2004), com aumento na razão ADP/ATP (Dianzani et al, 1956). A disfunção mitocondrial corrobora na promoção da peroxidação lipídica, portanto induzindo, além disso, a geração de ROS (Charlton, 2004).

A via metabólica dos ácidos graxos possui estreita relação com a β -oxidação mitocondrial e com a β -oxidação peroxissomal. A deficiência nas enzimas da via de oxidação peroxissomal tem sido reconhecida como uma importante causa de esteatose microvesicular e esteato-hepatite. Deficiência na acil-CoA oxidase reduz a oxidação das VLDLs e dos ácidos dicarboxílicos, conduzindo à extensa esteatose microvesicular e esteato-hepatite (Leclercq et al, 2000). A redução na atividade dessa enzima causa ainda hiperativação do PPAR- α , o que por sua vez culmina numa regulação supra-ótima dos genes que estão sob o seu controle. O PPAR- α está implicado também na transcrição hepática da UCP-2 no fígado de indivíduos com NAFLD, o que é um forte indício da presença e atividade de ROS (Fan et al, 1998). O sistema sobrecarregado pela captação, oxidação e exportação hepática de ácidos graxos promove a ativação das ROS, as quais podem em grande parte ser as responsáveis pela progressão da esteatose hepática para a esteato-hepatite, podendo chegar à cirrose (Angulo, 2002). As mitocôndrias são as principais fontes celulares de ROS, às quais são gatilhos para esteato-hepatite e fibrose, devido a três principais mecanismos: peroxidação lipídica, ativação de citocinas e indução do ligante da FAS (FAS-L), o que dá início à interferência no programa de sobrevivência celular. As ROS dão início à peroxidação lipídica e induzem à ativação de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE) (Esterbauer et al, 1991). Essas duas substâncias aceleram a progressão do processo de morte celular, pois atuam como quimiotáticos para neutrófilos, que causam *cross-link* de proteínas e conduzem à formação do

corpúsculo hialino de Mallory (Zatloukal et al, 1991), além da ativação das células esteladas (células de Ito) (Leonarduzzi et al, 1997). Quando em atividade, as células esteladas são estimuladas a sintetizar colágeno, depositando-o no parênquima hepático, e a continuidade da agressão levará ao estado de fibrose no órgão. A atividade quimiotática exercida pelo HNE em recrutar neutrófilos é um marco do início ao processo inflamatório local. A presença de mediadores inflamatórios locais como TNF- α , TGF- β e IL-8 induzidos via ROS, são capazes de ativar os macrófagos residentes do fígado (de 80 a 90% dos macrófagos do corpo), também conhecidos como células de Kupffer (Leonarduzzi et al, 1997). Macrófagos em atividade aumentam a liberação de ROS, dando início ao círculo vicioso que descontrola o metabolismo local, prejudicando ainda mais o estado depurativo do órgão, além disso, possuem um papel crítico na discriminação do que é próprio e não-próprio no órgão. As células de Kupffer são os principais produtoras locais de citocinas. O TNF- α e TGF- β ativam caspases e intensificam os sinais de morte celular (Higuchi et al, 1997). O TGF- β estimula a síntese de colágeno pelas células esteladas (Leonarduzzi et al, 1997), além de poder ativar as transglutaminases teciduais, as quais levam ao *cross-link* de proteínas citoesqueléticas, promovendo a formação do corpúsculo hialino de Mallory (Yoshimura et al, 1987). A IL-8 é também um potente quimioatrativo para neutrófilos em humanos. O TNF- α induzido por ROS prejudica o fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (Lancaster et al, 1989). Espécies reativas de oxigênio mitocondriais podem depletar as enzimas antioxidantes hepáticas, seguidas por acúmulo ainda maior de ROS (Sastre et al, 1989; Watson et al, 1999). A expressão do FAS-L no hepatócito, induzido pela ROS, ativa seus receptores na membrana celular, incrementando os sinais de morte celular. O FAS-L de um hepatócito pode interagir com o receptor FAS de outro hepatócito, causando morte fracional (Hug et al, 1997). O surgimento de corpos apoptóticos no fígado é resultado do descontrole entre os fatores pró- (Bax) e anti- (Bcl-2) apoptóticos. Esses corpos apoptóticos também podem

estimular o processo fibrogênico (Rashid et al, 1999; Poli, 2000; Caldwell et al, 2004).

Contudo, há a necessidade de uma contra-regulação do processo inflamatório para que essa situação não se perpetue. Logo, proteínas com atividades antiinflamatórias são expressas em meio ao estado pró-inflamatório exacerbado com o objetivo de balancear a condição da doença, e impedir a resposta por demais agressiva a que o tecido ou órgão é submetido. Os processos inflamatórios podem ser contra-regulados por citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, entre outras, mas nenhuma com papel tão importante como a IL-10.

Dados obtidos tanto em trabalhos experimentais com animais, bem como em estudos clínicos com humanos sugerem um papel protetor para a IL-10 no contexto da esteatohepatite não alcoólica. Por exemplo, a concanavalina atua como agente estressor hepático em condições experimentais (Louis et al, 2000). Animais que receberam um adenovírus com o gene da IL-10 promovendo o aumento da expressão dessa citocina, apresentaram uma redução dramática na secreção das interleucinas inflamatórias e também na infiltração de corpos apoptóticos no fígado, além de menor infiltração de neutrófilos e conseqüente redução no desenvolvimento de fibrose e necrose (Santucci et al, 1996). No modelo de dano hepático através da administração de lipopolissacáride (LPS) ou da enterotoxina B do estafilococos, em animais D-galactosamino sensíveis, o tratamento com IL-10 reduziu as transaminases séricas, além de ter promovido a inibição do aumento sérico de TNF- α e IFN- γ (Nagaki et al, 1999). Em outro experimento, o tratamento com IL-10 reduziu de forma significativa o RNAm do TNF- α e do IFN- γ no fígado e baço de camundongos sensibilizados por toxinas. Esses achados sugerem que a IL-10 é capaz de regular o dano hepático *in vivo*, mediados por células T macrófágicas (Nagaki et al, 1999). Outros dados sugerem que o mecanismo pelo qual a IL-10 é capaz de proteger o fígado de agentes pró-inflamatórios se deve à supressão do NF- κ B, e sua subseqüente ativação na expressão de mediadores pró-inflamatórios (Yoshidome et al, 1999). Nelson et al, em 2000,

demonstraram que o tratamento com IL-10 em pacientes com hepatite C crônica normalizou os níveis de transaminases séricas, além de reduzir a fibrose. Nesse mesmo estudo, é ressaltado o fato de que esses pacientes já não mais respondiam ao tratamento antiviral com IFN- γ , tendo então sido o processo de melhora todo mediado pela IL-10.

JUSTIFICATIVA

O elevado consumo energético observado nas civilizações ocidentais tem contribuído não somente para o aumento epidêmico da prevalência de obesidade, mas também para a instalação e agravamento da NAFLD em um número cada vez maior de indivíduos. A resistência à insulina, quando associada ao estado de obesidade, favorece ainda mais a infiltração de lipídios no parênquima hepático, sendo este talvez uma das conseqüências mais importantes da instalação do estado inflamatório do fígado. Com o desajuste dos processos de oxidação e exportação de lipídios do fígado, há a geração de espécies reativas de oxigênio, o que por sua vez desencadeia o processo de lipoperoxidação das gorduras estocadas no fígado. Esse fenômeno é responsável pela ativação do sistema microsomal de detoxificação hepática na tentativa de regenerar as funções do órgão, como conseqüência, vias pró-inflamatórias, mediadas principalmente por citocinas, são incrementadas. O desequilíbrio no controle das respostas de recuperação do órgão frente à agressão pode conduzir à progressão da doença hepática, que é agravada pela deposição de fibras de colágeno no parênquima hepático. A continuidade dos sinais de estresse celular podem culminar com a evolução para o último estágio da doença, a cirrose. Proteínas contra-reguladoras do estado inflamatório hepático, como a IL-10, surgem com a função de diminuir a resposta inflamatória exacerbada, impedindo ou atenuando a progressão do dano orgânico. A IL-10 é um potencial alvo terapêutico na disfunção hepática induzida por dieta. No presente estudo avaliamos o papel dessa citocina em um modelo animal de esteato-hepatite não alcoólica, avaliando seu papel sobre a ação da insulina no fígado.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[2 – OBJETIVOS]

Geral

- ✦ Avaliar o papel da IL-10 endógena sobre a disfunção hepática e sobre a ação da insulina no fígado de animais experimentais com esteato-hepatite induzida por dieta.

Específicos

- ✦ Avaliar os níveis de IL-10 em fígado de animais submetidos à dieta hiperlipídica;
- ✦ Avaliar o efeito da inibição da IL-10 sobre o metabolismo de glicose;
- ✦ Avaliar o efeito da inibição da IL-10 sobre a transdução do sinal da insulina em fígado;
- ✦ Avaliar o efeito da inibição da IL-10 sobre a expressão hepática de proteínas envolvidas com gliconeogênese e lipogênese.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[3 – MATERIAIS E MÉTODOS]

3.1 – Caracterização do modelo:

3.1.1 – Animais:

Animais experimentais: Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss albinus*, machos, de quatro semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os camundongos receberam, durante oito semanas, uma dieta purificada AIN-93G, (Reeves et al., 1993), modificada para hiperlipídica, contendo 35% de lipídios, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja Sadia®) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia®), ou uma dieta comercial padrão, de acordo com o AIN-93G, da marca NUVILAB® (Tabela 1). As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em estantes apropriadas, com temperatura controlada em torno de 22 °C ± 1 °C, além da regulação de fotoperíodo em 12 horas claro/escuro.

Tabela 1. Composição da Dieta Experimental

Ingredientes	AIN 93 G	AIN 93 G
	g/100 g	g/100 g
* Amido (Q.S.P.)	39,8	11,8
Caseína	20,0	20,0
Amido de Milho Dextrinizado	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0
Óleo de Soja	7,0	4,0
Banha	0,0	31
Celulose microfina (Fibra)	5,0	5,0
Mix Minerais	3,5	3,5
Mix Vitaminas	1,0	1,0
L-Cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Somatório Total	100	100,0

Reeves, 1993. American Institution of Nutrition-93 G

* Quantidade Suficiente Para 100 g

Os animais que receberam dieta hiperlipídica, foram divididos em quatro sub-grupos tratados da seguinte forma:

1 – Oligonucleotídeo sense IL-10; 2 – Oligonucleotídeo antisense para IL-10; 3 – Soro pré-imune; 4 – Anticorpo anti-IL-10; 5 – Dieta comercial apenas (grupo controle).

Os animais que receberam a dieta comercial serviram como controles não-obesos, recebendo apenas soro fisiológico i.p. Os camundongos receberam os diversos tratamentos durante cinco dias. Ao terceiro dia, foi realizado o teste de tolerância à glicose. Ao sexto dia, os animais foram devidamente anestesiados e submetidos à eutanásia, para a posterior extração dos tecidos.

3.1.2 – Construção dos oligonucleotídeos (sense e antisense) IL-10

O programa utilizado para desenhar a seqüência do oligonucleotídeo foi o *Gene Runner*, V. 3.05. A partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, foi obtida a seqüência dos pares de bases, tendo sido escolhida para sense da IL-10, **5'-CTGCTCTTACTGACTGGC-3'**, com modificação fosforotioato em todas as bases exceto a última (3'); e para antisense da IL-10, **5'-GCCAGTCAGTAAGAGCAG-3'**, com modificação fosforotioato em todas as bases exceto a última (3'). Os oligonucleotídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os *primers* foram produzidos pela empresa IDT – Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

A partir da forma original liofilizada, os oligonucleotídeos foram ressuspensos em tampão próprio e aplicados nos animais, nas doses de 4

nmol/ μ L. Essa dose foi completada para 100 μ L de salina como veículo e injetada por via intraperitoneal duas vezes ao dia, durante cinco dias. Após os diversos testes com os oligonucleotídeos, os animais foram sacrificados e submetidos à extração tecidual e mensuração por imunoblot. As doses utilizadas foram padronizadas a partir de experimentos de dose-resposta e tempo.

3.1.3 – Preparo da dose de anticorpo anti IL-10

O soro pré-imune e o anticorpo anti-IL-10 foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A concentração inicial do anticorpo foi de 200 μ g/mL. A dose infundida nos animais foi de 1:16, de tal forma que, 250 μ L de anticorpo foi adicionado a 3.750 μ L de soro fisiológico (veículo). Foi infundido 100 μ L, 2 vezes por dia/animal, durante cinco dias. No grupo que recebeu soro pré-imune, infundiu-se o mesmo volume calculado para o anticorpo. No sexto dia, os animais foram devidamente anestesiados e submetidos à eutanásia, para a posterior extração dos tecidos.

3.2 – Protocolos Experimentais

3.2.1 – ELISA para avaliação da produção hepática de interleucina-6

No momento da eutanásia, coletou-se 300 μ L de sangue da veia porta e 300 μ L de sangue da veia cava de cada animal. Utilizando-se seringas de 1,0 mL da marca BD[®], individuais para cada animal e contendo heparina apenas na agulha, o sangue foi dispensado em frascos do tipo Eppendorf[®], posteriormente

centrifugados em centrífuga própria, a 3.000 rpm, durante 15 minutos. O soro foi separado e dosado utilizando-se o kit comercial de ELISA segundo a indicação do fabricante (Linco Research Inc, St Charles, MO, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.2.2– Determinação da concentração de glicogênio hepático

No momento da eutanásia, um outro fragmento de aproximadamente 500 mg de fígado foi coletado para posterior análise da concentração de glicogênio, de acordo com a técnica descrita por Dubois et al., (1956).

3.2.3 – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose

Os animais permaneceram em jejum noturno de 12 horas. Após a mensuração da glicemia caudal no tempo 0, foi injetado na cavidade peritoneal uma solução de glicose a 25% (1,1 mmol/ kg de peso). Amostras de glicose foram novamente coletadas da cauda nos tempos 30 minutos, 60, 90 e 120.

3.3 – Extração dos tecidos

A obtenção dos fígados para a avaliação da expressão das proteínas foi realizada no último dia do experimento, para tal os animais foram anestesiados com a proporção de 1:1 de Ketamin® e Diazepan®, infundindo-se 300 µL intraperitonealmente. Após o teste negativo de sensibilidade (dor) nos animais, fez-se uma incisão em forma de aba no ventre. Antes da retirada dos fragmentos teciduais para análise, foi injetada solução fisiológica (grupo

negativo) ou insulina regular (grupo positivo – 0,2 ml, 10^{-6} M) pela veia porta do animal, para a observação das proteínas fosforiladas que participam da via da insulina, como o receptor de insulina (IR), o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), a p-Akt e a *forkhead box sub-group O* (p-FOXO). Após tempos pré-estabelecidos da injeção da insulina, foram coletados fragmentos hepáticos, de músculo esquelético, gastrocnêmio e adiposo peri-epididimal, de 4,0 g cada, aproximadamente. Os tecidos foram homogeneizados em tubos de ensaio de 15 mL, contendo 2 mL do tampão de extração em cada um durante 20 segundos com o processador *polytron*® PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em velocidade máxima. Durante e após o procedimento, o material homogeneizado foi mantido em banho de gelo para evitar a desfosforilação e desnaturação das proteínas. Ao final da extração, foi adicionado Triton X-100 a 1% (Merk) em todas as amostras e mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação. Utilizou-se a velocidade de 11.000 rpm por 40 minutos a 4 °C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (Bakos, 1964); outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4 °C até o momento de submeter à fervura a 100 °C durante 5 minutos.

3.3.1 – *Imunoblot*

Alíquotas contendo 250 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareciam sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quanto ao peso molecular das bandas observadas. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean) (Hercules, CA, USA), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por duas horas, sob refrigeração contínua em gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por três sessões de 10 minutos, e incubadas com os anticorpos específicos:

Citocinas: *TNF- α (sc-1350, goat policlonal), *IL-1 β (sc-7884, rabbit policlonal), *IL-6 (sc-265, goat policlonal) e *IL-10 (sc-1783, goat policlonal); Via de sinalização da insulina: *receptor de insulina (IR) (sc-711, rabbit policlonal), *substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) (sc-560, rabbit policlonal), *substrato 2 do receptor de insulina (IRS2) (sc-8299, rabbit policlonal), *Akt (sc-1618, goat policlonal), fosfotirosina (pY) (sc-508, mouse monoclonal), *fosfo [Ser473] Akt (sc-7985-R, rabbit policlonal), *FOXO1 (sc-11350, rabbit policlonal) e *fosfo [Ser256] FOXO1 (sc-22158-R, rabbit policlonal); proteína ativada de macrófago: *F4/80 (sc-25830, rabbit policlonal); Metabolismo lipídico: *carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) (sc-20514, goat policlonal) e *ácido graxo sintase (FAS) (sc-16146, goat policlonal); Metabolismo glicídico: *fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (sc-28477, goat policlonal), *glicose-6-fosfatase (G6P) (sc-25840, rabbit policlonal), ∞ fosfo [Ser79] acetil CoA carboxilase (ACC) (#07-184, rabbit policlonal) e \S fosfo [Ser21/9] glicogênio sintase quinase 3 α/β (p-GSK3) (#9327, rabbit monoclonal). Via de sobrevivência celular: *FAS-associada ao domínio de morte (FADD) (sc-5559, rabbit policlonal), *Apaf-1 (sc-8339, rabbit policlonal), *caspase-8 (sc-7890, rabbit policlonal), *caspase-9 (sc-8355, rabbit policlonal), *Bcl2 (sc-783, rabbit policlonal) e *Bax (sc-6236, rabbit policlonal).

Fontes dos anticorpos: * Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); ∞ Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA); \S Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Após a incubação das membranas de nitrocellulose com seus respectivos anticorpos, foram mantidas sob agitação constante durante 10 horas e a 4 °C. Foram então lavadas novamente com solução basal por três sessões de 10 minutos e em seguida incubadas por 2 horas em solução com o anticorpo secundário, marcado com peroxidase. Lavou-se novamente por três vezes de 5 minutos. Às membranas, adicionou-se 1,0 mL de cada reagente do kit de quimioluminescência, adquiridos da Pierce. Então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete por 10 minutos e revelados de forma convencional após. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das auto-radiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image V*. Alpha 4.0.3.2. (Scion Corporation).

3.3.2 – Imunoprecipitação

Para mensuração da atividade (fosforilação) de proteínas pertencentes às vias já descritas, volumes das amostras com a mesma concentração protéica foram utilizados para imunoprecipitação com anticorpos específicos, sendo que a determinação das proteínas seguiu as etapas descritas anteriormente no item “extração dos tecidos”. As amostras foram colocadas sob incubação com o anticorpo específico durante 12 horas a 4 °C, sob agitação contínua. Em seguida acrescentou-se proteína A-Sepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do complexo antígeno/anticorpo, sendo

mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem. As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas no item imunoblot.

3.4 – PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para o gene G-6-P (glicose-6-fosfatase) utilizou-se o assay Mm00839363_m1 e para o gene IL-10 utilizou-se o assay Mm01288386_m1 (Applied Biosystems). O gene *GAPD* (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serviu para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A validação do ensaio consistiu na amplificação, tanto com os *primers* do gene de interesse quanto do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de sete concentrações diferentes (diluições seriadas de 10 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, construiu-se uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessou o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido

arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação dos genes G-6-Pase e IL-10, foram realizadas triplicatas da amostra de cDNA de fígado de camundongo Swiss referentes aos tratamentos deste trabalho, em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x). Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir qual a amplitude de concentrações para as quais o sistema foi eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possuiu uma equação de reta, possibilitando verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações). Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram em duplicata 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).

3.5 – Histologia

3.5.1 – Hematoxilina e Eosina

Um fragmento do fígado de aproximadamente 1,0 cm³ foi retirado para histologia. Imediatamente colocado em um frasco contendo formol a 10% ficou 24 horas em banho para adequada fixação. Posteriormente, o órgão foi processado com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol, e parafina. Então foi incluído em blocos de parafina, onde foi seccionado em cortes de 4,0 µm e fixados em lâminas de microscopia. A coloração utilizada para visualização estrutural foi realizada com os corantes de Eosina e Hematoxilina.

3.5.2 – Imunohistoquímica

Da mesma forma descrita na técnica anterior, os cortes foram fixados em lâminas preparadas com silano e posteriormente submetidos a marcação simples, usando o anticorpo F4/80, de acordo com protocolo previamente descrito por Torsoni et al, (2003) e Araújo et al, (2004). Análise e documentação dos resultados foram realizadas utilizando o microscópio de imunofluorescência Leica FW 4500 B. A avaliação semi-quantitativa de F4/80 foi alcançada por contagem do número de células positivamente coradas, as

quais foram contadas no parênquima hepático, local de coloração predominante do anticorpo utilizado.

3.6 – Análise Estatística

Os blots foram analisados por densitometria óptica. As médias obtidas com os tratamentos foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorof-Smirnoff. Em seguida, ao comparar duas amostras distintas, utilizou-se o teste *T* de Student. Para comparações entre três ou mais tratamentos, os valores numéricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos de teste *post hoc* (Tukey). Em todos os experimentos o nível de significância foi adotado foi de $P < 0,05$.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[4 – CAPÍTULO 1 - ARTIGO]

Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology* 48: (4)628-637, 2008.

Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver[☆]

Dennys E. Cintra, José R. Pauli, Eliana P. Araújo, Juliana C. Moraes, Cláudio T. de Souza, Marciane Milanski, Joseane Morari, Alessandra Gambero, Mário J. Saad, Licio A. Velloso*

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Brazil

Background/Aims: The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10 (IL-10), is known to exert a protective role in hepatic damage caused by viruses, alcohol, autoimmunity and a number of experimental aggressors. Recently, a protective role for IL-10 has also been proposed in diet-induced hepatic dysfunction. However, studies about the mechanisms involved in this process are controversial. The objective of this study was to evaluate the role of endogenous IL-10 in the development of hepatic insulin resistance, associated with diet-induced fatty liver disease.

Methods: Male Swiss mice treated for eight weeks with a high-fat diet became diabetic and developed non-alcoholic fatty liver disease, which is characterized by increased hepatic fat deposition and liver infiltration by F4/80 positive cells. This was accompanied by an increased hepatic expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-10, and by an impaired insulin signal transduction through the insulin receptor/IRS1-IRS2/PI3-kinase/Akt/FOXO1 signaling pathway.

Results: Upon endogenous IL-10 inhibition for 5 days, using two distinct methods, a neutralizing anti-IL-10 antibody and an antisense oligonucleotide against IL-10, increased hepatic expression of the inflammatory markers TNF- α , IL-6, IL-1 β and F4/80 was observed. This was accompanied by a significant negative modulation of insulin signal transduction through insulin receptor/IRS1-IRS2/PI3-kinase/Akt/FOXO1, and by the stimulation of hepatic signaling proteins involved in gluconeogenesis and lipid synthesis.

Conclusions: Thus, in an animal model of diet-induced fatty liver disease, the inhibition of IL-10 promotes the increased expression of inflammatory cytokines, the worsening of insulin signaling and the activation of gluconeogenic and lipogenic pathways.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Non-alcoholic steatohepatitis; Inflammation; Insulin; Metabolism

Received 23 August 2007; received in revised form 26 November 2007; accepted 17 December 2007; available online 31 January 2008

Associate Editor: C.P. Day

* The authors who have taken part in the research of this paper declared that they do not have a relationship with the manufacturers of the materials involved either in the past or present and they did not receive funding from the manufacturers to carry out their research.

* Corresponding author. Address: Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13084-970, Campinas-SP, Brazil. Tel.: +55 19 37888022; fax: +55 19 37888950.

E-mail address: lavelloso@fcm.unicamp.br (L.A. Velloso).

Abbreviations: NAFLD, non-alcoholic fatty-liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; TNF-1 alfa, tumor necrosis factor-1 alfa; SOCS, suppressor of cytokine signaling.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty-liver disease (NAFLD) is present in a large number of people living in countries that have adopted a Westernized standard diet [1,2]. The disease ranges from simple steatosis to steatohepatitis (NASH), fibrosis and cirrhosis [2], and has become one of the leading causes of severe hepatic dysfunction in the modern world [1,3]. The pathogenetic mechanisms involved in the development of NAFLD have not been completely clarified, but a role for abnormal fatty acid metabolism [4], fatty acid-dependent activation of

oxidative stress [5], and diet – and obesity – associated activation of inflammatory response and liver insulin resistance [6,7] have been proposed.

Hepatic insulin resistance, as defined by impaired insulin-dependent inhibition of gluconeogenesis, defective insulin signal transduction and increased expression and action of proteins involved in lipid synthesis and storage [8], is the main biological phenomenon linking obesity and metabolic syndrome to NAFLD [8,9]. During the last 15 years, great advances have been attained in the characterization of the role played by inflammatory factors in the pathogenesis of whole body insulin resistance [10]. In the liver, a number of studies have evaluated the interplay between inflammation, insulin resistance and development of NAFLD [10,11]. Proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β), produced either by the adipose tissue or the liver [10,11], can act as common inducers of insulin resistance and NASH. In addition, proteins that belong to intracellular inflammatory pathways, such as JNK and SOCS, are implicated in the development of insulin resistance and NASH [12,13]. Since the inhibition of some of these inflammatory signals can simultaneously improve insulin action and, to a certain extent, improve NAFLD, we aim to investigate other anti-inflammatory approaches, including endogenous anti-inflammatory factors, as an attempt to understand the pathogenesis of this disease and to advance in the development of more effective therapeutic strategies.

Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine that acts as an endogenous modulator of inflammation in several tissues and organs and in different physiological and pathological contexts [14]. Recent clinical and experimental studies have shown that IL-10 levels are directly related to insulin action, *in vivo*, and that exogenous IL-10 can improve insulin action in skeletal muscle and liver [15,16]. However, in another recent study using IL-10 knockout mice fed on a high-fat diet, it was suggested that endogenous IL-10 is a protective factor only for steatosis, but not for insulin resistance [17]. Given the importance of characterizing the mechanisms involved in the genesis of liver insulin resistance and NAFLD, and since some controversies still remain, we decided to use a different approach to evaluate the role of endogenous IL-10 in the development of diet-induced NAFLD. For this, Swiss mice fed on a high-fat diet were treated either with a neutralizing anti-IL-10 antibody or with an IL-10 antisense oligonucleotide. The inhibition of IL-10 led to an increased expression of proinflammatory markers, to a worsening of insulin-induced activation of signal transduction, to an increased expression of proteins involved in gluconeogenesis and lipidogenesis and to the activation of pro-apoptotic signaling in the liver.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies, chemicals and buffers

The reagents for SDS polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). The reagents for chemoluminescence labeling of proteins in blots were from Amersham (Aylesbury, UK). Human recombinant insulin (Humulin R) was from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Anti-insulin receptor (IR) (sc-711, rabbit polyclonal), anti-insulin receptor substrate 1 (IRS1) (sc-560, rabbit polyclonal), anti-insulin receptor substrate 2 (IRS2) (sc-8299, rabbit polyclonal), anti-Akt (sc-1618, goat polyclonal), anti-phosphotyrosine (pY) (sc-508, mouse monoclonal), anti-phospho [Ser⁴⁷³] Akt (sc-7985-R, rabbit polyclonal), anti-FOXO1 (sc-11350, rabbit polyclonal), anti-phospho [Ser²⁵⁶] FOXO1 (sc-22158-R, rabbit polyclonal), anti-TNF- α (sc-1350, goat polyclonal), anti-IL-1 β (sc-7884, rabbit polyclonal), anti-IL-6 (sc-1265, goat polyclonal), anti-IL-10 (sc-1783, goat polyclonal), anti-F4/80 (sc-25830, rabbit polyclonal), anti-carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) (sc-20514, goat polyclonal), anti-fatty acid synthase (FAS) (sc-16146, goat polyclonal), anti-phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (sc-28477, goat polyclonal), anti-glucose-6-phosphatase (G6P) (sc-25840, rabbit polyclonal), anti-FAS-associated death domain protein (FADD) (sc-5559, rabbit polyclonal), anti-Apaf-1 (sc-8339, rabbit polyclonal), anti-caspase-8 (sc-7890, rabbit polyclonal), anti-caspase-9 (sc-8355, rabbit polyclonal), anti-Bcl2 (sc-783, rabbit polyclonal) and anti-Bax (sc-6236, rabbit polyclonal) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho [Ser⁷⁹] acetyl CoA carboxylase (ACC) (#07-184, rabbit polyclonal) was from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA) and anti-phospho [Ser^{21/9}] glycogen synthase kinase 3 α/β (GSK3) (#9327, rabbit monoclonal) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Chemicals for real-time PCR were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.2. Experimental model and treatment protocols

Male, 4-week-old Swiss, (Sw/Uni) inbred strain mice, originally imported from the Jackson Laboratory and currently bred at the State University of Campinas Breeding Center were used in the study. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23 revised 1996). The animals were maintained on a 12:12 h artificial light dark cycle and housed in individual cages. After random selection, 4-week-old mice (21 ± 2 g) were introduced to control or high-fat diets (Table 1). After 8 w on a high-fat diet, all Sw/Uni mice presented severe hepatic steatosis and defective insulin signal transduction plus diabetes. At this point, the biochemical and metabolic characterization of the model and the evaluation of liver histology and cytokine expression were performed. Next, Sw/Uni mice on a high-fat diet were randomly selected for treatment with an IL-10 neutralizing antibody (IL-10 Ab) [or with a rabbit pre-immune antiserum (RPIS)], or with an IL-10 phosphorothioate modified antisense oligonucleotide (IL-10 AS) [or sense oligonucleotide (IL-10 S)]. Treatments lasted for 5 days, according to the protocols presented below. At this point, mice were employed for evaluation of liver enzymes in serum, histological examination, determination of liver glycogen content, cytokine, apoptosis and inflammatory protein expression, insulin signal transduction and expression of proteins of the gluconeogenic and lipidogenic pathways. The outlines of the experimental approach are depicted in Fig. 1A.

2.3. IL-10 antisense oligonucleotide

Phosphorothioate-modified sense and antisense oligonucleotides (produced by Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) were diluted to final concentrations of 5–40 nmol/ml in dilution buffer containing

Table 1
Macronutrient composition of the diets

	Control diet		High-fat diet	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	20	18	19	12
Carbohydrate	62	73	45	27
Total fat	4	9	36	61
kJ/g	15.8		24.5	

10 mmol/l Tris HCl and 1.0 mmol/l EDTA. The mice were injected (ip) with two daily doses of 100 μ l of dilution buffer containing, or not, sense (IL-10 S) or antisense oligonucleotides (IL-10 AS). The oli-

gonucleotides were designed according to the *Mus musculus* IL-10 sequence deposited at the NIH-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) under the designation NM 010548, and were composed of 5'-GCC AGT CAG TAA GAG CAG-3' (sense) and 5'-TGA GAT CTG CAA TGC A-3' (antisense). In some experiments, designed to evaluate the efficiency of the oligonucleotides, different doses were employed, as described under results.

2.4. IL-10 neutralizing antibody

Sw/Uni mice fed on a high fat diet were randomly selected for treatment with saline, rabbit pre-immune serum (RPIS) or rabbit antiserum against IL-10 (IL-10 Ab). For evaluation of the capacity of the antiserum to neutralize IL-10 in liver, doses of 1.25 and 0.625 μ g antibody, diluted in 100 μ l saline were tested in a protocol consisting of

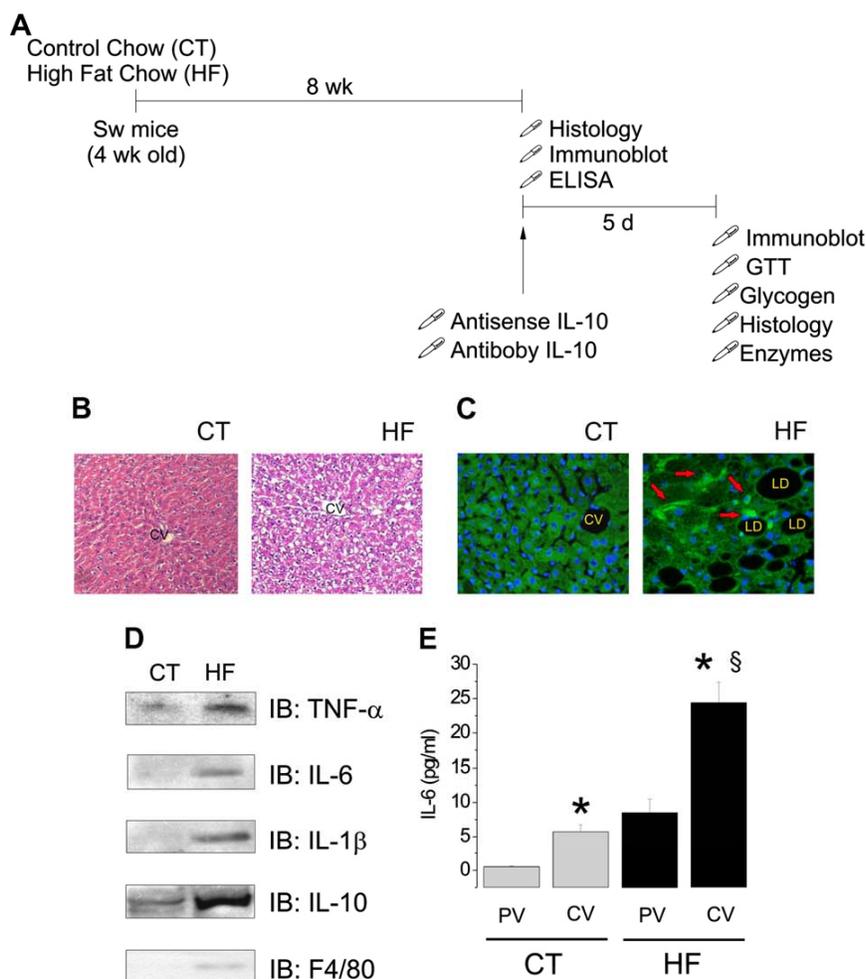


Fig. 1. The scheme for the experimental protocol employed in this study is presented in (A) Four-week-old male Swiss mice were fed either control (CT) or high fat (HF) diets. After 8 weeks, some mice were randomly selected for histology, immunoblotting and IL-6/ELISA studies. Thereafter, the remaining HF mice were randomly selected for treatment with antisense oligonucleotide for IL-10, antibody anti-IL-10, or respective controls. After 5 days, the mice were employed in histology, determination of serum levels of liver enzymes, immunoprecipitation and/or immunoblot experiments, intraperitoneal glucose tolerance tests (ipGTT) and liver glycogen determinations. Hematoxylin–eosin (HE) staining (B), and indirect immunofluorescence for F4/80 (C) were performed in 4.0- μ m sections of livers obtained from mice fed control (CT) or high-fat (HF) diets for 8 weeks. The protein amounts of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 and F4/80 were determined by immunoblotting (IB) in samples from livers obtained from mice fed control (CT) or high-fat (HF) diets for 8 weeks (D). IL-6 was determined by ELISA in blood samples obtained from portal (PV) or cava (CV) veins from mice fed control (CT) or high fat (HF) diets for 8 weeks (E). In (B–D), microphotographs and gels are representative of four distinct experiments; in (E), $n = 5$, * $p < 0.05$ vs. PV of the same diet, § $p < 0.05$ vs. CV of CT diet. In (B and C), CV, centrolobular vein; LD, lipid droplet; red arrows indicate F4/80 positive cells. [This figure appears in colour on the web.]

one dose ip per day, for 5 days. Neutralizing efficiency was evaluated at the end of the experimental period by immunoblotting liver total protein samples with anti-IL-10 antibody. The dose of 1.25 µg was selected for use in the remaining experiments.

2.5. Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

After 6 h fasting, mice were anesthetized by an ip injection of ketamin/diazepam (1/1 v/v), and the experiments were initiated after the loss of corneal and pedal reflexes. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail at 30, 60, 90 and 120 min for determination of glucose concentrations.

2.6. Determination of hepatic enzymes in serum

Aspartate (AST) and alanine (ALT) amino transferases in serum were determined using a commercially available kit from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil), according to the manufacturer's guidelines.

2.7. ELISA

At the end of the first part of the study, some mice from the control and high-fat diet groups were selected for determination of IL-6 concentration in portal and supra-hepatic cava veins. For this, mice were anesthetized and blood samples were collected from each vein. IL-6 was determined in serum from each sample using a commercially available ELISA kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA).

2.8. Liver histology

Hydrated, 4.0 µm sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver specimens were stained by regular haematoxylin eosin (HE) method for evaluation of liver histology [18]. The expression of F4/80 was evaluated by indirect immunofluorescence staining, as previously described [19].

2.9. Immunoprecipitation and immunoblotting

For evaluation of cytokine and protein expression, the abdominal cavities of anesthetized mice were opened and fragments of liver (3.0 × 3.0 × 3.0 mm) were gently removed and immediately homogenized in solubilization buffer at 4 °C [1% Triton X-100, 100 mmol/l Tris HCl (pH 7.4), 100 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium orthovanadate, 2.0 mmol/l PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml]. The protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford dye binding method. Samples containing 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies against TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, F4/80, IR, IRS1, IRS2, Akt, FOXO1, CPT-1, phospho [Ser⁷⁹] ACC, phospho [Ser^{21/9}] GSK3, FAS, PEPCK, G6P, Bax and Bcl2. For evaluation of insulin signal transduction in liver, the abdominal cavities of anesthetized mice were opened and the animals received an injection of insulin (100 µl, 10⁻⁶ mol/l) or saline (100 µl) through the portal vein. After different intervals (described in Results), fragments (3.0 × 3.0 × 3.0 mm) of liver were excised and immediately homogenized in solubilization buffer, as above. Samples of total protein extracts containing 2.0 mg of protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS1 or IRS2 at 4 °C overnight, followed by SDS/PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-phosphotyrosine (pY) antibodies. Some samples were analyzed by direct immunoblotting using antibodies against phospho [Ser⁴⁷³] Akt, or phospho [Ser²⁵¹] FOXO1. In some experiments pro-apoptotic signaling was evaluated by performing immunoprecipitation/immunoblotting to determine FADD/caspase-8 and Apaf/caspase-9 associations in the liver. Specific bands were labeled by chemiluminescence and visualization was performed by exposure of the membranes to RX-films.

2.10. RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total liver RNA was obtained from frozen tissue using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. Following treatment with DNase I, purified RNA was used as template for first-strand cDNA synthesis using SuperScript III. Quantitative real-time PCR for G6P was run using the commercially available primers from Applied Biosystems (Mm00839363_m1). Reference gene was GAPDH (Applied Biosystems). Results are expressed as relative transcript amount as previously optimized [20].

2.11. Statistical analysis

Specific protein bands present in the blots were quantified by digital densitometry (ScionCorp, Inc., Frederick, MD, USA). Mean values ± SEM obtained from densitometry scans, IL-6 ELISA measurements, real-time PCR, and values for liver glycogen; blood glucose, insulin, liver enzymes; area under glucose curve during ipGTT, food intake and body mass were compared utilizing Turkey Kramer test (ANOVA); *p* < 0.05 was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. Metabolic and immunological characteristics of the experimental animals

Sw/Uni mice fed on HF diet for 8 weeks presented a significant increase in body mass, blood glucose and insulin levels, while no change was detected in mean daily food intake and serum triglycerides (Table 2). The livers of mice on HF diet were clearly steatotic (Fig. 1B, *n* = 4). The intra-hepatocyte fat depots were predominant in the perivenular zone with extensions to the external areas of the lobule. In addition, many cells expressing F4/80 were detected in regions surrounding lipid droplets in the livers of SW/Uni mice fed on HF diet, but not in mice fed regular chow (Fig. 1C, *n* = 4). The increased expression of F4/80 was further confirmed by immunoblot (Fig. 1D, 1.8 ± 0.2-fold, *p* < 0.05 vs. CT, *n* = 4), which also showed the increased expression of the inflammatory cytokines TNF-α (2.7 ± 0.4-fold, *p* < 0.05 vs. CT, *n* = 4), IL-6 (2.1 ± 0.3-fold, *p* < 0.05 vs. CT, *n* = 4) and IL-1β (2.3 ± 0.4-fold, *p* < 0.05 vs. CT, *n* = 4) (Fig. 1D) and the increased expression of the regulatory cytokine IL-10 (4.1 ± 0.5-fold, *p* < 0.05 vs. CT, *n* = 4) (Fig. 1D). In order to evaluate whether the consumption of HF diet would induce the production of inflamma-

Table 2
Metabolic parameters of the experimental animals

	CT	HF
Body mass (g)	34.0 ± 1.1	51.3 ± 1.8*
Food intake (g/24 h)	5.70 ± 0.85	6.40 ± 0.90
Glucose (mg/dl)	122 ± 8	311 ± 17*
Insulin (ng/ml)	6.2 ± 1.6	15.4 ± 2.8*
Triglycerides (mg/dl)	95.3 ± 13.1	96.7 ± 11.7

* *p* < 0.05.

tory cytokines by the liver, blood samples were collected from the portal and the supra-hepatic cava veins to determine the concentration of IL-6 using an ELISA method. A clear gradient could be detected from the portal to the supra-hepatic cava vein both in control and HF mice (Fig. 1E, $n = 5$). However, the levels of IL-6 were significantly higher in samples from HF mice, suggesting that both hepatic and extra-hepatic sites were involved in the production of the inflammatory response.

3.2. Effect of IL-10 expression inhibition by an antisense oligonucleotide

The treatment of HF mice for 5 days with an antisense oligonucleotide to IL-10 produced a dose dependent inhibition of IL-10 expression in liver (Fig. 2A, $n = 5$), which was not accompanied by significant modifications of food intake and body mass. Based on the dose–response experiment we elected the dose of 4.0 nmol antisense oligonucleotide twice a day to be employed in the remainder of the experiments. This dose provided a reduction of $93 \pm 7\%$ of IL-10 expression after five days ($n = 5$), and led to significant increases in TNF- α (2.2 ± 0.3 -fold, $p < 0.05$ vs. DB, $n = 5$), IL-6

(2.8 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$ vs. DB, $n = 5$), IL-1 β (3.6 ± 0.6 -fold, $p < 0.05$ vs. DB, $n = 5$) and F4/80 (2.0 ± 0.3 -fold, $p < 0.05$ vs. DB, $n = 5$), expression in liver (Fig. 2B). In order to evaluate the effect of this treatment on whole body glucose homeostasis, mice treated with dilution buffer, sense and antisense oligonucleotides were submitted to a glucose tolerance test. As depicted in Fig. 2C ($n = 5$), the inhibition of IL-10 promoted a significant increase in glucose under the curve during the test, demonstrating a defective whole body glucose handling.

3.3. Effect of IL-10 neutralization by antibody

The treatment of HF mice with a neutralizing antibody to IL-10 for 5 days was effective in producing an almost complete depletion ($82 \pm 8\%$) of IL-10 presence in liver (Fig. 3A, $n = 5$) without affecting food intake and body mass. This approach was accompanied by increased liver expression of TNF- α (2.9 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), IL-6 (3.1 ± 0.5 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), IL-1 β (3.0 ± 0.4 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) and F4/80 (1.9 ± 0.2 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) (Fig. 3B). Similarly to the effect of IL-10 inhibition by antisense oligonucleotide,

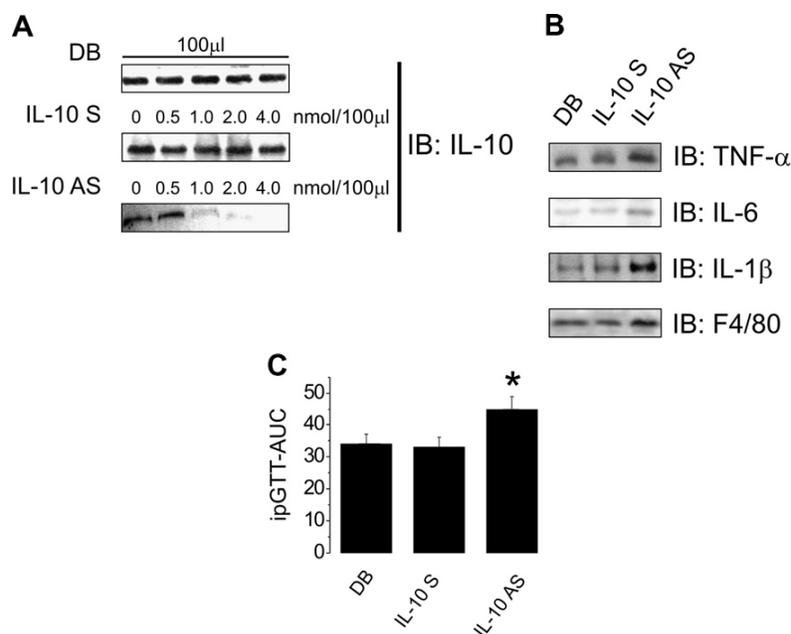


Fig. 2. (A) Mice fed on a high-fat diet were treated ip with dilution buffer (DB) (100 μ l, twice a day), IL-10 sense (IL-10 S) oligonucleotide (0.0–4.0 nmol in 100 μ l, twice a day), or IL-10 antisense (IL-10 AS) oligonucleotide (0.0–4.0 nmol in 100 μ l, twice a day) for five days. At the end of the experimental period, mice were anesthetized and fragments of the livers were obtained for determination of IL-10 expression by immunoblot (IB). (B and C) Mice fed a high fat diet were treated ip with dilution buffer (DB) (100 μ l, twice a day), IL-10 sense (IL-10 S) oligonucleotide (4.0 nmol in 100 μ l, twice a day), or IL-10 antisense (IL-10 AS) oligonucleotide (4.0 nmol in 100 μ l, twice a day) for five days. In (B), at the end of the experimental period, mice were anesthetized and fragments of the livers were obtained for determination of TNF- α , IL-6, IL-1 β and F4/80 expression by immunoblot (IB). In C, at the end of the experimental period, mice were employed for determination of glucose under curve during a glucose tolerance test (ipGTT-AUC). In all experiments $n = 5$, in C, $p < 0.05$ vs. DB.

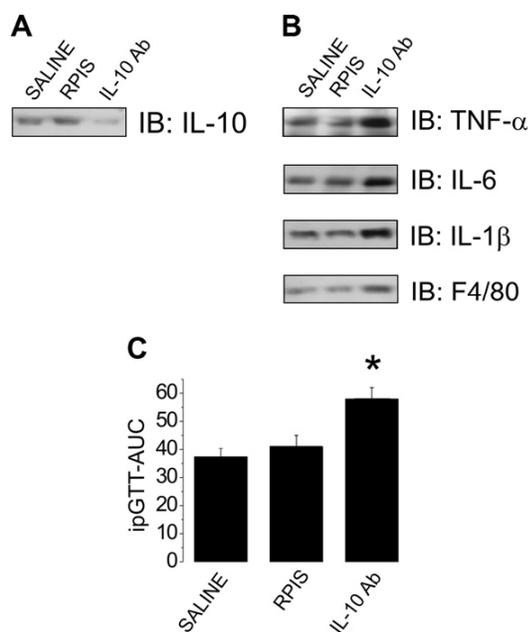


Fig. 3. Mice fed a high fat diet were treated ip with saline (100 μ l, once a day), rabbit pre-immune serum (RPIS) (1.25 μ g in 100 μ l, twice a day), or rabbit IL-10 antisera (IL-10 Ab) (1.25 μ g in 100 μ l, twice a day) for five days. At the end of the experimental period, mice were anesthetized and fragments of the livers were obtained for determination of IL-10 (A), TNF- α , IL-6, IL-1 β and F4/80 (B) expression by immunoblot (IB). In (C), at the end of the experimental period, mice were employed for determination of glucose under curve during a glucose tolerance test (ipGTT-AUC). In all experiments $n = 5$, in (C), * $p < 0.05$ vs. SALINE.

the neutralization of IL-10 by antibody produced a significant increase in glucose area under the curve during a glucose tolerance test (Fig. 3C, $n = 5$).

3.4. Effect of IL-10 inhibition/neutralization on liver insulin signal transduction

To evaluate the role of endogenous IL-10 on liver insulin action, HF mice were treated for 5 days with IL-10 Ab or respective controls and then used in immunoprecipitation and immunoblot experiments to evaluate insulin signal transduction. As depicted in Fig. 4A, neutralization of IL-10 produced a significant reduction in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor (IR) (0.43 ± 0.03 -fold, $p < 0.05$ vs. RPIS, $n = 5$), of the insulin receptor substrate 1 (IRS1) (0.38 ± 0.05 -fold, $p < 0.05$ vs. RPIS, $n = 5$), of the insulin receptor substrate 2 (IRS2) (0.17 ± 0.01 -fold, $p < 0.05$ vs. RPIS, $n = 5$) and a significant reduction in insulin-induced serine phosphorylation of the insulin-responsive transcription factor FOXO1 (0.19 ± 0.02 -fold, $p < 0.05$ vs. RPIS, $n = 5$). The impairment of insulin signaling promoted by the neutralization of IL-10 was accompanied by reduced liver glycogen content (Fig. 4B, $n = 5$), by the activation of hepatic enzymes

involved in lipid synthesis, acetyl CoA carboxylase (ACC) (0.19 ± 0.03 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) (which is active when non-phosphorylated) and fatty acid synthase (FAS) (3.9 ± 0.6 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), by the reduced expression of a protein involved in lipid oxidation, carnitine-palmitoyl transferase 1 (CPT1) (0.69 ± 0.06 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), by reduced glycogen synthetic activity, measured by the inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) (0.48 ± 0.05 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), and by the increased expression of the gluconeogenic enzyme PEPCK (4.3 ± 0.14 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) (Fig. 4C). Unexpectedly, the protein (Fig. 4C) and mRNA (Fig. 4D) amounts of the gluconeogenic enzyme G6P were not modified by the treatment. To evaluate if inhibition of IL-10 expression by IL-10 AS would have a similar effect on insulin signaling in the liver, mice treated for 5 days with the antisense oligonucleotide or respective controls were employed. As depicted in Fig. 4E, IL-10 AS treatment promoted a significant reduction in insulin-induced serine phosphorylation of Akt (0.38 ± 0.02 -fold, $p < 0.05$ vs. IL-10 S, $n = 5$) and FOXO1 (0.39 ± 0.03 -fold, $p < 0.05$ vs. IL-10 S, $n = 5$).

3.5. IL-10 immunoneutralization induces the activation of pro-apoptotic signaling in the liver

To evaluate the effect of IL-10 immunoneutralization on liver function and damage, liver samples from mice treated with the anti-IL-10 antibody were used in histological and immunoprecipitation/immunoblotting experiments, while blood samples collected at the end of the experimental period were used in determinations of the hepatic enzymes AST and ALT. No significant modification of the histological aspect of the liver, neither significant change in AST and ALT amounts in blood were observed after IL-10 neutralization (not shown). However, there were significant increases of the associations of FADD with caspase-8 (5.8 ± 0.18 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$), and of Apaf with caspase-9 (1.9 ± 0.07 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) (Fig. 4F). In addition, the protein amount of Bax (2.2 ± 0.13 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) and Bcl2 (3.1 ± 0.23 -fold, $p < 0.05$ vs. SALINE, $n = 5$) (Fig. 4F) was also significantly increased.

4. Discussion

IL-10 was initially characterized as an anti-inflammatory cytokine, produced by components of the immune system, such as T and B lymphocytes, macrophages and monocytes [21]. Subsequently, other cell types and organs were shown to produce IL-10 under specific circumstances [14]. In liver, IL-10 expression has been

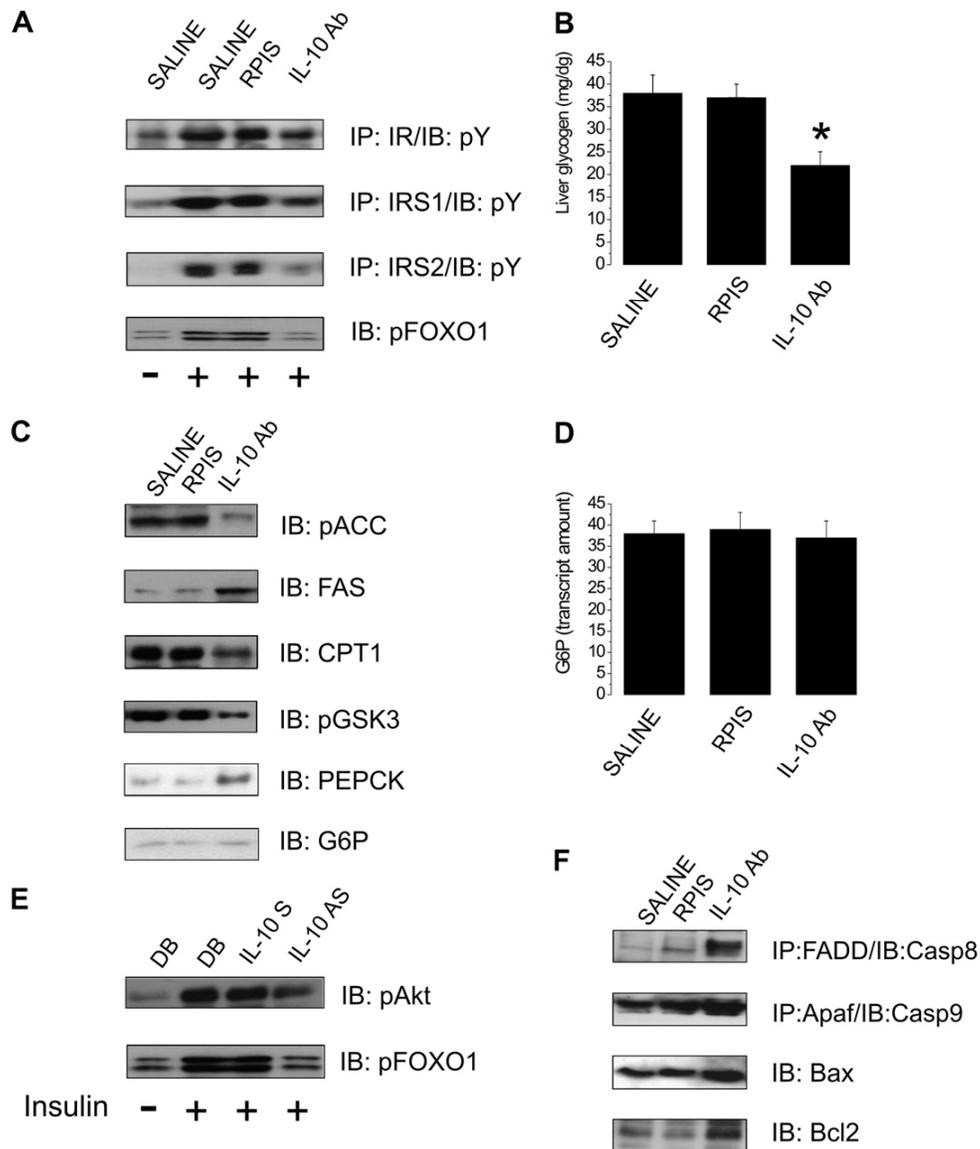


Fig. 4. In (A–D and F), mice fed on a high-fat diet were treated ip with saline (100 μ l, once a day), rabbit pre-immune serum (RPIS) (1.25 μ g in 100 μ l, twice a day), or rabbit IL-10 antiserum (IL-10 Ab) (1.25 μ g in 100 μ l, twice a day) for five days. In (A), mice were anesthetized, acutely treated with saline (–) (100 μ l, through the cava vein) or insulin (+) (100 μ l, 10^{-6} M, through the cava vein) and fragments of the livers were obtained for determination of insulin receptor (IR) and insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/IRS2) tyrosine phosphorylation (pY) by immunoprecipitation (IP) with specific antibodies and immunoblotting with anti-pY antibodies, and for determination of phospho [Ser²⁵⁶] FOXO1 (pFOXO1) by immunoblot (IB). In (B–D and F), mice were anesthetized and fragments of the livers were obtained for determination of glycogen concentration (B); expression of phospho [Ser⁷⁹] acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1), phospho [Ser²¹⁹] glycogen synthase kinase 3 (GSK3), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and glucose-6-phosphatase (G6P) expressions by immunoblot (IB) (C); transcript amount of G6P by real-time PCR (D); associations of FADD with caspase-8 (Casp8) and of Apaf with caspase-9 (Casp9) by immunoprecipitation (IP) followed by immunoblot (IB), and expressions of Bax and Bcl2 by immunoblot (IB) (F). In (E), mice fed a high fat diet were treated ip with dilution buffer (DB) (100 μ l, twice a day), IL-10 sense (IL-10 S) oligonucleotide (4.0 nmol in 100 μ l, twice a day), or IL-10 antisense (IL-10 AS) oligonucleotide (4.0 nmol in 100 μ l, twice a day) for five days. At the end of the experimental period, mice were anesthetized, acutely treated with saline (–) (100 μ l, through the cava vein) or insulin (+) (100 μ l, 10^{-6} M, through the cava vein) and fragments of the livers were obtained for determination of phospho [Ser⁴⁷³] Akt (pAkt) and phospho [Ser²⁵⁶] FOXO1 (pFOXO1) by immunoblot (IB). In all experiments $n = 5$, in B * $p < 0.05$ vs. saline.

detected in hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, stellate cells, and in hepatic infiltrating lymphocytes [22–24]. In agreement with the known immunomodulatory activity of IL-10 in other tissues, a

number of studies have reported a role for IL-10 as a protective factor against liver damage in diseases such as experimental hepatitis induced by LPS and concanavalin A [25,26], schistosomiasis [27], alcoholic hepatitis

[28], and hepatitis C virus infection [29]. More recently, some groups have reported a protective role for IL-10 in fatty liver disease [16,30].

Given that liver insulin resistance is present in patients and animal models of diet-induced hepatic dysfunction, and since inflammation plays an important role in whole body and hepatic insulin resistance [10,11], it was tempting to hypothesize that, due to its anti-inflammatory properties, endogenous IL-10 could act as a modulator of the defective insulin signal transduction in liver, and exert a protective role against diet-induced/insulin resistance-associated fatty liver disease.

To test this hypothesis we induced hepatic steatosis and whole body insulin resistance in Swiss mice by feeding them with a standard high fat diet [31]. Swiss mice are genetically related to the diabetes-prone AKR mice [32]. When fed a high-fat diet they become rapidly obese and diabetic [33], presenting increased blood levels of inflammatory cytokines [34]. Therefore, high-fat diet fed Swiss mice are regarded as good experimental models for diabetes, steatosis and metabolic syndrome [33,34].

In the first part of the study, we expanded the characterization of the animal model by determining the expression of IL-10 and inflammatory markers in the liver. As in other models of diet-induced steatosis [1–3], the expressions of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, and of the activated macrophage antigen F4/80 were increased. This was accompanied by a remarkable increase in IL-10. In addition, we observed that at least part of the immune response triggered by the HF diet was produced in liver as shown by the gradient of blood IL-6 levels detected between pre- and post-hepatic veins.

To evaluate the role played by endogenously produced IL-10 upon liver insulin action we employed two distinct methods, the inhibition of expression by an antisense oligonucleotide, and the immunoneutralization by a specific antiserum. For the antisense oligonucleotide approach, the target sequence was selected from the *M. musculus* mRNA code deposited at the NIH-NCBI and was specific for mouse IL-10 mRNA. With this approach, we obtained an almost complete inhibition in liver IL-10 expression. For the immunoneutralization approach, the treatment with the antiserum produced approximately an 80% reduction in immunoreactive IL-10 in liver. Both approaches have been widely used in other systems with reproductive and reliable results [35–37]. In addition to the use of immunoblotting to evaluate the efficiency of the methods to inhibit IL-10, we performed a glucose tolerance test to determine the effect of these approaches on whole body glucose homeostasis. In two previous studies, different means used to modulate IL-10 *in vivo* led, invariably, to changes in whole body glucose disposal [16,30].

Therefore, we believe that the increased glucose under curve during the ipGTT in mice treated with the IL-10 AS or with the IL-10 Ab provides further evidence for the efficiency of the methods employed.

Next, we showed that inhibiting IL-10 by either means produces a significant impairment of insulin signal transduction through key proteins involved in the control of metabolic functions in liver cells [38]. In addition, we demonstrated that immunoneutralization of IL-10 reduces liver glycogen contents and inhibits proteins involved in gluconeogenesis and lipid β -oxidation, while stimulating proteins involved in lipid synthesis and storage. Out of the evaluated proteins, only G6P was not modulated by the inhibition of IL-10. Although G6P plays an important role in the control of gluconeogenesis, previous studies have reported its unexpected regulation in conditions such as inflammation and TNF- α treatment [39,40]. We believe, the increased expression of inflammatory cytokines, including TNF- α , as seen in our model, produces an inhibitory modulation of G6P that counteracts the stimulus imposed by the metabolic condition of the experimental animal.

In the final part of the study, we demonstrated that the inhibition of IL-10 may produce liver damage. The association of FADD with caspase-8, which reflects activation of extrinsic apoptotic pathway [41], and the association of Apaf with caspase-9 which reflects the activation of mitochondria-dependent apoptotic signaling [41] were increased and accompanied by the expression of the apoptosis regulatory protein Bcl-2 and the pro-apoptotic protein Bax [42]. The absence of changes in liver histology and serum liver enzymes may be due to the short-term treatment.

Thus, endogenous IL-10 seems to play a role in the control of both molecular and functional events related to insulin action in liver. In a recent study, den Boer and collaborators used an IL-10 knockout mouse to study the outcomes of a complete IL-10 deficiency on diet-induced hepatic steatosis and insulin signal transduction [17]. In contrast to the results herein presented, they found that the lack of IL-10 produced a worsening of steatosis, but did not interfere with hepatic and whole body insulin action. Certainly, there are a number of differences concerning the animal models employed that could explain the differences found between this previous and our study, perhaps the most important being the anomalous immune regulation that is characteristic of the IL-10 KO mouse [43]. As shown in a number of studies, IL-10 KO mice have defective Th1 and Th2 responses, produce large amounts of TNF- α under different sorts of stimuli and are prone to gastroenteric, rheumatologic and allergic conditions [14]. The anomalous immune response, acting during a life-long period, could produce unexpected results in the modulation of related functions, such as in metabolism, for example.

Moreover, a number of studies have shown that knock-out mice can frequently compensate for the defective gene by hyperexpressing other proteins. We believe that the results of the studies by den Boer and ours should be evaluated separately. While the complete congenital lack of IL-10 may not affect insulin action in models of diet-induced steatosis, the short-term inhibition of endogenous IL-10 in a non-genetically manipulated mouse produce a significant impairment of insulin action in liver. This interpretation is further supported by the fact that, upon short-term exogenous IL-10 treatment, an improved insulin action is detected in liver and muscle [16].

In conclusion, short-term inhibition of endogenous IL-10 by two different means impairs insulin signal transduction in the liver of an animal model of defective insulin signal transduction and steatosis, suggesting that this immunomodulatory cytokine exerts a protective role for liver insulin resistance associated with diet-induced steatosis.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We are indebted to Dr. N. Conran for English editing and to G. Ferraz for technical assistance.

References

- [1] Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:398–403.
- [2] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221–1231.
- [3] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147–152.
- [4] Lombardi B. Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab Invest* 1966;15:1–20.
- [5] Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002;37:56–62.
- [6] Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2557–2562.
- [7] Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3023–3028.
- [8] Utzschneider KM, Kahn SE. Review: the role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4753–4761.
- [9] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99–S112.
- [10] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–867.
- [11] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793–1801.
- [12] Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006;43:163–172.
- [13] Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatol Res* 2005;33:185–192.
- [14] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
- [15] Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Krukowska A, Gorska M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. *Diabetes Care* 2005;28:2036–2037.
- [16] Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 2004;53:1060–1067.
- [17] den Boer MA, Voshol PJ, Schroder-van der Elst JP, Korsheninnikova E, Ouwens DM, Kuipers F, et al. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 2006;147:4553–4558.
- [18] Lin XZ, Hornig MH, Sun YN, Shiesh SC, Chow NH, Guo XZ. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:75–80.
- [19] Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, Augusto VD, et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* 2004;181:25–38.
- [20] Bertelli DF, Araujo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, Toyama MH, et al. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide triphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 2006;147:5385–5399.
- [21] Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–979.
- [22] Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998;273:302–308.
- [23] Wahl C, Bochtler P, Schirmbeck R, Reimann J. Type I IFN-producing CD4⁺ Valpha14i NKT cells facilitate priming of IL-10-producing CD8⁺ T cells by hepatocytes. *J Immunol* 2007;178:2083–2093.
- [24] Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226–229.
- [25] Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, et al. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996;111:736–744.
- [26] Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997;25:1382–1389.
- [27] Winn LM, Kim PM, Wells PG. Investigation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol for in vivo and in vitro murine embryopathy and embryonic ras mutations. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:1128–1135.
- [28] Le Moine O, Marchant A, De Groot D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:1436–1439.
- [29] Abel M, Sene D, Pol S, Bourliere M, Poynard T, Charlotte F, et al. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8⁺ T cells

- prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;44:1607–1616.
- [30] Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1055–1058.
- [31] De Souza CT, Araujo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, Rocco SA, et al. Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J* 2007;21:1153–1163.
- [32] Rossmesl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 2003;52:1958–1966.
- [33] De Souza CT, Araujo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 2005;48:1860–1871.
- [34] Pitombo C, Araujo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol* 2006;191:699–706.
- [35] Flores MB, Fernandes MF, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, et al. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes* 2006;55:2554–2561.
- [36] Araujo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146:1428–1437.
- [37] Araujo EP, Carnevalheira JB, Velloso LA. Disruption of metabolic pathways perspectives for the treatment of cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:77–87.
- [38] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799–806.
- [39] Grempler R, Kienitz A, Werner T, Meyer M, Barthel A, Ailet F, et al. Tumour necrosis factor alpha decreases glucose-6-phosphatase gene expression by activation of nuclear factor kappaB. *Biochem J* 2004;382:471–479.
- [40] Yasmin WG, Theologides A. Effect of tumor necrosis factor on enzymes of gluconeogenesis in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;199:97–103.
- [41] Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31–S34.
- [42] van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 2006;16:203–213.
- [43] Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[5 – CAPÍTULO 2 - DISCUSSÃO]

A transição nutricional moderna verteu o estado deplorável da fome à soberba da ingestão alimentar excessiva (Coutinho et al., 2008). Doenças como obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemias figuram entre os principais problemas de saúde no mundo moderno (Verdier et al., 2007), e inúmeras conseqüências secundárias ao desenvolvimento dessas doenças surgem muitas vezes de forma insidiosa, como é o caso da doença não alcoólica do fígado gorduroso (Lee et al., 2007). Nos pacientes acometidos pela esteatose hepática, é possível que haja a evolução desse quadro à fibrose e à cirrose, apesar do perfil benigno de um acúmulo simples ou transitório de gordura no fígado (Puerta et al., 2005).

A interferência nos processos normais de metabolização de nutrientes e biossíntese energética precede a progressão da doença. O círculo vicioso tem início com o aumento da concentração hepática de gordura, seguido pela peroxidação lipídica, pelo início do processo inflamatório local, pelo prejuízo nas vias de favorecimento oxidativo e de sinalização da insulina, e ainda, pelo importante incremento de vias lipogênicas; além disso, podem em determinadas circunstâncias, ser ativados programas de morte celular. Dessa forma, novamente e mais uma vez há o acúmulo de lípidos no parênquima hepático, que dependendo da extensão do dano, poderá ou não evoluir de forma dramática (Angulo et al., 2002). Para que o círculo torne-se virtuoso, proteínas que controlam a maquinaria de sobrevivência celular são ativadas, reduzindo a inflamação (Muriel, 2008) favorecendo assim, a sobrevivência celular, e também as rotas catabólicas.

Com base nos conceitos expostos acima e, visando avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na integração entre os fenômenos fisiológicos e moleculares que controlam o passo da doença hepática, utilizou-se na presente tese um modelo animal exposto ao consumo *ad libitum* de uma dieta rica em lípidos, em sua maioria saturados.

A exposição de animais à dieta hiperlipídica retrata de forma extrapolada o comportamento do humano ocidental, caracterizado pelas doenças anteriormente descritas. Camundongos Swiss quando submetidos à dieta

hiperlipídica durante as oito semanas protocolares, apresentaram considerável ganho ponderal, aumentando até 30% do seu peso quando comparado aos animais que receberam dieta normocalórica. Além disso, ao avaliarmos os níveis glicêmicos em jejum, observamos uma drástica elevação, chegando à média de 250 mg/dL.

De Souza, em 2005 e Araújo, em 2007 obtiveram resultados semelhantes quanto à evolução ponderal e o desenvolvimento da obesidade e diabetes em modelos experimentais similares. Outro modelo experimental para o desenvolvimento de esteato-hepatite não alcoólica em animais tem sido muito utilizado (Wortham et al., 2008; Lin et al., 2008; Koteish et al., 2001). A partir de uma dieta também rica em gordura e deficiente em metionina e colina (DMC), os animais desenvolvem o mesmo processo inflamatório hepático em relação ao encontrado em nossos experimentos. Entretanto, esse não parece ser um bom modelo, devido à irreprodutibilidade das condições naturalmente encontradas na doença humana, ou seja, a dieta deficiente em metionina e colina reproduz uma condição de deficiência nutricional, acarretando em processo inflamatório hepático. Contudo, interferências moleculares imprevisíveis poderiam interferir no julgamento do desenvolvimento da doença, podendo ainda ocasionar resultados falso-positivos ou negativos. A dieta rica em gordura de origem animal é o modelo mais semelhante da NAFLD quando comparado ao que ocorre em humanos (Morgan, 2008).

O processo de desenvolvimento da infiltração lipídica no fígado dos animais foi semelhante ao encontrado em outros trabalhos. Nishikawa, em 2008, estudou em outros dois modelos experimentais, BALB/c e C57BL/6J, a infiltração lipídica desenvolvida quando animais foram submetidos a dietas ricas em gordura. Em ambos os modelos encontram-se esteatose moderada. E de forma interessante, após jejum de 24 horas, o acúmulo de lipídios no parênquima hepático foi reduzido consideravelmente nos camundongos C57, diferentemente do BALB/c, que apresentou, além disso, regulação positiva no RNAm de proteínas controladas por genes lipogênicos, como a SREBP-1c, ACC, FAS e glicerol-3-fosfato sintase. As citocinas pró- (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e

antiinflamatórias (IL-10) tiveram suas expressões aumentadas nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, em comparação aos que receberam a dieta comercial. Com isso, a esteato-hepatite foi confirmada. Discussões na literatura vigoram a respeito da utilização da relação entre os níveis séricos de IL-10/TNF- α como um possível marcador para a confirmação de esteato-hepatite, juntamente com outros dados não invasivos, dada a insidiosidade da doença (El-Zayadi AR, 2008; Hashem et al., 2008). Fotomicrografias do parênquima hepático são claras ao demonstrarem a dimensão da infiltração lipídica nos hepatócitos, quando comparados aos animais que receberam apenas dieta comercial. O modelo experimental foi efetivo não apenas para o desenvolvimento de esteatose hepática, bem como em sua evolução para esteato-hepatite. A inflamação comprovada pelo aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias pôde também ser observada na visualização microscópica. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina demonstram a exuberante infiltração inflamatória, marcada principalmente pela presença de neutrófilos e eosinófilos. De 80 a 90% dos macrófagos presentes no organismo são residentes no fígado (Leonarduzzi et al., 1997), entretanto, o seu estado ativado é que determina se o processo inflamatório encontra-se em curso ou não. Através da técnica de imuno-histoquímica, a presença da proteína F4/80 que é expressa e mantida na superfície de macrófagos quando estão em atividade, foi testada. Com o auxílio de anticorpos específicos, marcados com fluorosceína, a emissão de luz em regiões específicas do parênquima hepático caracterizou mais uma vez o estado inflamatório. Os macrófagos se dispuseram ao redor das vesículas lipídicas, como em processo de fagocitose. No grupo que recebeu dieta comercial, não foi encontrado nenhum vacúolo indicando depósito lipídico, nem tampouco células marcadas com o anticorpo em questão.

A elevada expressão de citocinas no parênquima, juntamente com a presença de macrófagos em atividade, levou-nos a investigar o fluxo de citocinas no fígado, pois foi importante entender a origem das citocinas e se sua produção poderia ocorrer no próprio órgão. Para isso, realizou-se através

da técnica de ELISA, a dosagem de uma das principais citocinas pró-inflamatórias, a IL-6, avaliando sua presença na circulação pré- e pós-hepática. Através das vias de acesso hepático como a veia porta e veia cava supra-hepática, coletou-se sangue e, após análise, observamos que um claro gradiente existia entre a circulação portal e a veia cava supra-hepática, em ambos os grupos alimentados com dieta comercial ou rica em gordura. Entretanto, os níveis de IL-6 elevaram-se significativamente mais nos animais tratados com dieta hiperlipídica, sugerindo que tanto sítios extra-hepáticos quanto o próprio fígado estão envolvidos na produção da resposta inflamatória. A ativação local do sistema imune vem sendo estudada em diversas situações, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Tomita et al., 2006). A partir de estudos com camundongos tratados com dietas ricas em gordura, onde a regulação positiva da transcrição da IL-6 foi sustentada como a principal interleucina pró-inflamatória encontrada no fígado desses animais, Wieckowska et al., em 2008, após verificarem a mesma condição em outros modelos experimentais e correlacionarem com resistência sistêmica à insulina, decidiram investigar 56 pacientes obesos e com suspeita de NASH. Parâmetros sanguíneos e biópsias hepáticas foram analisados, e verificou-se que pacientes com NASH possuíam níveis de expressão de IL-6 hepática aumentados em relação aos com esteatose hepática apenas, além disso, correlacionaram positivamente a concentração de IL-6 com achados histológicos de fibrose hepática, e ainda, forte correlação para resistência sistêmica à insulina. Nesse mesmo estudo, a cultura de células de hepatócitos tratados com ácidos graxos saturados expressou níveis elevados de RNAm de IL-6. Esses dados juntamente com os resultados obtidos em nossos experimentos corroboram o achado das altas expressões de citocinas no parênquima hepático, possivelmente secretadas pelos macrófagos em atividade, e corroborando a hipótese que propõem uma origem local para o processo inflamatório.

O papel antiinflamatório da IL-10 e sua regulação perante os demais peptídeos pró-inflamatórios é bem descrito. Entretanto, em 2004, Kim et al. sugeriram pela primeira vez a possibilidade de uma interface entre as citocinas

IL-6 e IL-10 no contexto da resistência à insulina no fígado e no músculo de animais experimentais. O tratamento com preparações purificadas de IL-6 e IL-10 levou a resultados distintos nesses tecidos, de tal forma que a IL-6 interferiu com a sinalização da insulina no fígado e no músculo, enquanto a IL-10 potencializou esta sinalização. Para avaliarmos a real importância e o papel endógeno da proteína IL-10 na patogênese da esteato-hepatite e baseados nas hipóteses levantadas no estudo de Kim et al. (2004), utilizamos duas formas de inibição da atividade da IL-10. O primeiro método foi através de um inibidor da síntese endógena (oligonucleotídeo antisense), que inibe diretamente a tradução da proteína no retículo endoplasmático, e o segundo, um tratamento com o anticorpo anti IL-10, que inativa a proteína já transcrita e circulante.

Após o bloqueio da IL-10 por ambas as formas, diversas alterações foram constatadas. Houve o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias no fígado e também um incremento na resistência periférica à insulina, como demonstra o teste de tolerância à glicose. Em vista da regulação que a IL-10 exerce sobre o processo inflamatório geral, era esperado um aumento nas concentrações das proteínas pró-inflamatórias com ambos os tratamentos inibidores da IL-10, porém, e de forma surpreendente, os animais tratados com antisense ou anticorpo mantiveram-se hiperglicêmicos por mais tempo quando comparados aos seus respectivos grupos controles. A IL-10 é uma potente citocina antiinflamatória, produzida predominantemente pelas células T e B, monócitos e macrófagos, além de desempenhar um papel crucial no sistema imune inato (Fiorentino et al., 1991-A; O'Garra et al., 1990). Essa proteína tem a capacidade de inibir potencialmente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Fiorentino et al., 1991-B). Outros dados (Yoshidome et al., 1999) revelam que o mecanismo desempenhado pela IL-10, o qual é capaz de proteger o fígado de agentes pró-inflamatórios, se deva a sua ação através da supressão do NF- κ B, inibindo dessa forma, sua ação na transcrição de genes de resposta inflamatória. den Boer et al., em 2006, demonstraram que a IL-10 endógena protegeu

camundongos submetidos à dieta hiperlipídica do desenvolvimento da esteatose hepática. De forma complementar aos dados obtidos àquele estudo, nossos dados demonstraram que a ausência da IL-10 prejudicou ainda mais o depósito hepático de gordura, e fez com que a doença progredisse negativamente. Ao avaliarmos as fotomicrografias do parênquima hepático dos animais tratados com anticorpo ou antisense anti-IL-10, ao corarmos as lâminas com a tintura de tricrômico de Masson, observamos uma intensa coloração lilás, indicativa de depósito de fibras de colágeno. As fibras de colágeno são depositadas no órgão como um todo, na tentativa de produzir um reparo tecidual. Entretanto, os nódulos formados são sinais de morte celular, onde a célula fundamental do órgão, o hepatócito, acaba sendo substituído por tecido fibroso. As células esteladas hepáticas são fontes primárias de produção excessiva de matriz extracelular, e sua ativação pelo processo inflamatório pode se tornar crítica nos eventos pró-fibróticos (Nan et al., 2008). Como demonstrado anteriormente, os resultados do teste de tolerância à glicose sugeriram a presença de resistência periférica à ação da insulina, com conseqüente manutenção do estado hiperglicêmico dos animais tratados com os inibidores da IL-10. Entretanto, no trabalho de den Bauer et al., (2006), apesar da concentração endógena de IL-10 ter protegido o animal do desenvolvimento de esteatose hepática, as mesmas concentrações não foram capazes de melhorar a resistência periférica à ação da insulina. Animais *knockout* para o gene da IL-10 (-/-) foram utilizados, e surpreendentemente, tais animais apresentaram um aumento na fosforilação da proteína Akt, uma das mais importantes proteínas envolvidas na via de transdução do sinal da insulina. Além disso, os autores defendem a idéia, baseados em seus resultados, que a sensibilidade à insulina nesses animais apresentou-se favorecida em relação aos animais com linhagem selvagem (+/+). Tais diferenças entre os trabalhos realizados podem ser justificadas baseadas nos modelos experimentais utilizados, uma vez que, em nosso trabalho, a inibição da IL-10 proporcionada pelos tratamentos com ambas as técnicas manteve-se por volta de 80%, enquanto os animais *knockout* não possuem o gene que

transcreve IL-10. Além disso, animais *knockout* podem desenvolver respostas anômalas às regulações imunológicas, características comuns em animais com ablação do gene da IL-10 (Kuhn et al., 1993).

Para a confirmação e compreensão das alterações metabólicas ocorridas no modelo experimental pós-tratamentos, uma vez que a doença hepática apresentou progressão em seu conteúdo lipídico e infiltrado inflamatório, assim como aumento da intolerância à glicose, confirmados pelos testes de GTT, tornou-se necessário avaliar a atividade de proteínas envolvidas em vias de biossíntese energética no nível molecular. Importantes proteínas controladoras da biossíntese de glicídios como a PEPCK e a GSK-3, além das envolvidas na biossíntese e oxidação de lipídios como a ACC, FAS e CPT-1, foram examinadas em relação à sua expressão.

A GSK-3 (Glicogênio Sintase Quinase-3) é uma enzima que inibe a síntese de glicogênio ao catalizar uma fosforilação inibitória da GS (Glicogênio Sintase). Quando a GSK-3 é inativada (p-GSK-3), a conversão de glicose a glicogênio é favorecida (Radziuk et al., 2001). Da mesma forma e com a mesma intenção, verificamos a expressão da proteína PEPCK (Fosfoenolpiruvato-Carboxiquinase), enzima que também favorece a gliconeogênese (Radziuk et al., 2001). Ainda na tentativa de elucidar de diversas formas e com clareza o metabolismo hepático de glícídios, quantificamos através da técnica de RT-PCR, o mRNA da enzima G-6-Pase (glicose-6-fosfatase), que desfosforila a glicose, deixando-a livre novamente, podendo retornar ao meio extracelular (Aiston et al, 2003). A inibição da IL-10 reduziu a fosforilação da proteína GSK-3, mantendo-a ativada e conseqüentemente inibindo a ação da proteína GS. Os tratamentos também induziram o aumento na expressão da PEPCK. Ao ensaio fisiológico, tais respostas moleculares se revelaram compatíveis com o fato de que ocorre redução dos níveis de glicogênio hepático nos animais com inibição da IL-10. Ambos os tratamentos reduziram a síntese de glicogênio hepático, fortalecendo a hipótese de que a ausência ou redução na expressão da IL-10 prejudica os processos de síntese de energia a partir dos carboidratos e

favorece a via glicogênica a partir de outros substratos, que não os açúcares. Dada a importância das proteínas GSK-3 e PEPCCK nos processos de regulação e síntese energética, a presença de obesidade e diabetes influencia negativamente suas ações, prejudicando tais controles metabólicos e alternando as vias de utilização de nutrientes, o que por sua vez pode favorecer rotas lipogênicas (Saltiel et al., 2001).

Os níveis de RNAm que codificam a transcrição da proteína G-6-Pase, não apresentaram diferenças significantes, mantendo-se semelhantes nos grupos tratados e também em seus controles. Embora a G-6-Pase desempenhe importante papel na via gliconeogênica, alguns trabalhos têm demonstrado que sua atividade pode ser regulada pelo estado inflamatório (Yasmineh et al., 1992) e também pelo tratamento direto com o peptídeo da citocina TNF- α (Grempler et al., 2004).

Com a via neoglicogênica ativada e com a síntese de glicogênio inibida, outras vias de controle energético celular no modelo animal, foram avaliadas sob os tratamentos com os inibidores da IL-10. A avaliação do papel representado pelas proteínas-chave envolvidas nos processos lipogênicos revelou-se importante para a compreensão dos eventos moleculares, mediante o colapso energético. A proteína acetil-CoA-carboxilase (ACC) é responsável pela bioconversão de acetil-CoA, proveniente dos processos glicolíticos, em malonil-CoA, substrato intermediário na síntese de lipídios (Locke et al., 2008; Browning et al., 2004). De forma semelhante à GSK-3, quando fosforilada é inativada (p-ACC). Os tratamentos com os inibidores da IL-10 aumentaram a atividade dessa proteína, ou seja, impediram sua fosforilação, mantendo-a ativa. A proteína subsequente envolvida na síntese de lipídios é a enzima ácido graxo sintase (FAS), principal enzima lipogênica, responsável pela conversão de malonil-CoA em ácido graxo. A expressão dessa enzima apresentou-se significativamente elevada, reforçando o conceito de que a síntese endógena de lipídios também estava favorecida. Nossos dados apresentam-se de acordo com os dados obtidos no trabalho desenvolvido por Ito et al., em 2007, onde camundongos submetidos à dieta rica em lípidos como modelo de NASH,

apresentaram também elevados níveis de expressão protéica da ACC e da FAS. Em 2006, Kusunoki et al., descreveram as proteínas ACC e FAS como potenciais alvos terapêuticos para o controle da obesidade e das condições correlatas à síndrome metabólica, entre elas a esteatose hepática. Os dados apresentados no trabalho desenvolvido por Larter et al., em 2008, corroboram o aumento na expressão de ACC e FAS ocorridos em nosso trabalho, entretanto, o modelo experimental utilizado foi à base de dieta deficiente em metionina e colina (MCD). Neste experimento, os autores relatam ainda o surgimento de uma lipotoxicidade, gerada pela concentração excessiva de gordura no parênquima hepático.

A via lipogênica favorecida é condição normal em diversos casos, como por exemplo, no jejum (Kim et al., 1996). Entretanto, em casos de obesidade e resistência à insulina, a via torna-se adaptativamente e patologicamente induzida (Denechaud et al., 2008). A proteína carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) tem um papel determinante no controle do metabolismo de ácidos graxos. Ela é responsável pela translocação dos ácidos graxos produzidos pelas vias de síntese de lipídios para o interior das mitocôndrias, onde seriam devidamente oxidados. Em nosso experimento, os animais tratados com dieta rica em lipídios apresentaram redução na atividade da CPT-1, porém, ao tratarmos os animais com os inibidores da IL-10, houve uma redução ainda maior na expressão da CPT-1. Nas situações de jejum (Kerner et al., 2008) ou em dietas ricas em lipídios (Soh et al., 2008; Bai et al., 2007) a expressão da proteína CPT-1 encontra-se diminuída, de acordo com os trabalhos desenvolvidos em ratos e camundongos respectivamente. Bai et al., (2007), demonstraram em seu estudo uma redução de até 71% na expressão da CPT-1, mediada pelo excessivo consumo calórico. É interessante a comparação entre diferentes modelos experimentais submetidos às dietas ricas em lípidos, pois muitos modelos desenvolvidos em ratos (Kerner et al., 2008; Ryu et al., 2003) corroboram nossos dados, entretanto, experimentos realizados da mesma forma com suínos (Ding et al., 2003) e eqüinos (Geelen et al., 2001), demonstraram mínima alteração na atividade da CPT-1 ou até o aumento em

sua expressão, respectivamente de acordo com tais estudos. Mas tanto em humanos (Foster, 2004) assim como no nosso trabalho, a expressão diminuída da CPT-1 no fígado poderia favorecer o acúmulo local de gordura, criando um colapso metabólico, uma vez que as vias de síntese encontram-se favorecidas e as oxidativas prejudicadas.

Estudos têm demonstrado forte correlação entre NAFLD e resistência à insulina (Utzschneider et al., 2006; Bugianesi et al., 2005). Além disso, com o estado inflamatório hepático agravado e com as vias de biossíntese energética alteradas, demos início às investigações na atividade das proteínas envolvidas na via da insulina. Os grupos tratados com anticorpo ou antisense apresentaram uma redução na atividade do receptor de insulina. Os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), também se apresentaram com atividades reduzidas ($P < 0,05$) nos animais com a IL-10 bloqueada, ao serem provocados com insulina, comparados ao seu controle. A FOXO é uma proteína nuclear, que participa da sinalização final da insulina, sendo exportada do núcleo ao ser inativada pela insulina e encontrada na forma fosforilada no citoplasma celular. Portanto, baixas concentrações dessa proteína fosforilada no citoplasma, indicam pouca ou diminuída propagação do sinal da insulina. Os animais tratados com os inibidores da IL-10 apresentaram significativa redução das quantidades de p-FOXO no citoplasma celular, quando comparadas ao seu controle, indicando prejuízo na propagação do sinal da insulina. De forma interessante, a FOXO quando ainda presente no núcleo, controla a atividade da proteína PEPCK, que demonstrou neste experimento estar mais ativada.

Devido à potente atividade antiinflamatória da IL-10, mecanismos pró-inflamatórios podem ser controlados por essa proteína ou terem o seu tônus de ativação regulado. O bloqueio da IL-10 em nosso experimento impediu esse controle, permitindo a continuidade e até a intensificação dos sinais pró-inflamatórios e a posterior ativação de proteínas serina-quinases, que por sua vez, interferem pontualmente na atividade de algumas proteínas responsáveis pela transdução do sinal da insulina (Tuncman et al., 2006). Proteínas pró-

inflamatórias como o IL-6 e TNF- α , impedem a sinalização ativada pela insulina (Hotamisligil, 2003) por favorecer a fosforilação em serina e não em tirosina de proteínas como o receptor de insulina (IR) (Halle et al., 1998) e seus substratos 1 (Zhang et al., 2008) e 2 (Schattenberg et al., 2005) (IRS1/2). Contudo, den Bauer et al., (2006), não observaram interferência na sinalização da insulina em animais *knockout* para o gene da IL-10. Como discutido anteriormente, animais *knockout* para IL-10 podem desenvolver respostas anômalas às regulações imunológicas (Kuhn et al., 1993), pois quando den Bauer e seus colegas avaliaram a atividade da proteína Akt (p-Akt), encontraram aumento em sua fosforilação, indicando maior atividade desempenhada pelas proteínas da via da insulina, entretanto, essa situação não condiz com nossos achados e tampouco com os encontrados nas literaturas citadas anteriormente. Após os tratamentos com os inibidores da IL-10, a proteína FOXO-1 não apresentou incremento de sua fosforilação, confirmando dessa forma os dados anteriores de prejuízo na via de sinalização da insulina. A FOXO-1 que é uma proteína nuclear e distal dessa cascata, não recebeu sinal para exteriorização nuclear, permanecendo dentro do núcleo. Valenti et al., em 2008, avaliaram a atividade de toda a via energética controlada pela insulina em seu trabalho com 84 pacientes, sendo 26 com NASH, 28 apenas com esteatose, e 16 com hepatite C, além de seus respectivos controles com histologia normal no órgão. Todos os grupos apresentaram alterações na expressão e atividade das proteínas envolvidas em tais vias, dadas as devidas proporções de acordo com as intensidades das afecções. Contudo, Akt e FOXO-1 apresentaram-se menos fosforiladas nos indivíduos acometidos pela esteatohepatite. Em um estudo com cultura celular de hepatócitos, Ruddock et al., (2008) mostraram a mesma notação, entretanto, atribuem o fato ao efeito dos ácidos graxos saturados.

A proteína Akt exerce uma atividade nodal no fluxo intracelular de sinais, conectando diversos vias anteriores e posteriores a ela. Além de controlar a biossíntese energética, por estimular a síntese de glicogênio e impedir a lipólise, a Akt desempenha também importante atividade no controle de sobrevivência celular (Brazil et al., 2001). Baseados nos resultados

encontrados até aqui, a dimensão do desarranjo metabólico nos conduziu para a investigação da capacidade de controle dos processos de sobrevivência celular no fígado. Foram avaliadas proteínas indutoras de apoptose como a Fas-associada ao domínio de morte (FADD), Caspase 8 e Bax, que são importantes marcadores da via de ativação extrínseca da apoptose, assim como o fator de ativação de apoptose-1 (Apaf-1) e Caspase 9 são marcadores da via intrínseca da morte celular, iniciada no interior da mitocôndria. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 também teve sua atividade mensurada. Os grupos de animais tratados com os bloqueadores da IL-10 apresentaram maior associação entre as proteínas FADD/Caspase 8, além de maior expressão da proteína Bax. Da mesma forma, houve associação significativa entre as proteínas Apaf-1/Caspase 9. As associações entre tais proteínas são indicativos de atividade entre as vias de morte celular, provenientes tanto de vias extrínsecas quanto intrínsecas (Lawen, 2003; Kroemer, 2003). A expressão da proteína Bcl-2 também se elevou, numa aparente regulação do tônus entre os sinais de morte e a sobrevivência celular (Yip et al., 2008).

Com a sinalização da insulina prejudicada em pacientes com NASH, a proteína nodal Akt encontra-se inativada e impossibilitada de suprimir sinais pró-apoptóticos. Com a liberação e ativação de proteínas apoptóticas provenientes de vias extrínsecas e intrínsecas, derivadas também de condições pró-inflamatórias devido ao excesso de gordura presente no fígado, juntamente com essa inoperância da proteína Akt, torna-se crítica a recuperação do órgão. Malhi et al., (2008) define essa situação como lipotoxicidade hepática. Com o prejuízo na captação mitocondrial de ácidos graxos presentes em abundância no hepatócito para adequada metabolização e oxidação, gorduras não esterificadas medeiam então esse fenômeno de lipotoxicidade (Yamaguchi et al., 2007). A apoptose é a chave morfológica e patogênica do desenvolvimento de NASH em humanos. No trabalho de Piro et al., (2008), desenvolvido com humanos, foram encontrados índices semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, em relação aos sistemas de ativação apoptótica e à sua intensidade. No trabalho de Malhi et al., (2008),

uma das importantes atribuições para a ativação das vias apoptóticas foi devido ao tipo de ácido graxo consumida. Ácidos graxos saturados, como a maioria dos encontrados na dieta oferecida aos nossos animais experimentais, podem induzir apoptose de diversos tipos celulares. Ácido palmítico induz apoptose em células β -pancreáticas, cardiomiócitos, em células do endotélio vascular e também em hepatócitos. Quando estudados em modelos reducionistas, tanto as gorduras monoinsaturadas quanto as polinsaturadas podem induzir à ativação dos mecanismos apoptóticos, porém esse efeito é bastante discreto quando comparado à potência dos ácidos graxos saturados.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[6 – CONCLUSÃO]

No modelo animal de esteato-hepatite induzida por dieta avaliado nesse estudo, observou-se a indução da expressão da IL-10 em paralelo à expressão de várias citocinas inflamatórias. A inibição da IL-10 por dois métodos distintos promoveu um aumento da expressão das citocinas inflamatórias no fígado o que foi acompanhado de uma piora do quadro de resistência à insulina nesse órgão, de acordo com resultados da avaliação da transdução do sinal desse hormônio e de uma série de parâmetros metabólicos e moleculares. Dessa forma, conclui-se que a IL-10 endógena atua como um fator de proteção contra o dano e a disfunção hepática induzidos pelo consumo de uma dieta rica em ácidos graxos.

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS

Dennys Esper Corrêa Cintra

[7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS]

Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; 97:1444–49.

Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100:10207-12.

Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KAH, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science.* 2001; 291:2613-16.

Aiston S, Andersen B, Agius L. Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase. *Diabetes.* 2003; 52(6):1333-9.

Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1084: 89-117.

An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI et al. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole animal insulin resistance. *Nat Med.* 2004; 10:268-74.

Andem MR, Stump CS, Sowers JR. Introduction: organ involvement in the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr.* 2006; 1(1):16-24.

Angulo P. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutr Rev.* 2007; 65(6): S57-S63.

Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1221-31.

Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology.* 2007; 148(12):5991-7.

Araujo, EP; Amaral, ME; Filiputi, E.; De Souza, CT; Laurito, TL; Augusto, VD; Saad, MJ; Boschero, AC; Carneiro, EM. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol.* 2004 181(1):25-38.

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 (Lond)*. 2004; 106:635-643.

Bakos G. Spectrophotometric evaluation of protein-determination by the biuret method. *Orv Hetil*. 1964 7;105:1077-9.

Bai XP, Li HL, Yang WY, Xiao JZ, Wang B, Du RQ, et al. The mechanism of and relationship between lipid metabolism genes expression and insulin resistance in high fat-fed mice. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2007; 46(9):751-4

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res*. 2004; 59: 305-31.

Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 4747-55.

Brazil DP, Hemmings BA, Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26:657-64.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89:331-40.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004; 114(2):147-52.

Brunt EM Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*. 2001; 21(1):3-16.

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

Caldwell SH, Chang CY, Nakamoto RK, Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2004; 8:595-617.

Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 1999; 31:430-40.

Calle, E. E. & Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Rev. Cancer*. 2004; 4, 579–91.

Campbell PJ, Mandarino LJ, Gerich JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1988;37:15-21.

Carvalho JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol. Chem.* 2003; 384:151-9.

Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.* 2001; 500(3):119-24.

Caraceni P, Bionchi C, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G, et al. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation reperfusion injury. *J Hepatol.* 2004; 41:82-8.

Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2:1048-58.

Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 2000; 106:1221-28.

Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem.* 1999; 274:5692-700.

Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The Prevalence and Etiology of Elevated Aminotransferase Levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003; 95(5):960-7.

Clarke SD. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281:G865-69.

Coutinho JG, Gentil PC, Toral N. Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda. *Cad Saude Publica*. 2008; 24(Suppl 2):S332-40.

De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia*. 2005; 48(9):1860-71.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14: 193-209.

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008; 582(1):68-73.

den Boer MA, Voshol PJ, Schröder-van der Elst JP, Korshennikova E, Ouwens DM, Kuipers F, et al. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology*. 2006; 147(10):4553-8.

Dianzani MU, Scuro S. The effects of some inhibitors of oxidative phosphorylation on the morphology and enzymatic activities of mitochondria. *Biochem J*. 1956; 61:205-15.

Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Sem Liver Dis* 1999; 19:221-229.

Ding ST, Lapillonne A, Heird WC, Mersmann HJ. Dietary fat has minimal effects on fatty acid metabolism transcript concentrations in pigs. *J Anim Sci*. 2003; 81(2):423-31.

Dubois, B., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, v.28, p. 350-6, 1956.

Edvardsson U, Bergström M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllöf B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J. Lipid. Res*. 1999; 40:1177-84.

El-Zayadi AR. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(26):4120-6.

Elobeid MA, Allison DB. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008; 15(5):403-8.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11:81-128.

Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Van der Hoorn S, Murray CJL and the Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet.* 2002; 360:1347-1360.

Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Lu YS, Li F, et al. Fatty Liver and the Metabolic Syndrome among Shanghai Adults. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20:1825-32.

Fan C-Y, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem.* 1998; 273:15639-45.

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:5495-503.

Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125(2):437-43.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991; 146:3444-51-A

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991; 147:3815-22-B

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.

Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1033:1-16.

Fouin-Fortunet H, Le Quernec L, Erlinger S, Lerebours E, Colin R. Hepatic alterations during total parenteral nutrition in patients with inflammatory bowel disease: a possible consequence of lithocholate toxicity. *Gastroenterology*. 1982; 82(5 Pt 1):932-7.

Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003; 278:34268-76.

Geelen SN, Blázquez C, Geelen MJ, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Beynen AC. High fat intake lowers hepatic fatty acid synthesis and raises fatty acid oxidation in aerobic muscle in Shetland ponies. *Br J Nutr*. 2001; 86(1):31-6.

George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2003; 39:756-64.

Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 1995; 15(1):70-81.

Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol. Behav*. 2008; 94(2): 206-18.

Grempler R, Kienitz A, Werner T, Meyer M, Barthel A, Ailet F, et al. Tumour necrosis factor alpha decreases glucose-6-phosphatase gene expression by activation of nuclear factor kappaB. *Biochem J*. 2004; 382:471-9.

Gupta S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Experimental Gerontology*. 2002; 37: 293-299.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995. 269:543-6.

Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J. Importance of TNF-alpha and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc Immunol Rev*. 1998;4:77-94.

Hashem RM, Mahmoud MF, El-Moselhy MA, Soliman HM. Interleukin-10 to tumor necrosis factor-alpha ratio is a predictive biomarker in nonalcoholic fatty liver disease: interleukin-10 to tumor necrosis factor-alpha ratio in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 20(10):995-1001.

Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ETH. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest.* 1997; 99:1751-8.

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

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.

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

Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W et al. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1997; 272:28191-3.

Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101(19):7281-6

Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor (beta)1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 1997; 25:1516-26.

Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res.* 2007; 37(1):50-7.

Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 15:539-43.

Kahn CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 1978;27:1893-1902.

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science.* 1982; 215: 185-7.

Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription. Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by Amp-activated protein kinase. *J. Biol Chem.* 2002; 277:3829-35.

Kerner J, Parland WK, Minkler PE, Hoppel CL. Rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I, hepatic carnitine, and malonyl-CoA: effect of starvation. *Arch Physiol Biochem.* 2008; 114(3):161-70.

Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes.* 2004; 53(4):1060-7.

Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP-1 activates PPAR gamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:4333-37.

Kim TS, Freake HC. High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. *J Nutr.* 1996; 126(3):611-7.

Koo SH, Dutcher AK, Towle HC. Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem.* 2001; 276:9437-45.

Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci.* 2004; 34:57-62.

Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(1):89-104.

Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304(3):433-5.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75:263–74.

Kusminski, C. M., McTernan, P. G. & Kumar, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin. Sci.* 2005; 109, 243–56.

Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine.* 2006; 29(1):91-100.

La Cava, A. & Matarese, G. The weight of leptin in immunity. *Nature Rev. Immunol.* 2004; 4, 371–9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acteriphage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284:E863-73.

Lancaster JR Jr, Laster SM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett.* 1989; 248:169-74.

Larter CZ, Yeh MM, Haigh WG, Williams J, Brown S, Bell-Anderson KS, Hepatic free fatty acids accumulate in experimental steatohepatitis: role of adaptive pathways. *J Hepatol.* 2008 Apr;48(4):638-47.

Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 2003; 25(9):888-96.

Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2000; 105:1067-75.

Leclercq IA, Lebrun VA, Stärkel P, Horsmans YJ. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest.* 2007; 87(1):56-65.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *Journal Biological Chemistry.* 2003; 278: 2896-2902.

Lee WS, Sokol RJ. Liver disease in mitochondrial disorders. *Semin Liver Dis.* 2007; 27(3):259-73.

Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor (beta)1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J.* 1997; 11:851-7.

Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, Seeff LB, Zimmerman HJ. Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology.* 1989; 9(5):679-85.

Lieber CS. CYP2E1 from ASH to NASH. *Hepatol Res.* 2004; 28:1-11.

Lin CC, Yin MC, Liu WH. Alleviative effects of s-allyl cysteine and s-ethyl cysteine on MCD diet-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(11):3401-6.

Liu X, Lazenby AJ, Clements RH, Jhala N, Abrams GA. Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes Surg.* 2007; 17(4):486-92.

Locke GA, Cheng D, Witmer MR, Tamura JK, Haque T, Carney RF, Rendina AR, Marcinkeviciene J. Differential activation of recombinant human acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 by citrate. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Jul 1;475(1):72-9.

Louis H, Le Moine A, Quertinmont E, Peny MO, Geerts A, Goldman M, et al. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology.* 2000; 31(2):381-90. Erratum in: *Hepatology* 2001; 33(5):1343.

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

MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signaling.* 2002; 14: 477-492.

Mannino, D. M. et al. Boys with high body masses have an increased risk of developing asthma: findings from the National Longitudinal Survey of Youth (NLSY). *Int. J. Obesity.* 2006; 30, 6–13.

McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest.* 1977; 60:265-70.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001; 50:1844-50.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999; 107(5):450-5

Martin RJ. In vivo lipogenesis, and enzyme levels in adipose tissue and liver tissues from pair-fed genetically obese and lean rats. *Life Sci.* 1974; 14:1447-53.

Martínez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J. Physiol Biochem.* 2006; 62(4): 303-6.

Matsusue, K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavriloova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* 2003; 111:737-47.

McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(Suppl-1):S17-29.

Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. Fatty acid synthesis in obese insulin resistant diabetic mice. *Horm. Metab. Res.* 1994; 26:85-7.

Mittendorfer B, Jeschke MG, Wolf SE, Sidossis LS. Nutritional hepatic steatosis and mortality after burn injury in rats. *Clin Nutr.* 1998; 17(6):293-9.

Morgan K, Uyuni A, Nandgiri G, Mao L, Castaneda L, Kathirvel E, et al. Altered expression of transcription factors and genes regulating lipogenesis in liver and adipose tissue of mice with high fat diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 20(9):843-54.

Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, et al. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg.* 2004; 14:635-7.

Muoio DM, Newgard CB. Biomedicine. Insulin resistance takes a trip through the ER. *Science.* 2004; 306(5695):457-61.

Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol.* 2008; 20. (In Press) DOI 10.1002/jat.1393

Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 1999; 282:1523-9.

Nagaki M, Tanaka M, Sugiyama A, Ohnishi H, Moriwaki H. Interleukin-10 inhibits hepatic injury and tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA expression induced by staphylococcal enterotoxin B or lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *J Hepatol.* 1999; 31(5):815-24.

Nan YM, Fu N, Wu WJ, Liang BL, Wang RQ, Zhao SX, et al. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 2008; 8:1-8.

Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology.* 2000; 118(4):655-60.

Nishikawa S, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. The effect of fasting on hepatic lipid accumulation and transcriptional regulation of lipid metabolism differs between C57BL/6J and BALB/cA mice fed a high-fat diet. *Toxicol Pathol.* 2008;3 6(6):850-7.

O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol.* 1990; 2:821-32

Oien KA, Moffat D, Curry GW, Dickson J, Habeshaw T, Mills PR, MacSween RN. Cirrhosis with steatohepatitis after adjuvant tamoxifen. *Lancet.* 1999; 353(9146):36-7.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306:457-461.

Perez-Carreras M, Hoyo PD, Martin MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003; 38:999-1007.

Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 282(2):G193-9.

Piro S, Spadaro L, Russello M, Spampinato D, Oliveri CE, Vasquez E, et al. Molecular determinants of insulin resistance, cell apoptosis and lipid accumulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18(8):545-52.

Pitombo C, Araújo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol.* 2006; 191(3):699-706.

Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: the role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000; 21:49-98.

Puerta LDM, Esteban CV, Hernández BFJ, Guerrero GL, Molinero RMA, Larrauri J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, the enigma of bad progression. *An Med Interna*. 2005; 22(2):85-7.

Radziuk J, Pye S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001; 17(4):250-72.

Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:1067-75.

Rashid A, Wu TC, Huang GC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, et al. Mitochondrial protein that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology*. 1999; 29:1131-1138.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51.

Ryu MH, Cha YS. The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36(3):312-8.

Ruddock MW, Stein A, Landaker E, Park J, Cooksey RC, McClain D, et al. Saturated Fatty Acids Inhibit Hepatic Insulin Action by Modulating Insulin Receptor Expression and Post-receptor Signalling. *J Biochem*. 2008; 144(5):599-607

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414: 799-806.

Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology*. 1996; 111(3):736-44.

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

Sastre J, Pallardo FV, Llopis J, Furukawa T, Vina JR, Vina J. Glutathione depletion by hyperphagia-induced obesity. *Life Sci*. 1989;45:183-7.

Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280(11):9887-94.

Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:3023-28.

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; 99:846-854.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999; 96:13656-61.

Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* 1998; 273:35299-306.

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:30028-30032

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *International Journal of Obesity.* 2003; 27 Suppl 3: S49-52.

Soh JR, Shin DH, Kwon DY, Cha YS. Effect of Cheonggukjang supplementation upon hepatic acyl-CoA synthase, carnitine palmitoyltransferase I, acyl-CoA oxidase and uncoupling protein 2 mRNA levels in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *Genes Nutr.* 2008; 2(4):365-9.

Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med.* 1998; 338:1-7.

Stoekman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem.* 2002; 277:27029-35.

Susca M, Grassi A, Zauli D, Volta U, Lenzi M, Marchesini Get al. Liver inflammatory cells, apoptosis, regeneration and stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis.* 2001; 33(9):768-77.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature.* 2006; (6):772-83.

Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut.* 2006; 55(3):415-24.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994; 79:1147-56.

Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA 2003 Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E216-23.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(9):4350-4.

Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006; 103(28):10741-6.

Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(12): 4753-61.

Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes.* 2008; 57(5):1355-62.

Verdier F, Fourcade L. Changes in cardiovascular risk factors in developing countries. *Med Trop (Mars).* 2007; 67(6):552-8.

Videla LA, Rodrigo R, Orelland M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidation stress-related parameters in the liver of nonalcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci*. 2004; 106:261-68.

Wahren J, Sato Y, Ostman, J, Hagenfeldt L, Felig P. Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-independent diabetics at rest and in response to exercise. *J. Clin. Invest*. 1984; 73:1367-76.

Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos*. 1999; 27:695-700.

Weisberg, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest*. 2006; 116, 115-24.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest*. 2005; 115, 1111-9.

Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-33.

Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103(6):1380-2.

World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. WHO: Geneva, 1997.

Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan YJ. The transition from fatty liver to NASH associates with SREBP-1 depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci*. 2008; 53(10):2761-74.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest*. 2005; 115: 951-8.

Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice. *J Biol Chem*. 2002; 277:19353-57.

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007; 45(6):1366-74.

Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98:9116-21.

Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 378:259-68.

Yasmineh WG, Theologides A. Effect of tumor necrosis factor on enzymes of gluconeogenesis in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 199:97-103.

Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008; 27(50):6398-406.

Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology*. 1999; 30(1):203-8.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Matsushima K, Leonard EJ, Appella E. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; 84:9233-7.

Zatloukal K, Bock G, Rainer I, Denk H, Weber K. High molecular weight components are main constituents of Mallory bodies isolated with fluorescence activated cell sorter. *Lab Invest*. 1991; 64:200-6.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser270 to promote insulin resistance in response to TNF-alpha signaling through IKK2. *J Biol Chem*. 2008. In Press. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M806480200>.