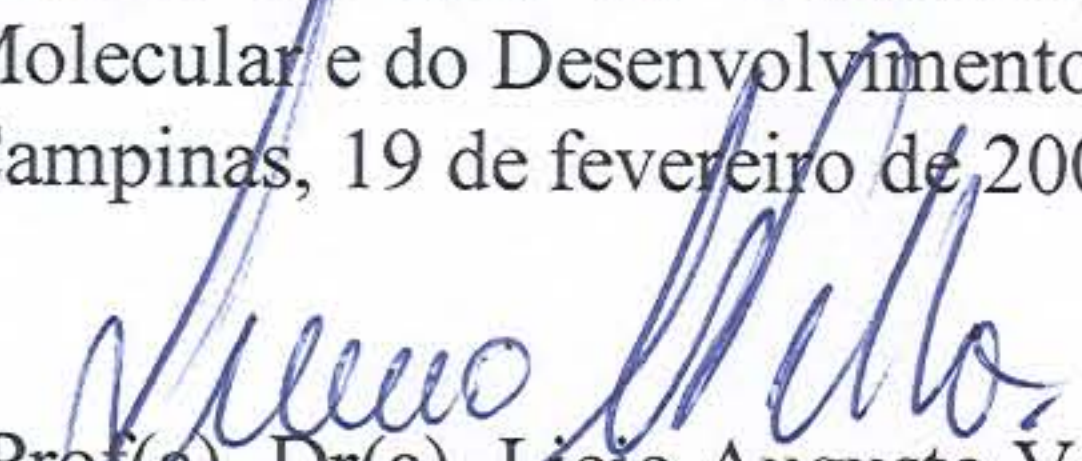


JOSEANE MORARI

Este exemplar corresponde à versão final da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica na área de concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento do(a) aluno(a) **Joseane Morari**.
Campinas, 19 de fevereiro de 2009.


Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso
Orientador(a)

**A PROTEÍNA PGC-1 α MODULA A EXPRESSÃO DE
INTERLEUCINA-10 NO FÍGADO –
AVALIAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM OS FATORES
DE TRANSCRIÇÃO NF κ B E C-MAF**

CAMPINAS

Unicamp

2009

JOSEANE MORARI

**A PROTEÍNA PGC-1 α MODULA A EXPRESSÃO DE
INTERLEUCINA-10 NO FÍGADO –
AVALIAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM OS FATORES
DE TRANSCRIÇÃO NF κ B E C-MAF**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica

Orientador: Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

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

M796p Morari, Joseane
A proteína PGC-1 α modula a expressão de interleucina-10 no
fígado - avaliação da sua interação com os fatores de transcrição *NF κ B*
e c-Maf / Joseane Morari. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Lício Augusto Velloso
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inteleucina. 2. Fígado. 3. Fatores de transcrição. I. Velloso, Lício
Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: PGC-1 α modulates interleukin-10 in the liver – interaction with the
transcription factors NF κ B and c-Maf**

Keywords: • Interleukin
• Liver
• Transcription factors

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Prof. Dr. Fernando Ganzarolli

Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

Data da defesa: 19-02-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Joseane Morari

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Membros:

1. Prof. Dr. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira

2. Prof. Dr. Fernando Ganzarolli de Oliveira

3. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

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

Data: 19/02/2009

...e quando criança eu me imaginava cientista, sem ao certo saber o que era ser cientista e o porquê de ser cientista...

Aos poucos fui descobrindo a razão. Há quem diga “sonhadora demais”, “inocente demais”, “pretenciosa”. Enfim, a razão que encontrei para querer ser cientista foi algo que nem eu mesmo sei explicar direito, mas que sinto a cada dia: tentar salvar vidas, procurar a cura ou amenizar o sofrimento de alguém, fazer algo que possa trazer algum benefício para a sociedade, para quem realmente precisa.

Dedico esta tese a todos aqueles que um dia poderão ser ajudados com este trabalho, mesmo que de forma singela, e também àqueles que partilham da mesma “inocência” que eu.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, que me deu o dom da vida, oportunidade única!

Aos meus pais. Certamente, foi o esforço de vocês que me proporcionou tudo o que tenho hoje, tudo que me motivou a chegar até aqui. Obrigada! Espero algum dia, poder retribuir.

Ao meu grande amigo Romildo. Você foi aquele que mais me motivou a lutar pelos meus sonhos, me ajudando a chegar até aqui. Nunca me esquecerei de você. Obrigada!

Ao Aglecio, por me encorajar a lutar pelos meus sonhos, acreditar em mim! Eu sei que, à sua maneira, você sempre esteve ao meu lado e fez o seu melhor! Obrigada pela lealdade!

A uma pessoa especial, que de tão especial, passou muito rápido por este mundo. Ricardo tenha certeza que nunca me esquecerei da sua “reciprocidade”. E por isso sei que estará de alguma maneira, sempre ao nosso lado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, por proporcionar a mim e a muitos outros alunos, a oportunidade de colocar em prática nossos sonhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela oportunidade que oferecem a alunos que como eu, realmente precisam de ajuda financeira para se dedicar ao Mestrado, além de verbas que possibilitaram que este trabalho e muitos outros fossem desenvolvidos em nosso laboratório.

Aos animais, meu respeito! Grandes “colaboradores” deste trabalho.

À minha prima Elaine (Cris), que me deu a oportunidade de adentrar pela primeira vez em um laboratório de pesquisa, o que me fez perceber realmente que era isso que eu queria!

À Prof Dra. Laura Sterian Ward, que me iniciou na carreira científica, me dando a oportunidade de ir a congressos, cursos, apresentações. Enfim, por ter contribuído tanto para minha carreira profissional e ter acreditado, junto comigo, em meu sonho.

Ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso. Seu profissionalismo, entendimento, respeito, ética juntamente com seu modo de tratar as pessoas, sem distinção, é um exemplo que tento seguir. Obrigada por ter me concedido a honra de ocupar um lugar em seu laboratório, por confiar em meu trabalho, me julgando capaz de realizar coisas que eu sempre sonhei. Obrigada pelas oportunidades de aprendizagem e crescimento acadêmico que me proporcionou, e que ainda irá me proporcionar. Serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr. Mário Jose Abdala Saad, pelo respeito e pela gentileza de ceder espaço em seu laboratório para que eu iniciasse meus trabalhos.

Ao laboratório GEMOCA, obrigada pela grande colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. Às meninas - Aline; Elaine; Helen; Jana; Kika; Marjory; Natássia; Vivi - pelos momentos de discussões científicas e descontração. Agradeço especialmente à Fabiana Granja, que me ensinou técnicas laboratoriais que me proporcionaram grande crescimento acadêmico.

À Adriana Torsoni, por me ensinar boa parte das técnicas desenvolvidas neste trabalho e por estar sempre pronta, a qualquer momento, a me ajudar. Obrigada pela amizade.

Ao Marcus Corat, que desde a iniciação científica esteve presente, me ensinando MUITAS coisas, inclusive me ajudando na busca da região promotora do gene alvo deste trabalho. Não poderia deixar de agradecer também pela amizade e pelas risadas.

Ao Gabriel Anhê, por me ensinar a técnica de imunoprecipitação de cromatina, além de muitas outras coisas. É impressionante, mas a cada vez que conversamos, aprendo algo. Parabéns pelas suas conquistas, você realmente merece.

À “queridona” Érika Anne. Obrigada pela ajuda intensa nos meus experimentos e também por cuidar, com muita competência, do nosso laboratório. Sua delicadeza e cuidado com as pessoas é um exemplo a ser seguido.

À Juliana, pelo carinho, atenção e força nos momentos que eu mais precisava. As discussões sobre o PGC-1 α ser ou não ser um repressor foram únicas e me deixavam motivada a fazer meu trabalho. Aprendi muito com você... Então, vamos Jú, vamos seguir em frente!

Ao Dennys, que sempre me disse que não estava ajudando em nada! Saiba que o brilho em seus olhos por fazer pesquisa, ser cientista, me faz acreditar que estamos no caminho certo. E isso, pra mim, é mais que suficiente. Muito obrigada por participar do desenvolvimento deste trabalho, além de me proporcionar momentos de discussão em que surgiram muitas idéias (idéias boas) que puderam ser aplicadas neste trabalho.

Ao Fernando Ganzarolli, pelo grande apoio que me deu. Pelo incentivo constante, por estar sempre interessado em saber como “andava” o trabalho. Obrigada por sempre ter ou procurar uma explicação para aquilo que eu perguntava. Admiro sua paciência, ética e dedicação à pesquisa.

À Marciane, por ter me auxiliado na etapa inicial deste trabalho com a diluição (nada fácil) dos ácidos graxos. Muito obrigada.

À Carina, pelo grande auxílio que me deu, seja nos PCR's, nos géis, nas extrações de DNA e RNA. Enfim, pela troca de experiências. Espero que você conquiste tudo o que deseja.

À Miriam, pela ajuda constante no trabalho, coletando amostras nas cirurgias. Obrigada pela nova amizade.

Aos colegas do laboratório, Alessandra, Ana Paula, Andressa, Carla, Cafu, Daniela, Eduardo, Eliana, Gabriela, Gabriela (química), Gabriel (dentista), Giovanna, Guilherme, Íkaro, Josenilson, Livia, Marilia (Marilhão), Raphaël, Simone, Sylka, Talita, pelo carinho, paciência e participação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Gerson, pelo cuidado e estima que tem pelo laboratório e pelos alunos.

Ao Márcio, pelo carinho que tem pelos animais, cuidando deles com tanta estima. Obrigada pelo excelente trabalho que você faz, e bem vindo ao nosso grupo.

Ao Sr. Luiz, Sr. Jósimo e à Dioze pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

Insuficiência hepática causada por cirrose decorrente da progressão da esteato-hepatite não alcoólica é hoje uma das principais indicações para transplante hepático no mundo. A ingestão de dietas ricas em lípidos é uma das principais causas de esteato-hepatite não alcoólica, e, uma vez estabelecida, poderá ou não evoluir para cirrose, dependendo da ativação de uma resposta inflamatória local. Nem todos os indivíduos que desenvolvem esteatose progridem para a esteato-hepatite. Acredita-se que, dentre os fatores que desempenham papel protetor na progressão para a esteato-hepatite e, por conseguinte, para a cirrose, encontra-se o equilíbrio entre a expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no fígado. Níveis locais elevados da citocina anti-inflamatória IL-10 reduzem a resistência hepática à insulina e diminuem o risco de desenvolvimento de esteato-hepatite. Em estudos recentes observamos que a inibição da atividade da IL-10 em um modelo animal de esteato-hepatite induzida por dieta contribui para a piora da disfunção hepática. Por outro lado, a redução da expressão do co-ativador de transcrição gênica PGC-1 α reverte a esteatose hepática induzida por dieta. Tal reversão é acompanhada pela modulação da expressão de IL-10 e de seu receptor, IL-10R. No presente estudo avaliamos se o PGC-1 α interage com dois fatores de transcrição que participam do controle da expressão de IL-10, c-Maf e NF κ Bp50. Para tal utilizamos as técnicas de imunoblot, imunoprecipitação, imunocitoquímica, histologia convencional e imunoprecipitação de cromatina. Os nossos resultados revelam que o PGC-1 α se associa a ambos, c-Maf e p50, após estímulo por ácidos graxos saturados e insaturados. Tal associação ocorre em paralelo ao aumento da expressão de IL-10 e se acompanha da migração de todas as três proteínas de uma localização preferencialmente citosólica para o interior do núcleo de hepatócitos. Além disso, sob estímulo por ácidos graxos, as três proteínas se ligam ao DNA do promotor do gene da IL-10, numa região localizada entre as bases -493 e -254, antes do códon iniciador do gene. Pelo menos a associação de PGC-1 α com p-50 e a indução da expressão de IL-10 por ácidos graxos pode ser inibida pela pré-exposição de hepatócitos ao ácido acetil salicílico, um inibidor da enzima ativadora do NF κ B. Portanto, PGC-1 α interage com dois fatores de transcrição e com o DNA da região promotora do gene da IL-10 e emerge como potencial regulador da expressão de IL-10 no fígado.

Interleukin-10 (IL-10) is an endogenous factor that restrains hepatic insulin resistance in diet-induced steatosis. Reducing IL-10 expression increases pro-inflammatory activity in the steatotic liver and worsens insulin resistance. Because in diet-induced steatosis the transcriptional co-activator PGC-1 α plays a central role in the dysfunctional hepatocytic activity, we hypothesized that at least part of PGC-1 α activity could be mediated by its effect on the transcriptional control of IL-10 expression. Here, we used immunoblot, real-time PCR, immunocytochemistry and ChIP assay to investigate the role of PGC-1 α in the control of IL-10 expression in hepatic cells. First, we show that in the intact steatotic liver, the expressions of IL-10 and PGC-1 α are increased. Inhibiting PGC-1 α expression by antisense oligonucleotide increases IL-10 expression and reduces the steatotic phenotype. In cultured hepatocytes the treatment with saturated and unsaturated fatty acids, increase IL-10 expression. This is accompanied by increased association of PGC-1 α with c-Maf and p50-NF κ B, two transcription factors known to modulate IL-10 expression. In addition, following fatty acid treatment PGC-1 α , c-Maf and p50- NF κ B migrate from the cytosol to the nuclei of hepatocytes and bind to the IL-10 promoter region. Inhibiting NF κ B activation with salicylate reduces IL-10 expression and PGC-1 α association with p50-NF κ B. Thus, PGC-1 α emerges as a potential transcriptional regulator of the inflammatory phenomenon taking place in the steatotic liver.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN-93G	American Institute of Nutrition-93G
AP-1	Proteína ativadora 1
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
c-Maf	v-Maf - Fibrosarcoma Musculoaponeurótico Oncogene homólogo à gripe
c-Rel	Fator de transcrição pertencente à família Rel/NFκB
DMEM	Meio de cultivo celular Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F4/80	Glicoproteína expressa por macrófagos
GAPD	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IKBα	Inibidor alfa do fator nuclear <i>kappa</i> B
IKK	Inibidor do fator nuclear <i>kappa</i> B
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor da interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
JNK	Quinase N-terminal c-jun
kDa	Quilodalton
mRNA	RNA mensageiro
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB1	Fator nuclear <i>kappa</i> B, subunidade p105
NFκB2	Fator nuclear <i>kappa</i> B, subunidade p49/p100
NFκB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NFκBp50	Fator nuclear <i>kappa</i> B, subunidade p50
PBS 1X	Tampão fosfato salino 1X
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC-1α	Co-ativador 1 alfa do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
qPCR	PCR quantitativo
Rel - A	Fator de transcrição pertencente à família Rel/NFκB; conhecida como p65
Rel - B	Fator de transcrição pertencente à família Rel/NFκB
REL	Fator de transcrição membro da família Rel/NFκB

RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TATABOX	Um dos principais promotores eucarióticos. Encontra-se a 5' do ponto de início da transcrição da grande maioria dos genes
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>heper</i> 2
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano

	Pág.
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	23
2.1- Objetivos gerais	24
2.2- Objetivos específicos	24
3- MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1- Caracterização do Modelo	26
3.1.1- Animais Experimentais.....	26
3.2- Preparo da dose de anticorpo anti IL-10	27
3.3- Construção de Oligonucleotídeos (sense e antisense) PGC-1α	27
3.4- Histologia	28
3.4.1- Hematoxilina e Eosina.....	28
3.4.2- Imunocitoquímica.....	28
3.5- Cultura primária de Hepatócitos de Rato	29
3.5.1- Isolamento.....	29
3.5.2- Cultura.....	30
3.6- Imunoprecipitação e Western Blot	31
3.6.1- Extração dos Tecidos.....	31
3.6.2- Imunoprecipitação de Proteínas.....	32
3.6.3- Western Blot.....	32

3.7- Extração de RNA.....	33
3.8- PCR quantitativo (qPCR) - Real Time PCR.....	33
3.8.1- Validação da eficiência dos genes de interesse.....	34
3.9- Imunoprecipitação de cromatina - ChIP Assay.....	36
3.10- Análise Estatística.....	40
4- CAPÍTULO 1 - ARTIGO.....	41
5- DISCUSSÃO GERAL.....	68
6- CONCLUSÃO.....	73
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8- ANEXO.....	81

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo¹. A população dos Estados Unidos possui hoje mais de 30% de pessoas obesas² e no Brasil, estudos feitos até o ano de 1997 mostravam que 12,5% das mulheres e 7% dos homens eram obesos³. Projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS) para ano de 2025 indicam que o número de obesos nos Estados Unidos será maior que 50% e no Brasil maior que 25%⁴. Modificações do padrão sócio-econômico que refletem em mudanças no hábito alimentar, aliados a mudanças na composição dos alimentos⁵, que apresentam hoje uma alta porcentagem de gordura saturada⁶, e ao estilo de vida sedentário, têm um papel importante no desenvolvimento da obesidade⁵.

O que torna a obesidade uma doença tão preocupante, colocando-a como um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, é o fato de que ela pode acarretar outras condições patológicas, como o diabetes melittus do tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose, esteato-hepatite, cirrose) dentre outras⁷.

Na obesidade observa-se uma inflamação sistêmica subclínica, que, entretanto, não se apresenta com alguns dos clássicos sinais de inflamação, como calor e rubor. Essa inflamação é caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral, ou TNF α (TNF α). TNF α tem a capacidade de induzir inflamação por ativar as serina-quinases JNK e IKK as quais levam à ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF κ B, respectivamente⁸. Estes, por sua vez, migram até o núcleo a fim de participarem do controle da transcrição de uma série de genes de reposta inflamatória, dentre eles algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-6, IL-1 β , IL-8, e também de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10⁹.

As serina-quinases JNK e IKK, uma vez ativas, catalisam a fosforilação em serina de importantes substratos de vias de sinalização metabólicas, como a via da insulina^{10 11}. Nesse caso, há substancial perda da eficiência da transdução do sinal, levando ao fenômeno clínico e molecular denominado resistência à insulina¹².

A resistência à insulina no fígado faz com que haja uma inibição da β -oxidação dos ácidos graxos e redução da exportação de lipídios, levando ao acúmulo de triglicérides pelos hepatócitos, ou seja, favorecendo o desenvolvimento de esteatose hepática¹³.

Se o quadro inflamatório e de resistência à insulina se perpetuar, ocorrerá a progressão para esteato-hepatite, podendo ainda evoluir para cirrose. Atualmente, uma das mais importantes causas de transplante hepático no mundo é a cirrose hepática induzida por distúrbios alimentares e metabólicos ¹⁴.

A esteatose hepática e a esteato-hepatite são extremamente prevalentes em indivíduos obesos ¹⁵. A esteato-hepatite não alcoólica (*non-alcoholic steatohepatitis* – NASH) faz parte de um espectro de doenças não alcoólicas que levam ao acúmulo de gordura no fígado (*non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD), sendo caracterizada por esteatose, inflamação hepática e lesão das células do fígado ¹⁶. A perpetuação da inflamação e a lesão irreversível das células do fígado parecem ser os principais eventos que discriminam a esteato-hepatite não alcoólica da esteatose e de outras formas de NAFLD ¹⁴.

Atualmente, há intensa investigação a respeito das causas que determinam a progressão do simples estado de esteatose hepática, ainda reversível, para o quadro de esteato-hepatite e cirrose, irreversíveis. É interessante ressaltar que não são todos os indivíduos com esteatose que desenvolvem a cirrose hepática. Acredita-se que um dos fatores potencialmente envolvidos na progressão do quadro de esteatose à cirrose, além da resistência à insulina, é o equilíbrio na expressão hepática de fatores pró- e anti-inflamatórios.

A interleucina – 10 (IL-10) é uma potente citocina anti-inflamatória. Ela pode ser produzida por células T, células B, monócitos e macrófagos, e apresenta um papel fundamental na regulação do sistema imune inato ^{17, 18}. A IL-10 tem a propriedade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α e IL-6 ^{18, 19}. Estudos recentes mostram uma correlação positiva entre níveis de IL-10 e sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis ²⁰. Tal efeito foi avaliado em um modelo experimental no qual demonstrou-se que a administração de IL-10 preveniu os efeitos da IL-6 sobre a ação da insulina hepática e sobre a atividade sinalizadora que esta exerce ²¹. Em outro estudo ²² demonstrou-se que a produção basal de IL-10 protege contra a esteatose hepática em animais tratados com dieta hiperlipídica.

Em um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo observou-se que em um modelo animal de esteato-hepatite induzida por dieta há aumento da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias no fígado, o que é acompanhado de um aumento paralelo da expressão da IL-10. Ainda neste trabalho, a inibição da ação da IL-10 por dois métodos distintos promoveu um aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias e levou a um avanço no desajuste metabólico do fígado, com uma piora considerável da transdução do sinal da insulina²³. Assim, fica claro que a IL-10 atua como um fator endógeno que protege o fígado dos danos causados pelo consumo de uma dieta hiperlipídica. Entretanto, pouco se sabe a respeito do controle da transcrição do gene da IL-10.

Estudos pregressos evidenciaram a participação de dois fatores de transcrição no controle do gene da interleucina 10 (IL-10). Estes são NFκBp50 e c-Maf. O primeiro pertence à família de fatores de transcrição NFκB²⁴. O fator de transcrição NFκB pertence à uma família de proteínas chamadas REL/NFκB, sendo todas as proteínas dessa família fatores de transcrição. Essas proteínas estão envolvidas principalmente em respostas imunes e inflamatórias. Mamíferos expressam cinco tipos de proteínas da família REL/NFκB, as quais são divididas em dois grupos. Sendo o primeiro grupo – REL A, c-Rel e Rel –B e o segundo grupo NFκB1 e NFκB2. A proteína estudada neste trabalho foi a p50, que faz parte do grupo NFκB1.

O outro fator de transcrição do gene da IL-10, é um proto-oncogene, c-Maf, o qual regula a expressão de IL-10 através a sua ligação com a região promotora do gene²⁵. A proteína c-Maf faz parte de um grupo de proteínas de fatores de transcrição, que se dividem em dois subgrupos, sendo eles chamado *large mafs* e os *small mafs*. c-Maf pertence ao grupo das *large mafs*. Em geral este grupo de proteínas tem papel central na transcrição de genes envolvidos na diferenciação celular em mamíferos^{26,27}.

Por estarem envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, as proteínas dessa família poderiam exercer alguma contribuição para a oncogênese²⁸. Além disso, já foi observado que a proteína c-Maf é importante na diferenciação das células do sistema imune, diferenciando as células T *helper* (Th) em T *helper* 2 (Th2)²⁹ e que a IL-4 produzida principalmente pelas células Th2 regularia a expressão de c-Maf e, portanto, sua ligação ao promotor da IL-10 em macrófagos humanos³⁰.

Evidências recentes ³⁰ revelam que a inibição parcial da expressão da proteína PGC-1 α (co-ativador 1 alfa do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma), promove a reversão de diabetes mellitus e da esteatose hepática em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. O gene *pgc-1 α* pertence a uma família de co-ativadores de transcrição gênica. Esta família inclui o *pgc-1 β* ^{31, 32} e o *pgc-1 related coactivator* ³³. Genes co-ativadores não codificam proteínas que se ligam diretamente ao DNA de maneira específica, tais genes codificam proteínas ou complexos protéicos, os quais regulam a taxa de transcrição de genes alvo ao interagir com fatores de transcrição ³⁴. Um co-ativador pode interagir com múltiplos fatores de transcrição, assim como um fator de transcrição com múltiplos co-ativadores ³⁵. O gene *pgc-1 α* , localiza-se no cromossomo 4 em humanos ³⁶ e no cromossomo 14 em ratos, gerando neste último uma proteína de 798 aminoácidos. Estudos a respeito da proteína PGC-1 α identificaram genes alvo que apresentam expressão aumentada devido à ação desta proteína co-ativadora ou devido ao seu recrutamento a esses genes por fatores de transcrição ³⁷

A proteína PGC-1 α foi inicialmente identificada como um co-ativador de receptores nucleares que participa no controle da termogênese, respondendo a oscilações do ambiente ³⁸. Estudos recentes têm questionado os papéis desta proteína não somente na termogênese ³⁰, mas também na participação da regulação da gliconeogênese hepática ³⁹ e na regulação da secreção de insulina ⁴⁰. Sob condições alimentares normais, a expressão de PGC-1 α no fígado é menor quando comparada à expressão desta proteína em outros tecidos que realizam metabolismo aeróbico para obtenção de energia ³⁸. Entretanto, a expressão hepática de PGC-1 α é induzida pela alimentação ^{39,41}. Evidências indicam que a indução da expressão de *pgc-1 α* é um evento regulatório crítico, que leva à ativação de vias do metabolismo energético que aumentam a produção de ATP a fim de manter um equilíbrio homeostático do fluxo de energia. Levando-se em consideração a importância dos desarranjos no metabolismo hepático de lipídeos, muito comuns em doenças como NASH e doenças hepáticas relacionadas ao álcool, as vias de regulação de PGC-1 α representam novos alvos potenciais de terapia para doenças hepáticas ⁴².

Experimentos realizados em nosso laboratório revelaram ainda que além da melhora na esteatose quando a expressão de PGC-1 α é parcialmente inibida³⁰, há também um aumento na expressão de IL-10 (resultados não publicados). Entretanto, sendo IL-10 uma citocina anti-inflamatória, esperávamos que, com a melhora da esteatose, a sua expressão estivesse diminuída e não aumentada. Assim, surgiu a hipótese de que a PGC-1 α possa interagir com fatores de transcrição que controlam a expressão de IL-10 e dessa forma modular sua presença no fígado.

Sendo a proteína PGC-1 α uma importante co-ativadora de fatores de transcrição, e visto que sua inibição parcial reflete no aumento da citocina IL-10, gostaríamos de verificar neste estudo se a proteína PGC-1 α estaria relacionada de alguma forma com o controle da transcrição do gene IL-10.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

- Avaliar a participação da proteína PGC-1 α no controle da expressão de IL-10 em hepatócitos de ratos.

2.2- Objetivos específicos

- Avaliar se há interação entre a proteína co-ativadora PGC-1 α e os fatores de transcrição NF κ Bp50 e c-Maf;
- Avaliar se PGC-1 α interage, direta-, ou indiretamente com DNA da região promotora do gene da IL-10, e se essa região é a mesma na qual NF κ Bp50 e c-Maf se ligam;

Analisar a expressão do mRNA dos genes *pgc-1*, *il-10*, *il-6*, *tnf- α* e *il-1 β* frente ao tratamento dos hepatócitos com ácidos graxos saturados e insaturados.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Caracterização do modelo

3.1.1- Animais experimentais

Para o estudo foram utilizados ratos machos *Wistar* e camundongos machos *Swiss albinus* provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os ratos Wistar de oito semanas foram acomodados em gaiolas coletivas, em número de cinco animais por unidade, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Esses animais receberam água e ração Purina “*ad libitum*”.

Já os camundongos Swiss foram acomodados em gaiolas individuais, mantidos também em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Esses animais foram divididos em 2 grupos. Para um dos grupos ofertamos água “*ad libitum*” e ração Nuvilab®, comercial padrão, de acordo com AIN-93G. Ao outro ofertamos água “*ad libitum*” e dieta hiperlipídica. A dieta hiperlipídica em questão é uma dieta purificada, AIN-93G, modificada para hiperlipídica, contendo 35% de lipídios, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja Sadia®) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia®). Esses animais foram mantidos em dieta por oito semanas.

Em todos os experimentos foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

Tabela 1- Composição dos Macronutrientes da Dieta Experimental

Dieta Controle (Comercial)*			Dieta Hiperlipídica [#]	
Componentes	g/ 100 g	Kcal %	g/ 100 g	Kcal %
Proteínas	19	76	19	76
Carboidratos	77	308	45	180
Lipídios	4	36	36	324
Kcal/ 100 g		420		580

* Comercial, Nuvilab[®]

[#] Modificada para hiperlipídica, contendo 36% de lipídios

3.2- Preparo da dose de anticorpo anti IL-10

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 µg/ ml. A dose infundida nos animais foi de 100 µl de uma diluição 1:16. Soro fisiológico foi utilizado como veículo de diluição do anticorpo anti IL-10. O tratamento foi feito durante cinco dias, sendo infundido 100 µl, 2 vezes por dia em cada animal. No grupo que recebeu soro pré-imune, infundiu-se o mesmo volume (100 µl) calculado para o anticorpo. No sexto dia, foi feita a extração do fígado do animal para posterior análise do órgão em lâminas histológicas, através do método de hematoxilina-eosina, além de análise de proteínas por Western blot.

3.3- Construção dos Oligonucleotídeos (sense e antisense) PGC-1 α

O programa utilizado para desenhar a sequência do oligonucleotídeo foi o *Gene Runner*, V. 3.05. No banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi retirada a sequência dos pares de bases, onde a sequência escolhida para sense da PGC-1 α foi: **5' TCA GGA GCT GGA TGG C 3'** e para antisense: **5' GCC ATC CAG CTC CTG A 3'**, com modificações fosforotioato em todas as bases, com purificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os *primers* foram produzidos pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA).

Na forma original liofilizados, foram ressuspensos em tampão próprio e aplicados nos animais, nas doses de 2 nmol/ μ L/dia. Essa dose foi completada para 200 μ L de salina como veículo e injetada no peritônio dos animais uma vez ao dia, durante cinco dias. Após o tratamento, os animais foram sacrificados e submetidos à extração tecidual e mensuração por Western Blot. A dose utilizada foi padronizada a partir de experimentos de dose-resposta e tempo.

3.4- Histologia

3.4.1- Hematoxilina e Eosina

Fragmentos do fígado de aproximadamente 1,0 cm³, foram retirados e colocados em um frasco contendo formol a 10%, por 24 horas para adequada fixação. Posteriormente, esses fragmentos foram processados com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol, e parafina e inclusos em blocos de parafina que foram seccionados em cortes de 4,0 μ m e fixados em lâminas de microscopia. A coloração utilizada para com os corantes de Eosina e Hematoxilina.

3.4.2- Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para a marcação de proteínas celulares e nucleares para posterior observação das marcações em microscópio de imunofluorescência (Leica DM 4500B).

A cultura de hepatócitos foi feita em lâminulas, a qual foi fixada com paraformaldeído 4%. Após a fixação, as lamínulas foram incubadas em tampão de bloqueio (solução basal e leite Molico desnatado 5%) para que a ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas fosse reduzida. As lamínulas foram lavadas com PBS 1X para retirada da solução de bloqueio. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos anti-NF κ Bp50 (sc-7178, rabbit, policlonal), anti-c-Maf (sc-7866, rabbit, policlonal) e

anti-PGC-1 α (sc-13067, rabbit, policlonal), diluídos em solução basal e leite Molico desnatado 3%, por 4 horas, sendo todos os anticorpos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Ao término da incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X, sendo feita incubação com anticorpo secundário conjugados à rodamina da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

A diluição desses anticorpos foi feita em solução basal e leite Molico 3%. Após a incubação, as lâminas passaram por nova lavagem com PBS 1X, para retirada do excesso de anticorpo secundário, e então foram analisadas em microscópio de imunofluorescência supracitado.

3.5- Cultura Primária de Hepatócitos de Rato

3.5.1- Isolamento

Hepatócitos foram obtidos de fígado de rato Wistar macho (250-300g), através da técnica de perfusão em duas etapas; inicialmente com tampão Hank's 1X sem collagenase e sem cloreto de cálcio dihidratado e, posteriormente, o mesmo tampão com collagenase e cálcio dihidratado. Os animais foram anestesiados com a proporção 1:1 de Ketamin® e Diazepan® e após assepsia e abertura da pele, foi administrada por via intravenosa (veia cava inferior) uma dose de heparina na proporção de 100 UI/100g de peso corporal. A veia porta hepática foi isolada e um catéter PE50 foi implantado. Iniciou-se rapidamente a perfusão *in situ* do fígado com 300 ml de tampão Hank's sem cálcio, pH 7,4 a 37°C, em fluxo constante de 25 ml/min utilizando uma bomba de perfusão. Com o término da primeira lavagem do fígado pelo tampão Hank's, a perfusão foi continuada com 300 ml do mesmo tampão contendo collagenase 197 U/ml (tipo IV, Sigma) e cloreto de cálcio dihidratado 5,1 mM, pH 7,4 a 37°C, com um fluxo de 15 ml/min. Ao fim da perfusão, o fígado foi retirado, macerado em meio DMEM sem soro, pH 7,4, filtrado em gaze estéril e deixado por 10 minutos em repouso dentro da capela de fluxo laminar. Os hepatócitos foram lavados através de centrifugações, sendo três vezes por dois minutos

em rotação controlada a 200 x g e, em seguida, novamente centrifugados por três vezes, cinco minutos a 50 x g.

Os hepatócitos foram ressuspensos em meio DMEM, pH 7,4, contendo penicilina 50 UI/ml, estreptomicina 50 µg/ml, albumina de soro bovino 0,2% (com alto grau de pureza, 99,9%, Sigma), insulina bovina 0,1 UI/ml, dexametasona 1 µM, suplementado com 10% de SFB. A suspensão de hepatócitos foi previamente analisada com relação à viabilidade celular através do teste de exclusão do corante vital Azul de Tripán 4% diluído em água com alto grau de pureza.

3.5.2- Cultura

As células obtidas foram cultivadas em placas de cultura 30mm x 15mm (TPP) em uma densidade final de $6,5 \times 10^5$ células viáveis/ml, incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quatro horas após o plaqueamento e adesão celular, o meio contendo as células não aderidas foi trocado por meio DMEM sem soro, suplementado com antibióticos penicilina 50 UI/ml e streptomicina 50 µg/ml. As culturas primárias de hepatócitos foram divididas em 4 grupos, tratados da seguinte forma: grupo 1 com 22,5 µM de uma mistura de ácidos graxos saturados, grupo 2 com 22,5 µM de ácido graxo insaturado (ácido oléico), grupo 3 com veículo de diluição dos ácidos graxos e grupo 4 não foi tratado, sendo então o controle negativo do experimento. O veículo utilizado para diluição dos ácidos graxos foi meio de cultura DMEM puro com a adição de 5% de albumina com alto grau de pureza (Sigma, 99,9%). As placas foram feitas em triplicata para cada um dos tratamentos. O mesmo experimento foi repetido em oito animais, portanto, foram utilizados hepatócitos isolados de oito animais diferentes.

Os hepatócitos isolados foram inicialmente submetidos a tratamento com mistura de ácidos graxos saturados (composição na Tabela 1) e ácido oléico (insaturado) por tempos de 0, 3 e 16 horas para que se determinasse o tempo ótimo de exposição, capaz de produzir aumento na expressão de IL-10. O tempo em que observamos um aumento da expressão foi no período de 16 horas. Uma vez determinado o tempo ótimo,

os experimentos foram realizados somente com o período de exposição em que houve aumento da expressão.

Tabela 2- Composição da mistura de ácidos graxos saturados

25%	Methyl palmitato	C16:0
25%	Methyl stearato	C18:0
25%	Methyl arachidato	C20:0
25%	Methyl behenato	C22:0

Os hepatócitos também foram submetidos ao tratamento com ácido acetil salicílico (ASA) (Sigma), 10mM por 2 horas e posteriormente incubados com ácido oléico 22,5µM (insaturado) por 8 horas. O veículo de diluição do ASA foi água ultra pura (Milliq). Foram feitos quatro grupos de tratamento: grupo 1 tratado 2 horas com ASA, sendo o ASA retirado do meio após as 2 horas de incubação, a cultura lavada com PBS 1X para que recebesse o novo tratamento com ácido oléico por 8 horas; grupo 2 tratado apenas com ASA por 2 horas; grupo 3 que recebeu apenas o tratamento com ácido oléico por 8 horas e grupo 4 que não recebeu nenhum tipo de tratamento.

3.6- Imunoprecipitação e Western Blot

3.6.1- Extração dos tecidos

Hepatócitos cultivados ou fragmentos de fígado dos animais foram extraídos e submetidos à homogeneização em 1,0 ml de tampão de extração de proteínas (1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF, 0.2 mg/ml aprotinina) à 4°C. Os fragmentos celulares foram centrifugados por 20 minutos;

11.000 rpm; 4° C, para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de Biureto, utilizando-se 1,0 ml deste reagente para 20 µl de amostra. Posteriormente, foi feita a leitura das proteínas em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540 nanômetros. Após a determinação da quantidade de proteínas nas amostras, 800 µg de proteínas foram utilizados para imunoprecipitação de proteína.

3.6.2- Imunoprecipitação de proteínas

A técnica de imunoprecipitação de proteínas consiste na incubação de certa quantidade de um extrato protéico com anticorpos específicos. Neste estudo, 800µg de proteína total foi incubada com anticorpos anti-PGC-1, anti-NFκBp50 e anti-c-Maf (já especificados acima) overnight a 4°C. Os anticorpos se ligam às suas proteínas específicas, formando um complexo anticorpo-proteína.

No dia seguinte, este complexo foi incubado por 2 horas com 35 µl de proteína A Sepharose 6 MB à 4°C. Desta maneira, o complexo anticorpo-proteína liga-se a proteína A, a qual é pesada e precipita, formando um imunoprecipitado. Após esta incubação, foram feitas três lavagens seguidas de centrifugação, com tampão específico. As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli ⁴³ contendo 100mM de DTT e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE.

3.6.3- Western Blot

A concentração dos géis de poliacrilamida para a análise de proteínas é determinada conforme o tamanho destas. As proteínas deste estudo tinham 48kDa, 47kDa e 90kDa. As duas primeiras proteínas, sendo elas NFκBp50 e c-Maf, respectivamente, devido ao seu pequeno tamanho, foram colocadas em gel de poliacrilamida 10%. Já a proteína PGC-1α, de 90kDa, foi aplicada em gel de poliacrilamida 8%.

A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, a 120V, por 2 horas. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0.02% Tween 20) a 4°C, *overnight*. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight*, 4°C, com anticorpos específicos anti-PGC1 α , anti-c-Maf e anti-NF κ Bp50 (já especificados acima), diluídos em 10 ml de solução basal e 3% albumina bovina (95% pureza, Sigma). As bandas protéicas específicas foram visualizadas através de reação de anticorpos terciários conjugados à peroxidase e detectados por quioluminescência (Pierce). As membranas foram expostas a um filme de RX em cassete apropriado. As bandas identificadas na radiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foram utilizados um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp).

3.7- Extração de RNA

Foi feita extração de RNA total das culturas de hepatócitos isolados, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 μ g. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

3.8- PCR quantitativo (qPCR) - Real Time PCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para os genes IL-10, IL-6, IL-1b e TNF- α utilizamos respectivamente os seguintes assay (TaqManTM - Applied Biosystems) Rn00563409_m1 ,

Rn00561420_m1, Rn 00580432_m1 e Rn 00562055_m1. Para o gene PGC-1 α foi enviada uma sequência de mRNA para a empresa, sendo que esta construiu um par de primers e sonda específico para este gene. A região em que foram construídos os *primers* e sonda específicos para o gene PGC-1 α foi 913 - 1933pb da sequência NM_031347 - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O gene *GAPD* Rat (TaqManTM - Applied Biosystems), Part number 4352338E, foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto os *primers* para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM.

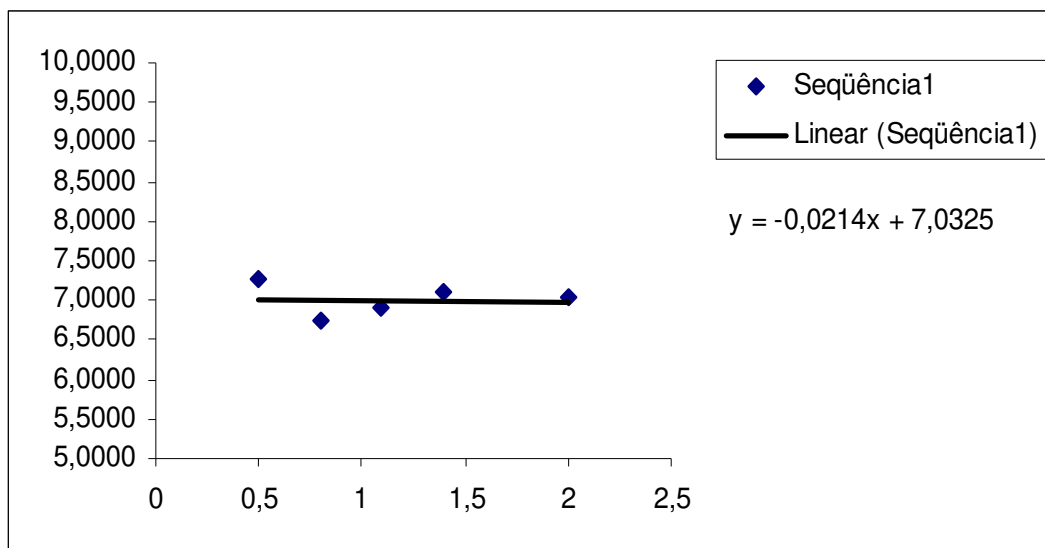
Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, IL-6, IL-10 e PGC-1 α com o controle endógeno *GAPD rat*. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

3.8.1- Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa 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 de um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação do gene *IL-10*, *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF α* , *PGC-1 α* e *GAPD*, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de hepatócito de rato em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é 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 possui uma equação de reta na qual é possível 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 estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Abaixo, segue exemplo (gene IL-6) do gráfico citado acima. Procedimento similar foi realizado para todos os genes do estudo.



A concentração de amostra validada como eficiente para os genes *IL-6*, *IL-10*, *IL-1 β* , *TNF α* , *PGC-1 α* e *GAPD* foi de 40,0 ng de cDNA.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (40ng 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. A expressão gênica foi avaliada em células tratadas com ácidos graxos saturados, tratadas com ácido graxo insaturado, além dos controles negativos e dos veículos. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). No programa BioEstat 3.0 foram realizados os testes estatísticos *two-way* ANOVA com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença significativa na expressão do gene de interesse.

3.9- Imunoprecipitação de cromatina - ChIP Assay

A fim de verificarmos se havia interação das proteínas PGC-1 α /NF κ Bp50 e PGC-1 α /c-Maf com a região promotora do gene da interleucina 10 (IL-10), fizemos uma imunoprecipitação de cromatina, experimento denominado de ChIP Assay. Através deste método, é possível imunoprecipitar proteínas que estão ligadas à cromatina.

Para obtermos a região promotora do gene da IL-10 de ratos, comparamos o genoma de ratos com a região promotora do gene da IL-10 de seres humanos (sendo a última já descrita), a fim de observarmos se havia alguma região conservada entre estas duas seqüências. A comparação das duas seqüências foi feita através do programa Blast, disponível na página do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Sequência 1: Acesso NW_047394

Rattus norvegicus chromosome 13 genomic contig, reference assembly (based on RGSC v3.4).

Sequência 2: Acesso U06844

Human interleukin 10 (IL10) gene, promoter region.

Encontramos identidade entre as sequências. Vendo que a identidade era no cromossomo 13 de rato, para desenhar os *primers* do ChIP *assay*, utilizamos esta região do cromossomo 13 de rato, abaixo identificada, sendo a sequência de acesso NW_047394.1 - *Rattus norvegicus chromosome 13 genomic contig, reference assembly (based on RGSC v3.4).*

4065481 tctgatcgctc tgctcacacag ccaacaaacc ttcaaggaa gagtcttgaa cacacaatgg
4065541 aagaatcaaa gagagtgagt ttgagggtta atcagccctc tcctgtttcc ttgggtaac
4065601 tgagtgetaa ggtgacctcc tggtcagcaa gaaatagcgg acattcaacc caggttgagt
4065661 ggaggaaata attatttctc aatcctaag tgctctggaa tagccattt atgcacgtca
4065721 ttgtgactta cgagtgcgtg aatggaaccc acagttgtag attctctgta catagaacag
4065781 ctgtctgcct caggaaatac aacttttagt attgagaagc taaaagaaa aaaaattaa
4065841 agagagatag cgcttactaa aaatagccgt aatgcagaag ttcattctta ccagttctct
4065901 tgtgcttaca atgcaaaaaa aagaaaaaag aaaaaaaat taagctcaaa aaagtgcattg
4065961 gtctagaaga gggaggagcc ttgccagga agtttgtaaa ttgagaggcc ctgctgcacc
4066021 ttcggTATAA AAggggggaca ccgggcagga gatctacaca ttagggactt gctcttatac
4066081 taccatagcc acaacgcagc ctgcagaaa acagagcttc agcATGcctg gtcagcact
4066141 gctatgttgc ctgctcttac tggctggagt gaagaccagc aaaggccatt ccatccgggg

Nesta sequência, desenhamos *primers* para a identificação da região promotora do gene da IL-10. Para chegarmos à conclusão de qual região seria a região promotora do gene da IL-10 de rato, observamos a região mais próxima ao TATABOX desta sequência, portanto, desenhamos os *primers* ao redor desta região.

Região do TATABOX marcada em azul e códon de iniciação ATG marcado em vermelho. Esta região é apenas uma parte da sequência[NW_047394.1] citada acima. Os *primers* foram testados em DNA de rato para confirmar se estava ocorrendo amplificação. Após o teste, verificamos o resultado positivo em gel de agarose.

Foram desenhados 6 pares de *primers*, abaixo especificados:

5' GCCAACAAACCTTTCAAGG 3' *Primer 1*
5' ATTTCTTGCTGACCAGGAG 3'

5' GAAATAGCGGACATTCAACCCAG 3' *Primer 2*
5' GCACTCGTAAGTCACAATG 3'

5' CTCAATCCTAATGTGCTCTGG 3' *Primer 3*
5' AGCTCTGTTTTCTGCAAGGCT 3'

5' TTACGAGTGCGTGAATGGAAC 3' *Primer 4*
5' CGGCTATTTTAGTAAGCGC 3'

5' GCGCTTACTAAAAATAGCCG 3' *Primer 5*
5' CCTCTTCTAGACCATGCACTT 3'

5' AAGTGCATGGTCTAGAAGAGG 3' *Primer 6*
5' AGCTCTGTTTTCTGCAAGGCT 3'

A numeração dos *primers* foi feita segundo a proximidade do *primer* sense à região do ATG. Portanto, *primer* 1 mais distante da região do ATG. Já o *primer* 6 é mais próximo à região do ATG.

Para iniciarmos os experimentos de *ChIP Assay*, primeiramente tivemos que estabelecer a potência e os pulsos de sonicação das amostras de DNA extraídas da cultura de hepatócitos. Utilizamos 40% da potência total do aparelho para a sonicação das amostras. Os pulsos eram de 10 segundos cada, com as amostras mantidas no gelo para evitar aquecimento e possível reversão do *crosslink*. Foram feitos 14 pulsos de sonicação. Abaixo, podemos observar um gel de agarose que mostra os 14 pulsos de sonicação de 10 segundos cada, com 40% de potência.

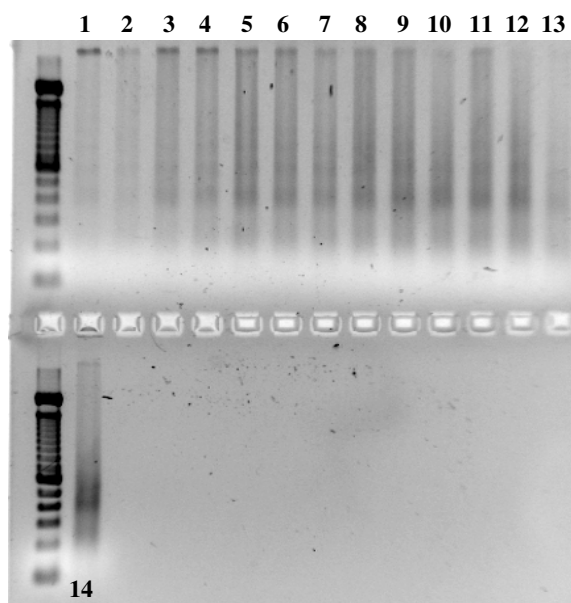


Figura 1- Gel de agarose 1,5%. Amostras de 1-14, sendo a ordem correspondente ao número de pulsos feitos em cada amostra.

Para o experimento, utilizamos a amostra que foi sonicada por 7 vezes em potência de 40%, o que corresponde à amostra de número 7 do gel acima.

Foi feita a imunoprecipitação de cromatina segundo os parâmetros indicados pelo kit Magna EZ ChIP (Millipore), no qual já obtínhamos a fração da cromatina que havia se associado às proteínas do estudo. A imunoprecipitação de cromatina foi feita para as proteínas do estudo, PGC-1 α , NF κ Bp50 e c-Maf, sendo utilizado 5,0 μ g de cada um dos anticorpos específicos destas proteínas. Os anticorpos utilizados foram os mesmos utilizados para imunohistoquímica, imunoprecipitação de proteína e Western blot já citados acima.

3.10- Análise Estatística

As bandas de proteínas obtidas em Western blot foram quantificadas por densitometria digital (ScionCorp, Inc. Frederick, MD, USA). As médias $\pm$ EPM obtidas em Western bolts, PCR e determinações bioquímicas e metabólicas foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey-Kramer (ANOVA) ou teste *t* de Student, de acordo com a indicação apropriada. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

4- CAPÍTULO 1 - ARTIGO

The role of PGC-1 α in the fatty-acid dependent transcriptional control of IL-10 in hepatic cells

Joseane Morari¹, Adriana S. Torsoni¹, Gabriel F. Anhô², Erika A. Roman¹, Dennys E. Cintra¹, Laura S. Ward¹, Silvana Bordin², Lício A. Velloso¹

¹Department of Internal Medicine, University of Campinas and ²Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, Brazil

Corresponding Author

Lício A. Velloso

DCM – FCM, UNICAMP

13084 970 Campinas, SP – BRAZIL

lavelloso@fcm.unicamp.br

Abstract

Background/aims: Interleukin-10 (IL-10) is an endogenous factor that restrains hepatic insulin resistance in diet-induced steatosis. Reducing IL-10 expression increases pro-inflammatory activity in the steatotic liver and worsens insulin resistance. As the transcriptional co-activator PGC-1 α plays a central role in dysfunctional hepatocytic activity in diet-induced steatosis, we hypothesized that at least part of the action of PGC-1 α could be mediated by its effect on the transcriptional control of IL-10 expression.

Methods: Here, we used immunoblotting, real-time PCR, immunocytochemistry and ChIP assay to investigate the role of PGC-1 α in the control of IL-10 expression in hepatic cells.

Results: First, we show that, in the intact steatotic liver, the expressions of IL-10 and PGC-1 α are increased. Inhibiting PGC-1 α expression by antisense oligonucleotide increases IL-10 expression and reduces the steatotic phenotype. In cultured hepatocytes, the treatment with saturated and unsaturated fatty acids, increased IL-10 expression. This is accompanied by increased association of PGC-1 α with c-Maf and p50-NF κ B, two transcription factors known to modulate IL-10 expression. In addition, following fatty acid treatment, PGC-1 α , c-Maf and p50- NF κ B migrate from the cytosol to the nuclei of hepatocytes and bind to the IL-10 promoter region. Inhibiting NF κ B activation with salicylate reduces IL-10 expression and the association of PGC-1 α with p50-NF κ B.

Conclusions: Thus, PGC-1 α emerges as a potential transcriptional regulator of the inflammatory phenomenon taking place in the steatotic liver.

Introduction

Cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is one of the major causes of disease leading to hepatic transplantation in the western world (1, 2). The high consumption of fat-rich diets, paralleled by a reduction in physical activity has fostered the increased prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus, both conditions known to be intimately associated with fatty liver disease (2, 3). The reasons why only some people progress from simple steatosis to the pre- cirrhotic NASH is still a matter of intense investigation. Because the activation of pro-inflammatory gene expression is an important mechanism involved in NASH installation, one hypothesis proposed to explain the existence of protective phenotypes is the individual's capacity to induce an increased expression of anti-inflammatory factors in the liver (3-5).

Recent studies have shown that the anti-inflammatory cytokine, IL-10, is expressed in the liver of diet-induced obese animal models and that reducing its activity by pharmacological or genetic means, worsens hepatic insulin resistance and increases local inflammation (6, 7). In addition, a number of studies have linked certain IL-10 gene polymorphisms to installation and progression of different inflammatory liver dysfunctions (8).

Proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) is a transcriptional coactivator known to play an important role in the control of lipid and carbohydrate metabolism and storage in the liver (9). Restraining its expression in the steatotic liver reduces the hepatic content of fatty acids while normalizing insulin signal transduction (10). However, the mechanisms involved in this regulation are not completely understood. Here we hypothesized that PGC-1 α can regulate IL-10 gene transcription by modulating the activity of factors involved in the transcriptional regulation of the IL-10 gene. c-Maf and NF κ B are two transcription factors that play important roles in the control of IL-10 expression (11). Upon LPS-, and other TLR-ligand stimulation both c-Maf and NF κ B modulate IL-10 gene transcription in different cell types (11, 12). In addition, recent evidence has shown that PGC-1 α can physically interact with and modulate NF κ B (13), which is frequently regulated by c-Maf (14, 15). Our study demonstrates that, in isolated hepatocytes, fatty acids can induce the association of PGC-1 α with p50 and c-Maf, which migrate to the nucleus and bind to the promoter region of the IL-10 gene.

Materials and methods

Antibodies and chemicals. Antibodies against TNF- α (sc-1347, goat polyclonal and sc-8301, rabbit polyclonal), IL-1 β (sc-1252, goat polyclonal and sc-7884 rabbit polyclonal), IL-6 (sc-1266, goat polyclonal and sc-7920, rabbit polyclonal), IL-10 (sc-1783, goat polyclonal), PGC-1 α (sc-13067, rabbit polyclonal), p50 (sc-7178, rabbit polyclonal), c-Maf (sc-7866, rabbit polyclonal) and F4/80 (sc-25830, rabbit polyclonal) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All 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, collagenase, oleic acid/C18:1 (O-1383-1G), palmitic acid/C16:0 (P-5177), stearic acid/C18:0 (5376), arachidic acid/C20:0 (A-3881), behenic acid/C22:0 (B-3271), bovine serum albumin (fraction V) and fatty acid free bovine serum albumin (A-6003) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium thiopental was from Lilly (Indianapolis, IN, USA). All the chemicals used in the real-time PCR and DAPI used in immunofluorescence staining were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Experimental model and treatment protocols. Male, 4-week-old Swiss, (Sw/Uni) inbred strain mice, were obtained from the State University of Campinas Breeding Center. 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 w old mice were introduced to control (CD) or high-fat (HF) diets (Table 1). After 8 w on the HF diet, all Sw/Uni mice presented hepatic steatosis and diabetes mellitus. 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 the HF diet were randomly selected for treatment with an IL-10 neutralizing antibody (Ab) [or with a rabbit pre-immune antiserum (PS)], or with a PGC-1 α . phosphorothioate modified antisense oligonucleotide (ASO) [or scrambled oligonucleotide (SCR)]. The doses employed and the sequences for the

oligonucleotides were previously optimized and reported (6, 10). Treatments lasted for four days with the antibodies or eight days with the oligonucleotides, and at the end of the respective treatment periods mice were employed for determination of histological characteristics and/or cytokine expression.

Metabolic and biochemical characterization of the animals. Body mass and mean daily food intake were evaluated at the end of the experimental period. Blood samples were collected for glucose and triglyceride determination by colorimetric methods (16, 17) and for insulin determination by ELISA (18).

Primary hepatocyte culture. Male Wistar rats (250-300 g) were anesthetized with sodium thiopental and submitted to a portal vein cannulation. An *in situ* liver perfusion was started with 300 ml of calcium free Hank's buffer (pH 7.4) followed by 300 ml of Hank's buffer (pH 7.4) containing type IV collagenase (Sigma-Aldrich) (197 units/ml) and calcium chloride (5.1 mM). At the end of the perfusion the liver was excised and gently passed through a thin net. Cells were washed in DMEM buffer in three consecutive rounds of centrifugation at 200 x g followed by three additional rounds of centrifugation at 50 x g. Cells were plated in 30 mm culture dishes at a final density of 6.5×10^5 cells/ml. After four hours, non-adherent cells were discarded and adherent hepatocytes were submitted to one of the following treatments: Control group, not treated; vehicle group, treated with fatty acid diluting vehicle (DMEM medium with 5% fatty acid-free albumin); unsaturated fatty acid group (UNS), treated with oleic acid at a final concentration of 22.5 μ M; and, saturated fatty acid mixture group (SAT), treated with a mixture containing equal amounts of palmitic, stearic, arachidic and behenic acids at a final combined concentration of 22.5 μ M. Treatment lasted for 16 h and was performed always in triplicate (exceptionally, the experiments for immunocytochemistry were carried out with 1 and 3 h fatty acid treatment). In some experiments cells were pre-incubated for 2 h in the presence of salicylic acid (10 mM) before the incubation with oleic acid, as described above. Cells treated according to these protocols were used in real-time PCR, immunoblotting, immunocytochemistry and chromatin immunoprecipitation assays, as described below.

Real-time PCR. IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β and PGC-1 α mRNAs were measured in primarily cultivated rat hepatocytes using intron-skipping primers obtained from Applied Biosystems, TNF- α – Rn00562055_m1, IL-1 β – Rn00580432_m1, IL-6 – Rn00561420_m1 and IL-10 Rn00563409_m1. The PGC-1 α primers were customized by Applied Biosystems encompassing the 913-1933 region of the *Rattus norvegicus* PGC-1 α gene [NM_031347 - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)]. GAPDH primers (Applied Biosystems) were used as control, #4352339E. Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification were obtained through five-point, 2-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 40 ng of reverse-transcribed RNA and was run according to the manufacturer's recommendations using the TaqMan PCR master mix. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Immunoprecipitation and immunoblotting. For evaluation of cytokine expression and protein/protein interaction, primarily cultivated hepatocytes or fragments of liver were homogenized in solubilization buffer at 4°C. Aliquots of the resulting protein extracts containing 0.5 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against c-Maf, p50 and PGC-1 α at 4°C overnight, followed by SDS/PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti- c-Maf, p50 and PGC-1 α antibodies. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, F4/80 and PGC-1 α antibodies. Specific bands were detected by chemiluminescence and visualization was performed by exposure of the membranes to RX-films.

Liver histology. Hydrated, 4.0 μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver specimens were stained by a regular haematoxylin-eosin (HE) method for evaluation of liver histology (19).

Immunocytochemistry. Isolated hepatocytes were cultivated on glass cover slips and fixed with 4% paraformaldehyde. Primary antibodies against c-Maf, p50 and PGC-1 α were used in overnight incubations at +4°C. Rhodamine-conjugated secondary antibodies were used to label the target proteins and microscopic evaluation and photodocumentations were performed on a Leica DM 4500B microscope.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). For determination of c-Maf, p50 and PGC-1 α binding to the promoter region of the IL-10 gene, a ChIP assay was performed using a commercially-available kit (EZ Magna Chip) from Millipore (Billerica, MA, USA), according to the recommendations of the manufacturer. For PCR amplification of the region of interest, six pairs of primers were designed spanning the 4065481-4066080 region of the *Rattus norvegicus* chromosome 13 (NW_047394.1 - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). The sequences of the primers were: #1, sense - 5' GCC AAC AAA CCT TTC AAG G 3', antisense - 5' ATT TCT TGC TGA CCA GGA G 3'; #2, sense - 5' GAA ATA GCG GAC ATT CAA CCC AG 3', antisense - 5' GCA CTC GTA AGT CAC AAT G 3'; #3, sense - 5' CTC AAT CCT AAT GTG CTC TGG 3', antisense - 5' AGC TCT GTT TTC TGC AAG GCT 3'; #4, sense - 5' TTA CGA GTG CGT GAA TGG AAC 3', antisense - 5' CGG CTA TTT TTA GTA AGC GC 3'; #5, sense - 5' GCG CTT ACT AAA AAT AGC CG 3', antisense - CCT CTT CTA GAC CAT GCA CTT 3'; #6, sense - 5' AAG TGC ATG GTC TAG AAG AGG 3', antisense - 5' AGC TCT GTT TTC TGC AAG GCT 3'.

Statistical analysis. Specific protein bands present in the blots were quantified by digital densitometry (ScionCorp, Inc. Frederick, MD, USA). Mean values $\pm$ SEM obtained from densitometry scans, real-time PCR, biochemical and metabolic determinations were compared utilizing Tukey-Kramer test (ANOVA) or Student's *t* test, as appropriate; $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

Inhibition of PGC-1 α increases IL-10 expression in the liver and reverses hepatic steatosis. After eight weeks on the HF diet consumption, mice become obese, hyperinsulinemic and diabetic (Table 2). At the macroscopic examination, the liver is

enlarged and yellowish (not shown), and under histological evaluation a considerable increase of infiltration of the parenchyma cells with lipids is observed (Fig. 1A). This is accompanied by increased hepatic expression of IL-10, IL-6, IL-1 β and TNF- α (Fig. 1B). Reducing PGC-1 α expression by inhibition of mRNA translation using a phosphorothioate modified antisense oligonucleotide results in a significant increase of IL-10 expression (Fig. 1C, 2.2-fold increase vs. HF, n=5, p<0.05), which is accompanied by an almost complete reversal of hepatic steatosis (Fig. 1D). To determine the role of IL-10 expression as an endogenous protective factor against diet-induced liver inflammation, HF fed mice were treated with a neutralizing anti-IL-10 antibody and the expressions of inflammatory cytokines were evaluated by immunoblot. As depicted in Fig. 1E, the neutralization of IL-10 produced a remarkable increase in the expressions of IL-6, IL-1 β and TNF- α .

Fatty acids induce the expression of cytokines in isolated hepatocytes. The purity of hepatic cell primary culture was confirmed by the absence of F4/80 expression (Fig. 2A). The treatment of hepatic cells with both saturated and unsaturated fatty acids resulted in increased expressions of IL-10 (Fig. 2B), IL-1 β (Fig. 2C) and IL-6 (Fig. 2E), but not of TNF- α (Fig. 2D). In addition, the fatty acids produced no modulatory effect on the expression of PGC-1 α (Fig. 2F).

Fatty acids induce PGC-1 α , p50 and c-Maf migration to the nucleus of hepatocytes. Primarily cultivated hepatocytes were treated for 1- or 3h with saturated or unsaturated fatty acids. The localizations of PGC-1 α , p50 and c-Maf were evaluated by immunofluorescence staining. Typically, both types of fatty acids induced some migration of all three proteins to the nuclei. At 1h some nuclear presence of the proteins was seen (not shown), however, at 3h the nuclear expression of p50, c-Maf and PGC-1 α was considerably increased in most cells evaluated (Fig. 3A). Interestingly, in most cells examined, some c-Maf staining could be detected in the nucleus before fatty acid treatment.

Fatty acids induce the association of PGC-1 α with p50 and c-Maf. Isolated hepatocytes were treated with unsaturated or saturated fatty acids and PGC-1 α was co-immunoprecipitated with p50 or c-Maf. As shown in Fig. 3B, some degree of constitutive association exists between PGC-1 α and both p50 and c-Maf. However,

the treatment with either type of fatty acid produced a significant increase in the association of PGC-1 α with p50 (2.8- and 2.9-fold for unsaturated and saturated fatty acids, respectively, n=5, p<0.05) and c-Maf (3.4- and 2.6-fold for unsaturated and saturated fatty acids, respectively, n=5, p<0.05).

PGC-1 α , p50 and c-Maf bind to the IL-10 promoter region in hepatocytes.

To evaluate the ability of fatty acids to induce interactions of PGC-1 α , p50 and c-Maf with sequences of the promoter region of the IL-10 gene, we designed six pairs of primers distributed throughout the DNA region contained between nucleotides 4065481 and 4066080 of *Rattus norvegicus* chromosome 13, which is located upstream from the starting codon of the IL-10 gene (Fig. 4A). Primers 1-4 were upstream, while primers 5-6 were downstream of the TATA box. In the first round of ChIP assay, some binding of all three proteins was detected in the regions amplified by primers 2 and 4, while no specific binding was detected in the regions amplified by the remainder of the primers (not shown). In the second round of ChIP assay, we used the sense primer of pair #2 and the antisense primer of pair #4 to evaluate the binding of the proteins to an extended DNA region comprised between these two primers. As shown in Fig. 4B, under basal conditions no DNA binding of PGC-1 α and p50 could be detected; however, following either unsaturated or saturated fatty acid treatment, both proteins bound specifically to the DNA. Conversely, c-Maf was already bound to DNA under basal conditions and following fatty acids treatment the association of c-Maf with DNA was still detected.

Inhibition of NF- κ B reduces fatty acid-induced IL-10 expression and impairs PGC-1 α /p50 association. To inhibit NF- κ B, hepatocytes were treated for 8 h with acetyl salicylic acid and then, for 16 h, with the unsaturated fatty acid oleate. As shown in Fig. 5A, a complete inhibition of fatty acid-induced IL-10 expression was obtained with salicylate. This was accompanied by the inhibition of fatty acid-induced activation of IKK, as determined by the phosphorylation of I κ B (Fig. 5B, upper blot), and the association of PGC-1 α with p50 (Fig. 5B, lower blot). The treatment with salicylate resulted in no modification of fatty acid-induced association of PGC-1 α with c-Maf (not shown).

Discussion

Defining the mechanisms involved in the control of inflammatory and anti-inflammatory factors expressed in the steatotic liver is believed to have an impact on the development of novel therapeutic strategies and on the capacity to predict the development of NASH and hepatic cirrhosis (2-4, 20, 21). In two recent studies, we observed that the modulation of the expressions of IL-10 and PGC-1 α have opposing effects in the installation of NASH in an animal model of diet-induced hepatic disease (6, 10). Reducing IL-10 expression worsens hepatic morphologic, inflammatory and metabolic parameters related to NASH (6), while PGC-1 α inhibition improves a number of metabolic parameters involved in liver function (10).

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine expressed, under different conditions, in most cells present in the liver such as Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells, stellate cells, hepatic infiltrating lymphocytes and hepatocytes (22-24). A number of recent clinical and experimental studies have suggested that IL-10 plays an important protective role in the development of NASH and its progression to cirrhosis (6, 7, 25). However, little is known about the transcriptional control of the IL-10 gene. In fact, so far, only two transcription factors, NF κ B and c-Maf are known to participate in the control of IL-10 expression (11, 12, 15). In addition, a binding site for NF-Y has been described, but its role in the control of IL-10 expression remains elusive (26).

Here, we evaluated the hypothesis that PGC-1 α could play a role in the modulation of IL-10 expression by interacting with the two transcription factors known to regulate the transcriptional activity of the IL-10 promoter. Initially, we demonstrated that, in the intact liver of an animal model of diet-induced NASH, the inhibition of IL-10 expression worsens the inflammatory phenotype, while reducing PGC-1 α increases IL-10 expression and rescues the liver from diet-induced steatosis. Although some similar results have been previously reported (6, 7, 10), this is the first demonstration that, in the liver environment, reducing PGC-1 α expression significantly increases IL-10 levels.

Next, we established a method for inducing IL-10 expression in primarily cultivated hepatocytes by exposing the cells to fatty acids. Here, the idea was to mimic the effect of the high-fat diet which is capable of inducing pro-and anti-inflammatory gene

expression in the intact liver (6, 21, 27). As previously reported, both unsaturated and saturated fatty acids significantly increase the expressions of some pro-inflammatory cytokines and IL-10 in the hepatic cells (28). Differently from the intact liver of high-fat diet treated rodents, in the isolated cell system TNF- α and PGC-1 α were not affected by the treatment with the fatty acids. Although we have no current explanation for this, we suspect that in the absence of Kupffer cells, some of the inflammatory input generated by the fatty acids is lost leading to a milder activation of pro- and anti-inflammatory genes. Nevertheless, even under a milder condition, both types of fatty acids induced the migration of c-Maf, p50 and PGC-1 α from a preferential cytosolic distribution to an intra-nuclear location. In addition, the treatment with the fatty acids induced the physical association of both c-Maf and p50 with PGC-1 α .

Next, using ChIP assay we evaluated whether the treatment with fatty acids would result in increased binding of c-Maf, p50 and PGC-1 α to the promoter region of IL-10. For this, six pairs of primers, spanning 599 base pairs of the IL-10 promoter and including the TATA box were used. Binding of all three proteins were detected only in the regions encompassed by pairs 2 and 4. When using the sense primer of pair #2 and the antisense primer of pair #4, we obtained the highest binding of all three proteins, suggesting that the DNA region located between primers 2 and 4, harbors the binding site (s) for p50 and c-Maf. In a recent study, the binding site for p50 homodimers was located -55/-46 upstream from the starting codon of the mouse IL-10 gene (29). This region of the rat promoter is highly similar to the region located between primers 2 and 4 of the rat promoter. Thus, we believe that all three proteins bind, directly or indirectly, to the region comprehended between bases -493 and -254 of the *Rattus norvegicus* IL-10 promoter.

Finally, at least part of the specificity of the phenomenon herein described was tested by pre-treating the cells with the inhibitor of IKK, salicylate. Using this strategy we were able to abolish the fatty acid-induced IL-10 expression which was accompanied by inhibition of the formation of the p50/PGC-1 α complex.

A piece of information that deserves further attention regards the fact that some of c-Maf protein is already bound to the IL-10 promoter, even in the absence of stimulus with the fatty acids. In macrophages, c-Maf can exert both stimulatory and inhibitory effect

on the expression of IL-10 and IL-12, suggesting that it possesses a dual role, dependent on different stimuli (15). Possibly, in resting hepatocytes, c-Maf acts as a repressor of the IL-10 gene, while, after stimulation with fatty acids it may interact with the p50/PGC-1 α complex to positively modulate the gene expression. Further experiments will be required to evaluate these hypotheses.

In conclusion, we have demonstrated that the transcriptional co-activator, PGC-1 α associates with at least two transcription factors known to modulate IL-10 gene expression. This association may have an impact on the control of IL-10 levels in different physiological and pathological contexts. Figure 6 summarizes the findings of this study.

Acknowledgements

The grants for this work were provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Mr. G. Ferraz and Mr. M. Cruz for technical assistance and Dr. N. Conran for English grammar editing.

References

1. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007;128:837-847.
2. Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004;27:2057-2066.
3. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
4. Delgado JS. Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Intern Med* 2008;19:75-82.
5. 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;20:995-1001.
6. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 2008;48:628-637.
7. den Boer MA, Voshol PJ, Schroder-van der Elst JP, Korshennikova E, Ouwens DM, Kuipers F, Havekes LM, 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.
8. Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:1681-1685.
9. Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 2006;27:728-735.

10. 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.
11. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol* 2005;174:3484-3492.
12. Lee KG, Xu S, Wong ET, Tergaonkar V, Lam KP. Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. *J Biol Chem* 2008;283:11189-11198.
13. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Farrar WL. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPARgamma cross talk with NF-kappaB and C/EBP. *Blood* 2007;110:4373-4384.
14. Homma Y, Cao S, Shi X, Ma X. The Th2 transcription factor c-Maf inhibits IL-12p35 gene expression in activated macrophages by targeting NF-kappaB nuclear translocation. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:799-808.
15. Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, Ma X. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 2002;169:5715-5725.
16. Koch TR, Nipper HC. Evaluation of automated glucose oxidase methods for serum glucose: comparison to hexokinase of a colorimetric and an electrometric method. *Clin Chim Acta* 1977;78:315-322.
17. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983;29:538-542.
18. Lidofsky SD, Hinsberg WD, 3rd, Zare RN. Enzyme-linked sandwich immunoassay for insulin using laser fluorimetric detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:1901-1905.

19. Lin XZ, Horng 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.
20. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
21. Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, et al. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 2007;148:5991-5997.
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. Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy M, Margalit M, Shibolet O, Gomori M, Alper R, et al. Amelioration of non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice by oral immune regulation towards liver-extracted proteins is associated with elevated intrahepatic NKT lymphocytes and serum IL-10 levels. *J Pathol* 2006;208:74-81.
26. Lin SC. Identification of an NF-Y/HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol Immunol* 2006;43:1325-1331.
27. Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 2007;194:539-550.

28. Nishitani Y, Okazaki S, Imabayashi K, Katada R, Umetani K, Yajima H, Matsumoto H. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 2007;42:32-35.
29. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2006;281:26041-26050.

Table 1- Macronutrient composition of the diets

	<i>Control diet</i>		<i>High-fat diet</i>	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	19	18	19	12
Carbohydrate	77	73	45	27
Saturated fat	4	9	36	61
kJ/g	15.8		24.5	

Table 2- Metabolic parameters of the experimental animals

	CD	HF
Body mass (g)	33.0±1.6	49.4±1.9*
Food intake (g/24h)	5.78±0.69	6.28±0.77
Glucose (mg/dL)	126±5	301±13*
Insulin (ng/mL)	5.9±1.1	12.4±2.4*
Triglycerides (mg/dL)	92.2±12.1	94.4±10.5

* $p < 0.05$. CD, control diet; HF, high-fat diet.

Legends for the figures

Figure 1- Male Swiss mice were fed on control (CD) or high-fat (HF) diets for 8 w. In A, 4.0 μm sections were obtained from livers and employed in regular hematoxylin-eosin staining; a typical lobule is depicted, CL (centro-lobular vein). In B, total protein extracts were prepared from intact livers, separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-IL-10, IL-6, IL-1 β and TNF- α antibodies. In C and D, mice fed on HF diet for 8 w were treated with an intraperitoneal daily dose of scrambled (HF-SCR) or antisense (HF-ASO) oligonucleotide anti-PGC-1 α for 8 d. At the end of the experimental period, livers were obtained for: Total protein extract preparation for typical immunoblotting (IB) as described in B, using antibodies against PGC-1 α (PGC1) or IL-10 (C); or for typical hematoxylin-eosin staining of 4.0 μm liver sections, as described in A, CL (centro-lobular vein) (D). In E, mice fed on HF diet for 8 w were treated with a daily dose of saline (SL), rabbit pre-immune serum (PS) or anti-IL-10 antiserum (Ab) for four days; at the end of the experimental periods livers were obtained for total protein extract preparation for typical immunoblotting (IB) as described in B, using antibodies against IL-6, IL-1 β or TNF- α . In all experiments, $n = 5$; photomicrographs and blots are representative of typical experiments. Black scale bars in A and D correspond to 50 μm .

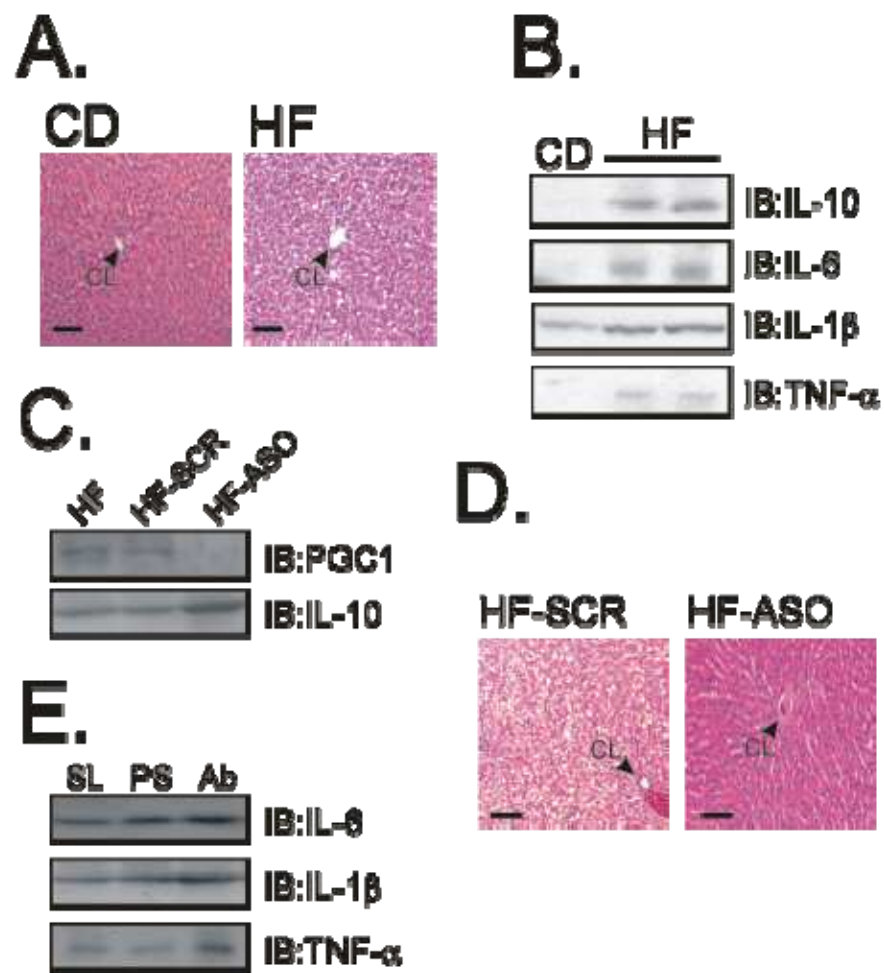
Figure 2- In A, 150 μg total protein extracts from hepatocyte cell culture (Hep), intact liver (Liv) or intact thymus (Thy) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-F4/80 antibodies. In B-F, primarily cultivated hepatocytes were treated with saline (CT), saturated fatty acids (SAT) or oleic acid (UNS) for 16 h and the mRNA expressions of IL-10 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D), IL-6 (E) and PGC-1 α (F) were determined by real-time PCR. In A, $n = 5$, blot is representative of typical experiment. In B-F, $n = 4$, * $p < 0.05$ vs. CT.

Figure 3- In A, isolated hepatocytes were cultivated on glass slides and treated for 3 h with saline (CT), oleic acid (UNS) or saturated fatty acids (SAT). At the end of the experimental period, cells were fixed and used in immunofluorescence staining with anti-p50, -c-Maf, or -PGC-1 α (PGC1) antibodies; the secondary antibodies were conjugated with rhodamine (red), nuclear counterstaining was performed with DAPI (blue). In B, 150 μ g total protein extracts from primarily cultivated hepatocytes treated for 16 h with saline (CT), oleic acid (UNS) or saturated fatty acids (SAT) were used in immunoprecipitation (IP) experiments with anti-PGC-1 α (PGC1), -p50 or -c-Maf antibodies; the immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti- PGC-1 α (PGC1), -p50 or -c-Maf. In A, microphotographs are representative of three distinct experiments, yellow scale bar corresponds to 10 μ m. In B, blots are representative of five distinct experiments.

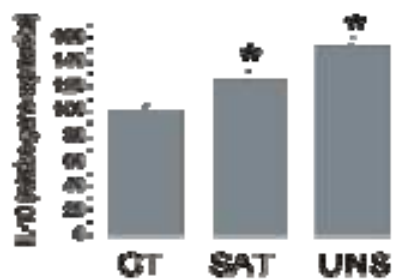
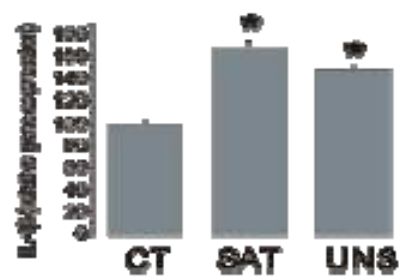
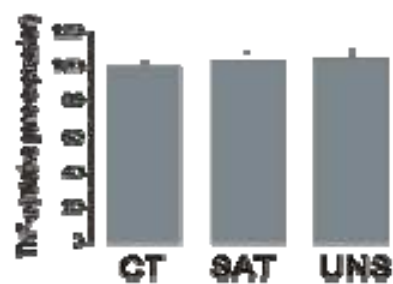
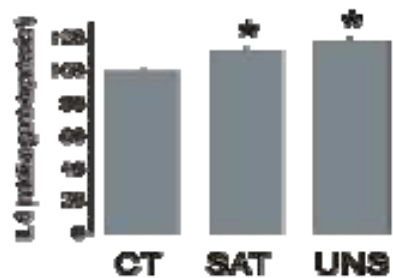
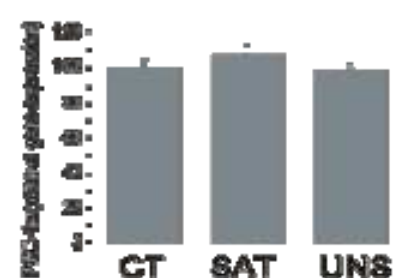
Figure 4- In A are depicted the approximate positions of the primers (P1-6) used to screen the promoter region of the IL-10 (*Rattus norvegicus* chromosome 13 from base 4065481 to base 4066080) by ChIP assay; the TATA box is depicted in green; pair of primers 2 is in blue and pair of primers 4 is in red underlined, bases in the yellow box are common for primers 2 and 4. In B, a ChIP assay was run and immunoprecipitated DNA amplified by primers 3 and 4 is shown (238bp); C+, positive control; C-, negative control; PGC1, immunoprecipitate anti-PGC-1 α ; p50, immunoprecipitate anti-p50; c-Maf, immunoprecipitate anti-c-Maf; SAT, cells treated with saturated fatty acids; UNS, cells treated with oleic acid; Veh, cells treated with vehicle. Figure is representative of three independent experiments.

Figure 5- Primarily cultivated hepatocytes were treated with saline (CT), oleic acid (UNS), salicylic acid (ASA) or salicylic acid plus oleic acid (ASA+UNS). The mRNA expression of IL-10 (B) was determined by real-time PCR. The phosphorylation of I κ B was determined by immunoblot (IB) and the association of PGC-1 α with p50 was determined by immunoprecipitation followed by immunoblot. In A, n = 4, *p<0.05 vs. CT. In B, blots are representative of five distinct experiments.

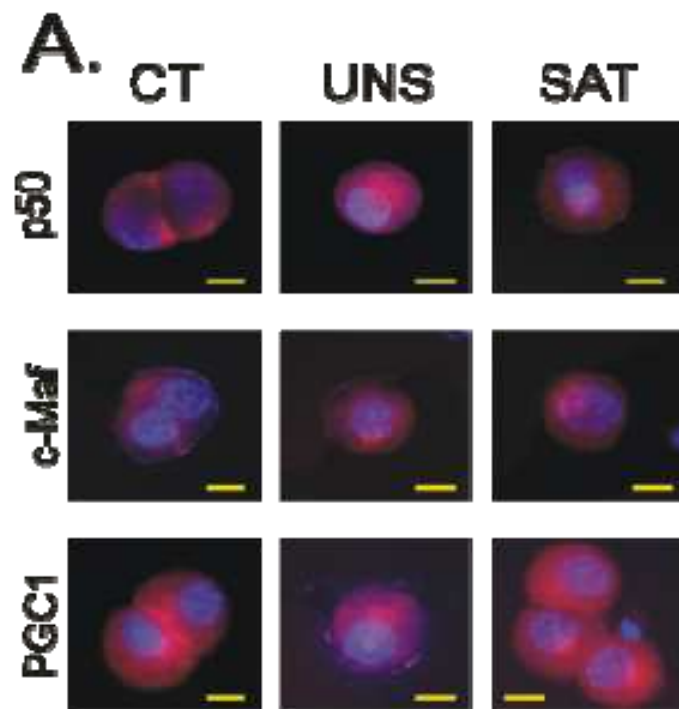
Figure 6- Schematic model of fatty acid – induced activation of IL-10 gene transcription through the associations of PGC-1 α with p50-NF κ B and c-Maf. Under basal conditions, PCG-1 α , p50 (complexed with p65/I κ B) and c-Maf are in the cytosol (some c-Maf may be present in the nucleus, as shown in Figure 4B). Following fatty acid stimulation, complexes are formed and migrate to the nucleus. The role of PGC-1 α (as co-activator or repressor) in these complexes is unknown.



Morari et al. Figure 1

A.**B.****C.****D.****E.****F.**

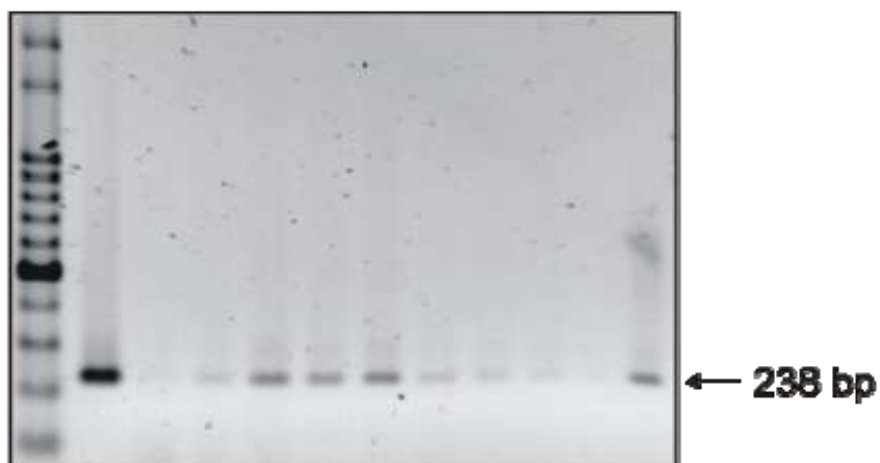
Morari et al. Figure 2



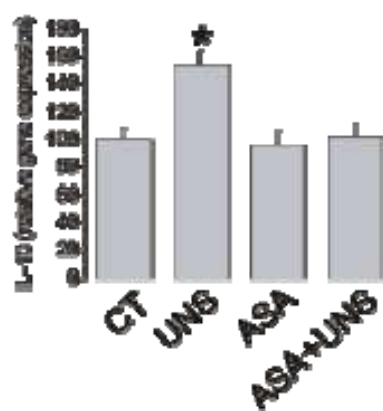
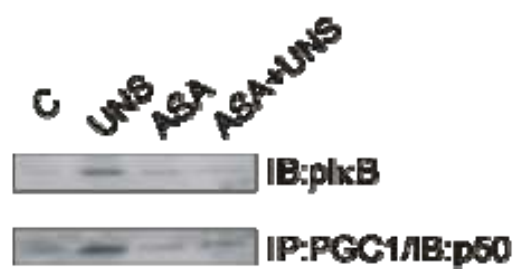
Morari et al. Figure 3

[illegible]

C* C- PGC1/SAT
P50/SAT
c-Maf/SAT
PGC1/UNS
P50/UNS
c-Maf/UNS
PGC1/Veh
P50/Veh
c-Maf/Veh

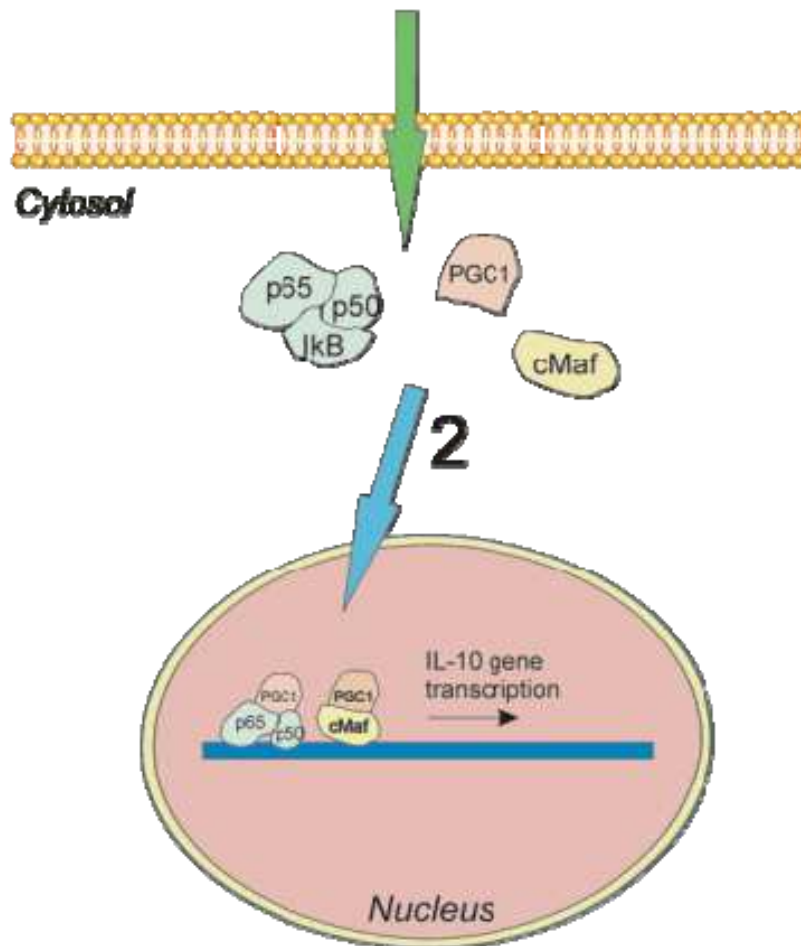


Morari et al. Figure 4

A.**B.**

Morari et al. Figure 5

FATTY ACIDS



Morari et al. Figure 6

5- DISCUSSÃO GERAL

Para que se obtenham avanços consistentes na prevenção e terapêutica da esteato-hepatite não alcoólica e da sua progressão para cirrose hepática, há necessidade de se caracterizarem os mecanismos que exerçam papel central no seu desenvolvimento. Por se tratar de uma doença com características inflamatórias, porém intimamente associada à disfunção metabólica, é possível que fatores comuns à resposta imune local e à função metabólica do fígado desempenhem papel importante na sua gênese e evolução. Neste estudo explorou-se a hipótese de que uma proteína primariamente envolvida com a transcrição de genes que desempenham funções metabólicas do fígado, a PGC-1 α , pudesse participar do controle de fatores de transcrição envolvidos com a regulação da resposta imune em células hepáticas.

A fundamentação para tal hipótese surgiu a partir de estudos pregressos de nosso grupo nos quais, ao se modular a expressão de PGC-1 α , promoveu-se uma redução da resistência à insulina no fígado, o que se acompanhou da melhora do quadro de esteato-hepatite de acordo com parâmetros morfológicos, bioquímicos, endócrinos e imunológicos³⁰.

Dentre os fatores imunológicos regulados quando da redução da PGC-1 α no fígado, a elevação dos níveis hepáticos de IL-10 mereceu especial atenção em decorrência de recentes evidências a respeito de seu potencial papel na determinação do curso evolutivo da NAFLD^{21,22,44}.

Em estudos experimentais e clínicos, a elevação dos níveis de IL-10 está relacionada a uma melhora da disfunção hepática associada a esteato-hepatite não alcoólica^{21,45-47}. Além disso, ao se reduzir a expressão ou a atividade da IL-10 há substancial aumento da concentração de fatores inflamatórios no fígado, concorrendo para acentuação da resistência local à insulina, e progressão da disfunção metabólica hepática²³.

Na primeira parte deste estudo reproduzimos alguns experimentos que mostram o efeito da exposição de camundongos Swiss à dieta hiperlipídica. Esta cepa de camundongos tem grande predisposição ao desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e esteato-hepatite⁴⁸, já tendo sido utilizada por nosso grupo e por outros para estudos metabólicos^{30,49}. Em paralelo a um claro aumento do conteúdo hepático de lípidos,

há uma elevação da concentração de citocinas inflamatórias e de IL-10 no fígado dos animais tratados com a dieta rica em gordura. Nesta situação, como explorado anteriormente ³⁰, há também aumento da concentração hepática de PGC-1 α . Ao inibir a expressão de PGC-1 α observamos um paralelo aumento de IL-10, fenômeno que já conhecíamos, porém não havíamos publicado, portanto, este é o primeiro relato da regulação, *in vivo*, da expressão de IL-10 por PGC-1 α .

A seguir, reproduzimos parcialmente alguns experimentos publicados previamente ²³, nos quais, ao se inibir a atividade de IL-10, promove-se o aumento da atividade inflamatória no fígado, o que é evidenciado pelo aumento da expressão das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α . Desta forma, estabeleceu-se uma conexão linear entre PGC-1 α , IL-10 e disfunção hepática. Passamos então a avaliar se tal associação ocorreria em um sistema celular isolado e se haveria participação de fatores de transcrição envolvidos com a regulação do gene da IL-10.

A qualidade da preparação de hepatócitos isolados foi avaliada por dois métodos distintos que mediram a expressão do marcador de ativação de fagócitos, F4/80. Tal marcador foi avaliado por imunoblot, de acordo com o resultado apresentado na Figura 2A do artigo, e também por citometria de fluxo (resultado apresentado como anexo). Por ambas as técnicas não houve detecção significativa do marcador, confirmando a pureza da cultura de hepatócitos.

Numa abordagem que visa reproduzir, em cultura, a exposição a uma dieta hiperlipídica, os hepatócitos foram tratados com uma mistura de ácidos graxos saturados ou com ácido oléico puro. Ambos os tratamentos levaram ao aumento da expressão de IL-10, IL-6 e IL-1 β , porém não exerceram efeito significativo sobre a expressão de PGC-1 α e TNF- α .

A expressão do mRNA de IL-10 aumenta nos tratamentos tanto com a mistura de ácidos graxos saturados quanto com o ácido graxo insaturado, sendo 20% maior nos tratamentos com saturado e 50% maior nos tratamentos com insaturado, em relação ao controle. Nishitani ⁵⁰ também obtiveram resultados semelhantes, notando aumento na expressão de IL-10 no tratamento de hepatócitos com os dois tipos de ácidos graxos. O mRNA da citocina pró-inflamatória IL-6 também se eleva com ambos os tratamentos,

porém, com menor magnitude que a elevação de IL-10. É possível que a IL-6 se eleve como resposta inflamatória aos estímulos gerados pelo tratamento dos hepatócitos com ácidos graxos. Entretanto, alguns trabalhos apontam a IL-6 como um importante fator de reparo e regeneração celular do fígado. Taub⁵¹ e Cressman⁵² mostram que animais *knockout* para o gene da IL-6 não apresentam correta regeneração do fígado, desenvolvendo necrose quando expostos a estímulos lesivos. No modelo explorado no nosso estudo não podemos afirmar se a elevação da IL-6 se deva a uma real resposta inflamatória ou a um estímulo de reparo a possíveis danos celulares causados pela exposição aos ácidos graxos. De qualquer forma fica claro que, assim como em animais vivos, a exposição direta de hepatócitos a ácidos graxos ativa a transcrição de IL-6. Da mesma forma, IL-1 β , também uma citocina pró-inflamatória, apresentou aumento de expressão em resposta aos dois tipos de tratamento com ácidos graxos, e a razão para tal, na nossa opinião, é que se trate de uma resposta inflamatória.

Fato interessante e que merece um comentário específico se refere à não modulação do TNF- α em resposta aos ácidos graxos. Acreditamos que o hepatócito tenha a capacidade de responder à estímulos inflamatórios produzindo a citocina anti-inflamatória IL-10, mas não participa com a mesma intensidade na produção de TNF α . É possível que em fígados íntegros de animais submetidos à dieta hiperlipídica, as células de Kupffer sejam as principais responsáveis pelo estímulo inflamatório local, sendo assim as responsáveis pela produção de TNF- α . Os hepatócitos apenas responderiam ao estímulo de TNF- α , produzindo não apenas a citocina anti-inflamatória IL-10, mas também outras citocinas pró-inflamatórias em resposta à TNF- α , visto que este, ao ligar-se à seu receptor principal, TNFR1, desencadeia a produção de ambos os tipos de citocinas (pró- e anti-inflamatórias) através do fator de transcrição nuclear NF κ B^{8,53}.

A seguir, investigamos, se, sob estímulo com ácidos graxos, ocorreria a migração de PGC-1 α e dos fatores de transcrição NF κ B e c-Maf para o núcleo de hepatócitos, e se PGC-1 α se associa fisicamente a estas proteínas. Observamos por meio de imunocitoquímica que p50 e PGC-1 α têm localização preferencial no citosol, com pouquíssima marcação nuclear nos hepatócitos controle, entretanto, após estímulo com ácidos graxos há um claro deslocamento das proteínas para o núcleo. Com relação a c-Maf, apesar de, na situação basal sua localização ser predominantemente citosólica, é possível

observar com clareza, alguma marcação nuclear, a qual aumenta após o tratamento com ácidos graxos. Além disso, o tratamento com ácidos graxos induz a associação entre PGC-1 α e ambos os fatores de transcrição, c-Maf e p50. Na verdade, algum grau de associação já é observado em estado basal, sem tratamento com ácidos graxos, porém um aumento considerável da associação ocorre após o tratamento. Nenhum estudo pregresso havia investigado tais fenômenos, sendo portanto, este o primeiro relato a respeito do efeito de ácidos graxos no deslocamento de PGC-1 α para o núcleo e de sua associação aos dois fatores de transcrição aqui estudados.

Estudos pregressos mostram que o fator de transcrição NF κ Bp50 está envolvido na transcrição do gene da IL-10. p50 atua sob a forma de homodímeros, os quais se associam com ativadores de transcrição, como CREB, por exemplo, seguindo em direção ao núcleo a fim de se associar à região promotora do gene da IL-10, ativando sua transcrição ²⁴. Outros estudos também revelam a atividade de fator de transcrição de c-Maf sobre o gene da IL-10. Cao, S. et al., ²⁵ mostraram que a IL-4, fator principal para a diferenciação das células do sistema imunológico T helper (Th) em T helper 2 (Th2), é capaz de regular a expressão de c-Maf e sua ligação ao promotor do gene da IL-10 em macrófagos humanos. Para avaliar se o tratamento de hepatócitos com ácidos graxos leva à associação de p50 e c-Maf, além de PGC-1 α , ao promotor de IL-10 utilizamos a técnica de imunoprecipitação de cromatina, ChIP. De acordo com os nossos resultados, as três proteínas se associaram a uma região proximal ao TATA Box sugerindo a formação de um complexo protéico que deve exercer um controle sobre a transcrição de IL-10. É interessante ressaltar que c-Maf é encontrado ligado a essa região mesmo antes do tratamento o que corrobora nosso achado por imunocitoquímica que sugeria que alguma quantidade de c-Maf localiza-se constitutivamente no núcleo de hepatócitos. Este achado é consistente com o trabalho recentemente publicado por ²⁵, no qual é demonstrado que a proteína c-Maf teria ligação ao promotor do gene da IL-10 mesmo em controles, o que sugere que essa proteína participa do controle basal da expressão de IL-10.

Por fim, para avaliar se os fenômenos aqui descritos eram específicos, inibimos a via de sinalização através de NF κ B utilizando o antiinflamatório ácido acetilsalisílico ^{54,55}. Com esta abordagem reduzimos a expressão de IL-10 induzida por ácidos graxos o que se acompanhou de uma menor associação entre p50 e PGC-1 α .

6- CONCLUSÃO

- A inibição da expressão de PGC-1 α promove um aumento da expressão hepática de IL-10;
- Em hepatócitos isolados o tratamento com ácidos graxos induz o aumento da expressão de IL-10 e de algumas citocinas inflamatórias;
- Sob estímulo com ácidos graxos PGC-1 α se associa com os fatores de transcrição c-Maf e p50 e migra para o núcleo de hepatócitos ligando-se à região promotora do gene da IL-10.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velloso, L.A. [The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50, 165-176 (2006).
2. Baskin, M.L., Ard, J., Franklin, F. & Allison, D.B. Prevalence of obesity in the United States. *Obes Rev* 6, 5-7 (2005).
3. Uauy, R., Albala, C. & Kain, J. Obesity trends in Latin America: transiting from under- to overweight. *J Nutr* 131, 893S-899S (2001).
4. Kopelman, P.G. Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643 (2000).
5. Farrell, G.C. & Larter, C.Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99-S112 (2006).
6. Musso, G., et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37, 909-916 (2003).
7. Shoelson, S.E., Herrero, L. & Naaz, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180 (2007).
8. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867 (2006).
9. Tergaonkar, V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1647-1653 (2006).
10. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054 (2000).
11. Werner, E.D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M. & Shoelson, S.E. Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem* 279, 35298-35305 (2004).
12. Aguirre, V., et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-1537 (2002).

13. Carvalheira, J.B. & Saad, M.J. [Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50, 360-367 (2006).
14. Dela Pena, A., et al. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 129, 1663-1674 (2005).
15. Choi, S. & Diehl, A.M. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 702-707 (2005).
16. Yeh, M.M. & Brunt, E.M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 128, 837-847 (2007).
17. O'Garra, A., et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol* 2, 821-832 (1990).
18. Fiorentino, D.F., et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451 (1991).
19. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. & O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147, 3815-3822 (1991).
20. Strackowski, 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* 28, 2036-2037 (2005).
21. Kim, H.J., et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060-1067 (2004).
22. den Boer, M.A., et al. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 147, 4553-4558 (2006).
23. Cintra, D.E., et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 48, 628-637 (2008).

24. Cao, S., Zhang, X., Edwards, J.P. & Mosser, D.M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 281, 26041-26050 (2006).
25. Cao, S., Liu, J., Song, L. & Ma, X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol* 174, 3484-3492 (2005).
26. Blank, V., Kim, M.J. & Andrews, N.C. Human MafG is a functional partner for p45 NF-E2 in activating globin gene expression. *Blood* 89, 3925-3935 (1997).
27. Kataoka, K. Multiple mechanisms and functions of maf transcription factors in the regulation of tissue-specific genes. *J Biochem* 141, 775-781 (2007).
28. Motohashi, H., et al. MafG sumoylation is required for active transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 26, 4652-4663 (2006).
29. Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W. & Glimcher, L.H. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973-983 (1996).
30. De Souza, C.T., et al. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 48, 1860-1871 (2005).
31. Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P. & Spiegelman, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 277, 1645-1648 (2002).
32. Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D. & Kralli, A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 277, 13918-13925 (2002).
33. Andersson, U. & Scarpulla, R.C. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 3738-3749 (2001).

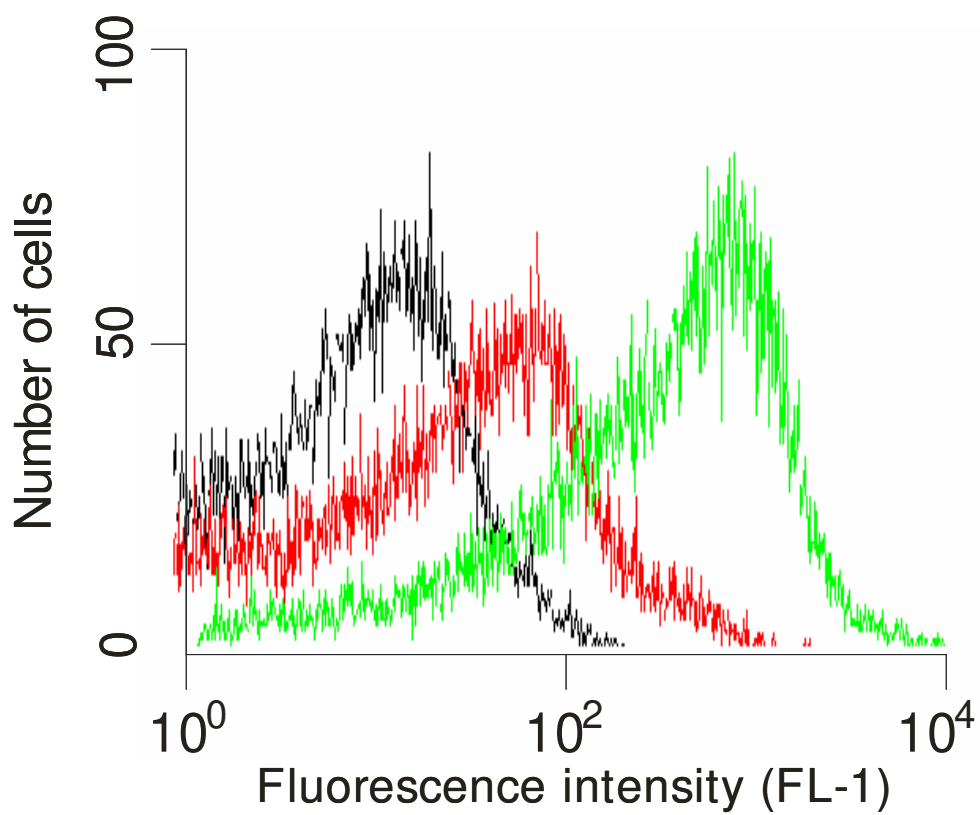
34. Puigserver, P. & Spiegelman, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78-90 (2003).
35. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141 (2000).
36. Esterbauer, H., Oberkofler, H., Krempler, F. & Patsch, W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 62, 98-102 (1999).
37. Knutti, D., Kaul, A. & Kralli, A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20, 2411-2422 (2000).
38. Puigserver, P., et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839 (1998).
39. Herzig, S., et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183 (2001).
40. De Souza, C.T., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia* 46, 1522-1531 (2003).
41. Yoon, J.C., et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138 (2001).
42. Finck, B.N. & Kelly, D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116, 615-622 (2006).
43. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
44. Esposito, K., et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1055-1058 (2003).

45. Santucci, L., et al. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 111, 736-744 (1996).
46. Louis, H., et al. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 25, 1382-1389 (1997).
47. Le Moine, O., et al. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 22, 1436-1439 (1995).
48. Rossmeisl, M., Rim, J.S., Koza, R.A. & Kozak, L.P. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 52, 1958-1966 (2003).
49. Pitombo, C., et al. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol* 191, 699-706 (2006).
50. Nishitani, Y., et al. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 42, 32-35 (2007).
51. Taub, R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* 10, 413-427 (1996).
52. Cressman, D.E., et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383 (1996).
53. Feldstein, A.E., et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40, 185-194 (2004).
54. Kopp, E. & Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265, 956-959 (1994).
55. Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M. & Spano, P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science* 274, 1383-1385 (1996).

8- ANEXO

Análise da expressão de F4/80 por citometria de fluxo

Overlayde hepatócitos (rato) X monócitos de sangue periférico (humano)



Preto: Monócitos Controle

Vermelho: Hepatócitos

Verde: Monócitos Paciente Obeso

