



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARESSA FERNANDES BONFIM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TUDCA NA DEPOSIÇÃO DE
GORDURA HEPÁTICA E NA REGULAÇÃO DO
METABOLISMO DOS ÁCIDOS BILIARES DURANTE A
RESTRIÇÃO PROTEICA**

CAMPINAS/2021

MARESSA FERNANDES BONFIM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TUDCA NA DEPOSIÇÃO DE GORDURA
HEPÁTICA E NA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DOS ÁCIDOS BILIARES
DURANTE A RESTRIÇÃO PROTEICA**

**TUDCA EFFECTS ON HEPATIC FAT DEPOSITION AND REGULATION OF BILE
ACID METABOLISM DURING PROTEIN RESTRICTION**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the Master's degree in Functional and
Molecular Biology, with majors in
Physiology.*

*Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Coorientador: Dr. Jean Francesco Vettorazzi*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARESSA
FERNANDES BONFIM ORIENTADA PELO
PROF DR EVERARDO MAGALHÃES
CARNEIRO.

CAMPINAS/ 2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B641a Bonfim, Maressa Fernandes, 1990-
Avaliação dos efeitos do TUDCA na deposição de gordura hepática e na regulação do metabolismo dos ácidos biliares durante a restrição proteica / Maressa Fernandes Bonfim. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.
Coorientador: Jean Franciesco Vettorazzi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido tauroursodesoxicólico. 2. Fígado gorduroso. 3. Ácidos e sais biliares. 4. Desnutrição proteica. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Vettorazzi, Jean Franciesco, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: TUDCA effects on hepatic fat deposition and regulation of bile acid metabolism during protein restriction

Palavras-chave em inglês:

Tauroursodeoxycholic acid

Fatty liver

Bile acids and salts

Protein deficiency

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

João Paulo Gabriel Camporez

Adriana Souza Torsoni

Data de defesa: 03-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8033-4278>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4570057438059263>

Campinas, 03 de Dezembro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez

Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros, encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha mãe, Valéria, e ao meu pai, Marcos, por todo suporte que me deram durante à minha trajetória acadêmica, mesmo nem sempre compreendendo as minhas escolhas no processo. À minha irmã, Aira, por toda escuta e apoio. Ao meu maior companheiro, José Maria, que me inspira todos os dias à me apaixonar pela ciência e pela vida. E à minha filha Maria, que me dá muita canseira mas me mostra o que é o amor todos os dias.

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Dr. Everardo Magalhães Carneiro, que me deu essa oportunidade quando nem eu mesma sabia que a queria. Pela confiança depositada no meu trabalho e possibilidade de aprendizado e crescimento profissional.

Ao Dr. Jean Franciesco Vettorazzi, que me deu co-orientação, ensinamentos e ainda me presenteou com uma maravilhosa amizade.

Ao Thiago Araújo dos Reis, que tem muita paciência para me ensinar e me ajudar a tomar novos rumos quando me sinto perdida. Às colegas de laboratório, Lohanna Monali, Bruna Lourençoni, Kênia Moreno e Israelli Freitas, sem vocês esse trabalho não teria saído (ou talvez com bem mais dificuldade). Aos Drs. Sandra Mara Ferreira, Renato C. S. Branco e Gabriela Soares, que me ajudam sempre e me inspiram cientificamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Também contou com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 131233/2019, e também da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Auxílio à Pesquisa- Temático: 18/26080- 4.

RESUMO

A desnutrição ainda acomete milhares de pessoas em todo mundo e durante as fases iniciais da vida, leva ao comprometimento no desenvolvimento de órgãos essenciais à manutenção do metabolismo glicêmico, lipídico e energético. No fígado, acarreta o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), e que podem estar associadas ao aumento do *pool* de ácidos biliares (AB). O ácido biliar tauroursodesoxicólico (TUDCA), tem sido proposto como uma estratégia terapêutica pois, regula o metabolismo energético e lipídico, atua na redução do estresse de retículo e da inflamação decorrente do aumento de gordura no fígado. O objetivo do atual trabalho foi investigar se a desnutrição proteica promove o aumento de gordura hepática associado à desregulação no metabolismo dos ácidos biliares. Também foi investigar o papel do TUDCA como um possível agente terapêutico no tratamento da doença hepática. Para isso utilizamos linhagem de hepatoma humano (HepG2) tratados com L-histidinol (LH), fármaco que simula a desnutrição e camundongos C57BL/6 recém desmamados tratados com dieta controle com 14% de proteínas totais (C) ou tratados com dieta com 6% proteínas totais (R). Tanto as células tratadas com LH quanto o grupo R apresentaram aumento no conteúdo hepático de gordura, que foi associado ao aumento da concentração de AB totais. Depois, o grupo R recebeu durante 15 dias, aplicação diária intraperitoneal de TUDCA na concentração de 300mg/kg de peso (RT). O grupo RT apresentou redução do conteúdo hepático de gorduras em relação ao grupo R, o que pode estar relacionado à maior exportação hepática de VLDL, visto que normalizou os níveis séricos de triglicerídeos. O tratamento com o TUDCA também reduziu marcadores do estresse de retículo e de inflamação, o que pode ter contribuído para a melhora do acúmulo de gordura hepática encontrada nos animais R. O TUDCA também reduziu a expressão proteica de enzimas responsáveis pela síntese dos AB, embora não tenha influenciado no conteúdo sérico total desses compostos quando comparado ao grupo R.

ABSTRACT

Undernutrition still affects thousands of people around the world and during the early stages of life, undernutrition leads to impairment in the development of organs essential to the maintenance of glucose, lipid and energy metabolism. In the liver, it causes the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which may be associated with an increase in the pool of bile acids (BA). The tauroursodeoxycholic bile acid (TUDCA) has been proposed as a therapeutic strategy because it regulates energy and lipid metabolism, acts in the reduction of reticulum stress and inflammation resulted from the increased fat in the liver. The aim of the current work was to investigate whether the current protein malnutrition promotes the increase in liver fat associated with impaired in the metabolism of bile acids. It was also investigated the role of TUDCA as a possible therapeutic agent in the treatment of liver disease. For this, we used a human hepatoma cellular lineage treated with L-histidinol (LH), a drug that mimics malnutrition and newly weaned C57BL/6 mice treated with a control diet with 14% of total protein (C) or treated with a diet with 6% of total protein (R). Both the LH and the R group showed increased fat liver content that was associated with an increase in the concentration of total BA. Afterwards, the R group received, for 15 days, a daily intraperitoneal administration of TUDCA at a concentration of 300mg/kg of weight (RT). The RT group presented a reduction in the hepatic fat content compared to the R group, which may be related with higher hepatic VLDL export, as it normalized the serum levels of triglycerides. Treatment with TUDCA also reduced markers of endoplasmatic reticulum stress and inflammation, which may have contributed to the improvement in the accumulation of liver fat found in R animals. TUDCA also reduced the protein expression of enzymes responsible for the BA synthesis, although has not influenced the total serum content of these compounds when compared to the R group.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAR – Via de resposta a aminoácidos
AB – Ácidos Biliares
ACC - Acetil-CoA carboxilase
AG – Ácidos graxos
ACOX-1 - Acil-coenzima peroxissômica A oxidase 1
AKT – Proteína quinase B
Apo-B - Apolipoproteína do tipo B
ATF4 – Ativador do fator de transcrição 4
ATF6 – Ativador do fator de transcrição 6
BAAT – Enzima *bile acid amino acid transferase*
BAC – Enzima *bile acid coenzyme A synthase*
BIP - Proteína de ligação a imunoglobulina
CA – Ácido biliar cólico
CDCA – Ácido biliar chenodeoxicólico
ChREBP- proteína de ligação responsiva ao carboidrato
CHOP - proteína homóloga C/EBP
CPT-1 - Enzima carnitina palmitoiltransferase 1
CYP27A1 - Enzima mitocondrial esterol-27-hidroxilase
CYP7A1 – Enzima 7 α -hidroxilase
DCA – Ácido biliar deoxicólico
DEP – Desnutrição proteico-energética
DHGNA – Doença hepática gordurosa não-alcóolica
DM2 – Diabetes *mellitus* do tipo 2
EIF2 α - *Eukaryotic translation initiation factor 2 α*
ER – Retículo endoplasmático
ERK 1/2 - *Extracellular signal-regulated kinases 1/2*
FADH – Flavina adenina dinucleotídeo
FAS - Ácido graxo sintetase
FGF15/19 - *Fibroblast growth factor-15/19*
FGFR4 - *Fibroblast growth factor receptor 4*
FXR - *Farnesoid x receptor*

GCN2 - *General control nonderepressible 2*

HNF4 α - *Hepatocyte nuclear factor-4 α*

IL1- β – Interleucina 1 beta

JNK - *c-Jun N-terminal kinase*

LCA – Ácido biliar litocólico

LRH-1 - *Liver related homolog 1*

LPL – Lipoproteína lipase

LXR - Receptor nuclear X do fígado

MTP – Proteína microssomal de transferência de triglicérides

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PPAR α - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo alfa

RXR - *retinoid x receptor*

SHP - *Small heterodimer partner*

SREBP1-c - Proteína 1 de ligação ao elemento regulador do estero

TG – Triglicerídeos

TGR5 - G protein-coupled bile acid receptor 1

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TUDCA – Ácido biliar Tauroursodesoxicólico

UDCA – Ácido biliar Ursodesoxicólico

VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa

XBP1s - proteína 1 de ligação x-box

β -MCA – Ácido biliar beta-muricólico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Desnutrição energético-proteica.....	12
1.2. Doença hepática gordurosa não alcóolica.....	13
1.3. Desnutrição e DHGNA.....	15
1.4. Ácidos Biliares.....	15
1.5. Ácidos biliares, metabolismo lipídico e desnutrição.....	17
1.6. Ácido Tauroursodesoxicólico.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Modelo Experimental.....	19
3.1.1. Cultura Celular.....	19
3.1.2. Animais.....	19
3.2. Pesagem e controle da ingestão alimentar.....	20
3.3. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT).....	21
3.4. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT).....	21
3.5. Análises Sorológicas.....	21
3.6. Extração de lipídeos totais, dosagem de triglicerídeos e colesterol total hepático	21
3.7. Dosagem de ácidos biliares totais.....	22
3.8. Western Blot.....	22
3.9. qRT -PCR.....	23
3.10. Quantificação de lipídeos neutros por Oil Red O (ORO).....	25
3.11. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS	26
4.1. Indução da desnutrição em células HepG2.....	26
4.2. Caracterização do modelo experimental.....	27
4.3. Avaliação da homeostase glicêmica.....	29
4.4. Avaliação do perfil lipídico sérico.....	30
4.5. Avaliação do perfil lipídico hepático.....	31
4.6. Caracterização do modelo experimental após tratamento com TUDCA.....	33

4.7.	Avaliação do perfil lipídico após tratamento com TUDCA.....	35
4.8.	Avaliação das vias de lipogênese, β -oxidação e exportação hepática de lipídeos.....	37
4.9.	Avaliação do estresse de retículo.....	39
4.10.	Avaliação do metabolismo dos ácidos biliares.....	40
4.11.	Avaliação do processo inflamatório hepático.....	43
5.	DISCUSSÃO.....	43
6.	CONCLUSÃO.....	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXO I.....	65
	ANEXO II.....	66

1.INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição energético-proteica

Apesar de esforços globais, a desnutrição energético-proteica (DEP) ou também subnutrição ainda é um problema grave que afeta cerca de 200 milhões de crianças, principalmente em países em desenvolvimento, sendo responsável por até 45% das mortes de crianças abaixo de 5 anos de idade (WHO, 2018). A subnutrição é definida como uma condição clínica decorrente da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais, associada a inadequadas políticas sociais, econômicas e sanitárias (BHUTTA *et al.*, 2017). Pode ser categorizada em duas principais formas clínicas considerando os macronutrientes proteicos e não proteicos.

Quando decorrente do aporte de energia insuficiente para suprir as demandas metabólicas e de crescimento normal, a DEP induz perda de peso significativa, principalmente devido a depleção do tecido muscular esquelético e adiposo, e é classificada como desnutrição do tipo marasmo. Por outro lado, a desnutrição do tipo *Kwashiorkor*, resulta da deficiência predominante de proteínas na dieta e é clinicamente caracterizada pelo desenvolvimento de edema periférico, além de lesões de pele, redução do crescimento, hepatomegalia, disfunção do sistema imune e de diversos órgãos. Há a possibilidade de ocorrer a associação entre as duas manifestações clínicas supracitadas, caracterizando a desnutrição do tipo marasmo-*Kwashiorkor* (BHATTACHARYYA, 1986; BHUTTA *et al.*, 2017).

A deficiência nutricional nas primeiras fases de vida leva a um comprometimento estrutural e funcional de diversos órgãos, principalmente os responsáveis pelo controle metabólico de nutrientes, como fígado, tecido adiposo, músculo e pâncreas, visando evitar danos à órgãos reguladores do crescimento e desenvolvimento, como o cérebro (HALES, 1997; MARTINS *et al.*, 2011). Após o consumo dos estoques de energia, como glicogênio e tecido adiposo, proteínas da musculatura esquelética são clivadas em aminoácidos para serem utilizados como fontes de energia. No entanto, a permanência do estado glicolítico e do catabolismo proteico não são suficientes para suprir a manutenção de vias essenciais de síntese de proteínas (WHITEHEAD; ALLEYNE, 1972; BHUTTA *et al.*, 2017). A deficiência de proteínas leva a ativação de vias de sinalização celular, como a de resposta a aminoácidos (AAR), que permite às células a se adaptarem ao estresse nutricional ou

então encaminhar a apoptose no caso de exaustão das vias adaptativas (GUO; CAVENER, 2007; HARO *et al.*, 2019). Assim, as respostas metabólicas-adaptativas resultantes da deficiência nutricional, contribui para o desenvolvimento de patologias na vida adulta associadas às condições crônicas, como obesidade, Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, doença arterial coronariana, dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), entre outras (SKOGEN; OVERLAND, 2012; BRENSEKE *et al.*, 2013; AMPONG *et al.*, 2020).

1.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica

Estima-se que 25% da população mundial tenha doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), com maior prevalência no Oriente Médio (32%) e na América do Sul (31%), sendo a doença hepática crônica mais comum (YOUNOSSI *et al.*, 2016). É caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado de indivíduos sem histórico de consumo excessivo de álcool e compreende um espectro de condições histológicas e histopatológicas classificadas de acordo com a sua gravidade (BERLANGA, 2014).

A DHGNA inicia-se com uma simples esteatose hepática, caracterizada pelo aumento da deposição de lipídeos no fígado, a qual com a progressão pode induzir inflamação, degeneração hepatocelular e deposição de colágeno resultando na esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). A progressão da EHNA com elevada fibrose resulta em cirrose hepática, que aumenta em 30 a 40% o risco para a ocorrência de carcinoma hepatocelular (PISCAGLIA *et al.*, 2016; ARAB, 2018). É considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica e a obesidade aumenta em 90% a chance de desenvolvimento da DHGNA, enquanto a DM2 em 70%. Também é fator de risco para o desenvolvimento de doenças como DM2, dislipidemias e hipertensão (ADAMS *et al.*, 2009; ARAB, 2018).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da DHGNA ainda não são totalmente elucidados, mas abrange uma gama de fatores que alteram o metabolismo de lipídeos e resultam em desequilíbrio entre a síntese e a degradação de triglicerídeos (TG) nos hepatócitos. O aumento do suprimento e da captação de ácidos graxos (AG) da circulação para os hepatócitos constitui um dos mecanismos importantes para a fisiopatologia desta doença, estes podem ser provenientes da lipólise do tecido adiposo ou da alimentação, principalmente, rica em gorduras (BERLANGA, 2014).

A via da *de novo* lipogênese também é responsável pelo aumento da deposição de gordura no fígado. Ocorre quando a capacidade de armazenamento do glicogênio hepático é saturada e a glicose então é redirecionada à síntese *de novo* AG. Nesse processo, a glicose é convertida em acetil-CoA e esse convertido em malonil-CoA pela enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC), o qual é transformado em ácido palmítico pelo complexo enzimático da ácido graxo sintetase (FAS) e então, direcionado para a síntese de TG (BERLANGA, 2014). As enzimas ACC e FAS são reguladas a nível transcricional pela ativação da proteína 1 de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP1-c) e também pela ativação da proteína de ligação responsiva ao carboidrato (ChREBP). Ambos os fatores de transcrição são regulados pelo receptor nuclear X do fígado (LXR) (HERMAN; SAMUEL, 2016; ARAB, 2018).

A redução da oxidação dos AG nos hepatócitos é outro fator que contribui para o aumento da deposição de lipídeos no fígado. Nos hepatócitos, os AG são oxidados na via da β -oxidação para a produção de energia e esse processo pode ocorrer dentro das mitocôndrias ou nos peroxissomos, a depender do tamanho da cadeia de carbono desses AG. Os AG são ativados pela acil-CoA-sintetase em acil-CoA e então transportados através da membrana mitocondrial externa pela enzima carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1), que os converte em acil-carnitina. Em seguida, a acil-carnitina é transferida para a matriz mitocondrial interna pela enzima CPT-2, que por sua vez, realiza o processo inverso ao da CPT-1, formando novamente acil-CoA. Esse então, passa por ciclos de β -oxidação no qual NADH e FADH são formados para a transferência de elétrons na cadeia respiratória. A β -oxidação ocorre predominantemente no estado de jejum, quando os valores de malonil-CoA estão baixos, sendo este um inibidor da CPT-1, enquanto que os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo alfa (PPAR α) é um ativador (AIRES *et al.*, 2010; BERLANGA, 2014; ARAB, 2018).

As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) são as principais responsáveis pela exportação dos TG do fígado para a circulação. A síntese dessas lipoproteínas se dá através da transferência de TG livre para a apolipoproteína do tipo B (Apo-B), dando origem a molécula de pré-VLDL. Essa transferência é realizada pela proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP), que posteriormente se unirá à pré-VLDL formando a VLDL madura, pronta para ser secretada pelo fígado. Caso haja prejuízos na expressão ou atividade da MTP, pode ocorrer diminuição da

secreção hepática de VLDL, o que aumenta a deposição de TG nos hepatócitos contribuindo para a instalação da DHGNA (LEWIS, 2002; BERLANGA, 2014).

1.3 Desnutrição e DHGNA

Apesar de muitos estudos terem mostrado a relação de DHGNA com a obesidade e o alto consumo de nutrientes, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que envolve a instalação dessa doença em situações de déficit nutricional de proteínas. Crianças hospitalizadas com desnutrição do tipo *Kwashiorkor*, apresentaram quadro de esteatose hepática, que pode estar associado ao aumento plasmático nos níveis de AG livres provenientes da lipólise do tecido adiposo (LEWIS *et al.*, 1964 e 1966). A oxidação dos AG também parece estar prejudicada na desnutrição devido ao aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e dos peroxissomos (BADALOO, 2006; BANDSMA *et al.*, 2010; VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016).

A exportação de TG também parece contribuir para o aumento de gordura no fígado decorrente da desnutrição. Macacos submetidos a restrição proteica apresentaram redução da secreção de VLDL (KUMAR, 1972), o que pode estar relacionado a redução de lipoproteínas plasmáticas verificado em crianças hospitalizadas com esteatose hepática e *Kwashiorkor* (FLORES, 1970; COWARD; WHITEHEAD, 1972). Por outro lado, a secreção de VLDL foi diretamente proporcional ao grau de severidade da esteatose hepática verificada em crianças com desnutrição severa, indicando que a exportação de TG do fígado pode não necessariamente estar relacionada com a instalação da esteatose hepática (BADALOO *et al.*, 2005).

A desnutrição vigente na anorexia impossibilita a ativação da via de síntese de AG no fígado (FLETCHER, 1966; TRUSWELL; MILLER, 1993). Também, a restrição de aminoácidos essenciais ativa a via de resposta a aminoácidos que irá inibir a via da lipogênese através da ativação da proteína quinase de controle geral não reprimido 2 (GCN2) e do ativador do fator de transcrição 4 (ATF4) (GUO; CAVENER, 2007; ANTHONY, 2013). Entretanto, vale ressaltar que os estudos são escassos e tanto modelos animais de restrição de proteínas quanto crianças alimentadas com déficit proteico, tendem a ter um aporte maior de carboidratos simples na dieta, para manter o aporte calórico, fator esse que poderia contribuir para o aumento da deposição de gordura hepática (AMPONG *et al.*, 2020).

1.4 Ácidos Biliares

Os ácidos biliares (AB) são moléculas produzidas nos hepatócitos a partir do catabolismo do colesterol, responsáveis pela absorção intestinal de gorduras, vitaminas lipossolúveis e drogas e também facilitam a secreção hepatobiliar de metabólitos endógenos e xenobióticos (CHIANG, 2009). É considerado um importante regulador do metabolismo hepático e disfunções na sua homeostase estão associadas à diversas doenças como colestase hepática, DHGNA, dislipidemia, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (CHIANG, 2009; LEFEBVRE *et al.*, 2009; CLAUDEL, 2011; POREZ, 2012).

O colesterol é convertido em AB através de 17 reações enzimáticas no fígado. A via clássica de síntese, responsável por até 90% do conteúdo total de AB, tem início com o colesterol sendo convertido em 7 α -hidroxicolesterol pela enzima 7 α -hidroxilase (CYP7A1). Os produtos dessa via são os AB primários cólico (CA) e chenodeóxicólico (CDCA) em humanos, sendo esse último substituído pelo β -muricólico (β -MCA) em roedores. A via alternativa de síntese de AB inicia-se com o colesterol sendo convertido em 27-hidroxicolesterol pela enzima mitocondrial esterol-27-hidroxilase (CYP27A1) até a formação do AB primário CDCA ou β -MCA, dependendo da espécie (RUSSELL, 2003).

Após sintetizados, a maioria dos AB são conjugados com os aminoácidos glicina ou taurina, através da amidação no grupo carboxila pela enzima *bile acid coenzyme A synthase* (BAC) e a enzima *bile acid amino acid transferase* (BAAT). A conjugação aumenta a solubilidade dos AB em pH ácido, previne a precipitação de Ca^{2+} , minimiza a absorção passiva e previne a clivagem pelas enzimas pancreáticas no intestino (LI; CHIANG, 2014). Uma vez no lúmen intestinal, os AB conjugados são desconjugados pela ação de bactérias e depois através da enzima 7 α -desidroxilase CA e CDCA são convertidos em AB secundários como o deoxicólico (DCA) e o litocólico (LCA), respectivamente. Quando em concentrações elevadas, AB hidrofóbicos como LCA, DCA e CDCA, são extremamente citotóxicos, induzem ao estresse oxidativo e ativam vias de necrose e apoptose celular (LEFEBVRE *et al.*, 2009; PEREZ; BRIZ, 2009; LI; CHIANG, 2014; WANG, 2014).

Os AB também atuam como moléculas sinalizadoras, que através de receptores nucleares e de membrana regulam o metabolismo de lipídeos, glicose e energético. Por isso, é importante a regulação de sua concentração e síntese. Os AB

retornam aos hepatócitos através da circulação entero-hepática e ativam o receptor de ácido biliar farnesóide X (FXR), que induz outro receptor nuclear denominado de pequeno parceiro heterodímero (SHP), que irá reprimir fatores de transcrição como o receptor homólogo do fígado 1 (LRH-1) e o fator nuclear alfa 4 do hepatócito (HNF4 α) e assim, inibir a transcrição da CYP7A1. Outra forma de reprimir a síntese de AB de maneira independente de SHP, é através da ativação do FXR intestinal que irá induzir o fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19) em humanos (análogo ao FGF15 em roedores), e esse, no hepatócito, irá se ligar ao receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR4) e inibir a transcrição da CYP7A1 (STAELS, 2010; LI; CHIANG, 2014).

1.5 Ácidos biliares, metabolismo lipídico e desnutrição

O receptor nuclear FXR têm papel importante na regulação do metabolismo de lipídeos. FXR induz a expressão da apolipoproteína C-II (Apo-C2) que é componente da molécula de VLDL e indutor da lipólise através da ativação da lipoproteína lipase (LPL). O FXR também controla a expressão de outros genes envolvidos no metabolismo dos triglicerídeos como outras apolipoproteínas (Apo-B, Apo-A1, Apo-C3) e receptor de VLDL (VLDLR). Também, reprime a lipogênese através da inibição da via do SREBP1-c e induz a β -oxidação dos AG via ativação de PPAR α (KAST *et al.*, 2001; STAELS, 2010; CHIANG, 2013; FUCHS, 2016). Por outro lado, a ativação de FXR-SHP induz a redução da exportação de VLDL, através da inibição do HNF4 α , que irá reduzir a transcrição e, consequentemente, a atividade da MTP e Apo-B (HIROKANE *et al.*, 2004).

Embora a relação não seja ainda totalmente elucidada, é comum encontrar elevações plasmáticas de AB totais em pacientes com DHGNA (BECHMANN *et al.*, 2013; MOUZAKI *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2018). Crianças hospitalizadas com desnutrição severa também apresentaram aumento de AB totais associado ao aumento da conjugação com glicina e da proporção de AB secundários hidrofóbicos (ZHANG *et al.*, 2016). Ratos submetidos à restrição de proteínas desenvolveram esteatose hepática com aumento do *pool* de AB totais e redução de AB conjugados à taurina (VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016). Sendo assim, é comum aferir que a DHGNA leva a alterações da concentração e composição dos AB.

1.6 Ácido Tauroursodesoxicólico

O tauroursodesoxicólico (TUDCA) é um AB proveniente da conjugação do AB secundário ursodesoxicólico (UDCA) ao aminoácido taurina e vem sendo utilizado como agente terapêutico em doenças hepáticas, por apresentar baixa toxicidade e se ligar a receptores como o receptor 1 de ácido biliar acoplado à proteína G (TGR5) e FXR (KUSACZUK, 2019). Sua abrangência farmacológica está relacionada a sua atividade de chaperona química, que promove a redução de marcadores de estresse de retículo e sua atividade anti-apoptótica e citoprotetora (COLELL *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2002; SCHOEMAKER *et al.*, 2004; CORTEZ; SIM, 2014).

O TUDCA tem demonstrado ser também opção terapêutica no tratamento da obesidade e diabetes. Isso porque, em estudos com humanos e modelo animal de obesidade e diabetes, o TUDCA proporcionou a melhora da sensibilidade à insulina, aumento do *clearance* de insulina e da massa de células beta pancreáticas (KARS *et al.*, 2010; VETTORAZZI *et al.*, 2017; BRONCZEK *et al.*, 2019). O tratamento com TUDCA em camundongos obesos *ob/ob* levou à redução do ganho de peso, da glicemia, aumento do gasto energético e da sinalização à leptina no hipotálamo (OZCAN *et al.*, 2009). Também, através da ativação de receptores como o FXR e TGR5, o TUDCA promoveu o aumento da secreção de insulina em ilhotas isoladas de camundongos estimuladas com alta glicose (DÜFER *et al.*, 2012; VETTORAZZI *et al.*, 2016).

O acúmulo excessivo de AB que ocorre em doenças que levam à colestase hepática pode ser prejudicial devido à ação citotóxica desses. A administração exógena de AB hidrofílicos e anti-colestáticos como o TUDCA têm se mostrado uma terapia eficiente para o efluxo e redução da toxicidade do excesso de AB (LI *et al.*, 2018; KUSACZUK, 2019). A ação anti-colestásica desses compostos se dá através da ativação das vias da proteína quinase C (PKC) e das quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2), que vão estimular a translocação de transportadores de AB para a membrana dos hepatócitos (CABRERA, 2019).

Os estudos sobre a ação do TUDCA na DHGNA ainda são escassos. Camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com TUDCA apresentaram melhora da esteatose hepática com redução de marcadores pró-inflamatórios, aumento da β - oxidação, redução da lipogênese e melhora da sensibilidade à insulina (GUO *et al.*, 2015). Em modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica, o

TUDCA minimizou os danos hepáticos através da redução do estresse de retículo, marcadores pró-apoptóticos e de fibrose, mas não influenciou no conteúdo de TG (CHO *et al.*, 2014). O TUDCA também melhorou a esteatose hepática de camundongos que passaram por desnutrição intra-uterina submetidos à dieta hiperlipídica (MURAMATSU-KATO *et al.*, 2015), entretanto ainda não há trabalhos que avaliem o papel do TUDCA na DHGNA decorrente da desnutrição proteica após desmame.

2. OBJETIVOS

O objetivo do atual trabalho foi investigar se a desnutrição vigente do déficit de proteínas promove o aumento de gordura hepática associado à desregulação no metabolismo dos ácidos biliares. Em sequência, investigamos o papel do TUDCA na esteatose hepática de camundongos submetidos à restrição de proteínas após o desmame, e o envolvimento desse composto na regulação do metabolismo dos ácidos biliares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Experimental

3.1.1 Cultura Celular

Células de hepatócitos humanos da linhagem HepG2 foram mantidas em meio DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) à 37°C e 5% de CO₂. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência em placa, foi feito o tratamento com 2mM de L-Histidinol dihidroclorido (cód. H6647-1G, Sigma, Missouri, EUA) para indução da desnutrição (SHAN *et al.*, 2015), que foi demonstrada pelo aumento das proteínas p-EIF2 α e ATF4 durante 4 e 8 horas de tratamento, sendo esse último tempo o escolhido como o modelo experimental.

3.1.2 Animais

Após aprovação pelo comitê de ética de uso de experimentação animal (número 5239-1/2019), camundongos machos da linhagem *C57Bl/6-Unib* com 21 dias de vida, foram obtidos no CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os camundongos foram mantidos no biotério setorial do

departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, sob condições de luminosidade (ciclo de 12h claro e 12h escuro) e temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas. Durante 16 semanas, os animais foram divididos em 2 grupos: Grupo Controle (C), com camundongos alimentados com dieta convencional com 14% de proteínas totais; grupo restrição proteica (R), com camundongos alimentados com dieta com 6% de proteínas totais. Nos últimos 15 dias do protocolo experimental, parte dos animais dos grupos C e R, receberam a administração diária intraperitoneal de 300mg/kg de TUDCA (Calbiochem, São Paulo, Brasil, cód. 580549) resuspendido em solução de PBS, formando assim, outros dois grupos: camundongos controles tratados com TUDCA (CT) e camundongos submetidos a restrição proteica tratados com TUDCA (RT). Nesse período, o restante dos animais que não foram tratados com o TUDCA receberam diariamente uma aplicação intraperitoneal de PBS. Dietas e água foram ofertadas *ad libidum*. As dietas foram adquiridas na empresa PragSoluções (Jaú, Brasil).

Quadro 1. Composição das dietas Controle (14% de PTN) e Restrita (6% de PTN) em 100g.

INGREDIENTES	Dieta Controle PTN 14% (g)	Dieta Restrita PTN 6% (g)
Amido de Milho	44,23	50,43
Caseína	16,34	6,97
Amido Dextrinizado	15,5	16,65
Sacarose	10	12,1
Óleo de Soja	4	4
Celulose Microcristalina	5	5
Mix mineral AIN 93G	3,5	3,5
Mix vitamina AIN 93	1	1
L-cistina	0,18	0,1
Bitartarato de colina	0,25	0,25
TOTAL	100	100

3.2 Pesagem e controle da ingestão alimentar

Todos os camundongos foram pesados uma vez por semana utilizando balança digital (SF-400 Alta Precisão Eletrônica) durante todo o período experimental. A ração ofertada também foi pesada semanalmente para o cálculo da ingestão alimentar: ração ofertada (R_c) subtraída pela ração restante (R_r) e dividido pelo número (n) de animais da gaiola.

3.3 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Para o dia da realização do teste de tolerância à glicose, os camundongos dos grupos C e R, foram mantidos em jejum por 12 horas, pesados e a glicemia de jejum (tempo 0) avaliada com aparelho Accu-Check Advantage II. Após aferição da glicemia em jejum, foi administrada dose única de 2g/Kg de peso corporal de glicose via intraperitoneal. Os valores de glicemia foram verificados nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose.

3.4 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Os camundongos foram submetidos a restrição alimentar por 2 horas e a verificação da glicemia do tempo 0 realizada com aparelho Accu-Check Advantage II. A insulina regular humana (Humulin®, Lilly, Indianápolis, EUA) foi administrada na cavidade peritoneal na concentração de 0,75 UI/kg de peso corporal, associada a uma solução de 0,9% de NaCl. A glicemia foi verificada nos tempos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 minutos após a aplicação da insulina. O cálculo da taxa de decaimento da glicemia (kITT) foi feito a partir da transformação dos valores de glicemia em seu logaritmo natural ($\ln$), e depois, no *Graph Pad Prism v.06*, foi feita a regressão linear da curva para cada animal, mostrada no valor positivo de *Slope* seguido da multiplicação por 100.

3.5 Análises Sorológicas

A eutanásia foi feita por decapitação após a anestesia com isoflorano administrado através das vias aéreas, com os animais em jejum de 12 horas. O sangue foi coletado e centrifugado a 1500 x g a 4°C, por 15 minutos e o soro separado foi armazenado à -20°C. Posteriormente, foi feita as dosagens de albumina, proteínas totais, triglicerídeos e colesterol total utilizando kit comercial (cód. K040, cód. K031-1, cód. K117-3, cód. K083- 3, Bioclin, Belo Horizonte Minas Gerais, Brasil).

3.6 Extração de lipídeos totais, dosagem de triglicerídeos e colesterol total hepático

Um fragmento de aproximadamente 100 mg do fígado foi coletado e adicionado 2 ml de solução de clorofórmio e metanol na proporção de 2:1. Após homogeneizado, o tecido foi mantido em temperatura ambiente *overnight* para completa extração lipídica. Após, o conteúdo foi filtrado e mantido em capela para a completa evaporação do solvente. O material seco foi então resuspenso em álcool isopropílico e armazenado à -20°C até a dosagem do conteúdo de triglicerídeos e colesterol total utilizando kit comercial (cód. K117-3, cód. K083- 3, Bioclin, Belo Horizonte Minas Gerais, Brasil). O valor final foi normalizado pelo peso do fragmento de fígado e volume de álcool isopropílico adicionado (FOLCH, 1957).

3.7 Dosagem de Ácidos Biliares Totais

Para a dosagem de ácidos biliares totais, soro, fragmento de fígado e células foram coletados e homogeneizados em solução de PBS, centrifugados a 10000 x g por 10 minutos à 4°C e diluídos segundo instruções do fabricante do kit comercial (STA-631, Cell Biolabs, San Diego, EUA). A dosagem de AB totais do fígado e de células foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas totais quantificadas por *Bradford*.

3.8 Western Blot

Após a eutanásia, fragmentos do fígado foram coletados e solubilizados com homogeneizador mecânico (TissueLyser LT, Qiagen, Hilden, ALE) em solução contendo agentes anti-proteases e anti-fosfatases [100 mM de tris pH 7,5, 10 mM de ortovanadato de Na⁺, 100 mM de pirofosfato de Na⁺, 5mM de ácidoetilenodiaminotetracético (EDTA), 10 mM de fluoreto de Na⁺, 2 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil e 1% de triton X-100]. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm por 40 min, e após quantificação proteica por *Bradford*, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos em 30% de tampão *Laemmli* (0,1% de azul de bromofenol, 1 M de fosfato de sódio, 50% de glicerol e 10% de SDS). As células foram coletadas e também armazenadas em tampão *Laemmli*.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel bifásico de poliacrilamida (SDS-PAGE) e depois transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad), durante

2 horas e 30 minutos a 110 V em gelo, com tampão de transferência (25 mM de tris base, 192 mM de glicina e 20% de metanol). Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com solução bloqueadora de 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS/Tween-20. Após, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário para CYP7A1 (cód. 294116, LS Bio., EUA), CYP27A1 (cód. 151987, Abcam, EUA), FXR (cód. 25309, Santa Cruz Bio., EUA), ATF4 (cód. D4D8, Cell Signalling, EUA), pEIF2a (cód. 169528, Abcam, EUA), CPT1 (cód. 12252, Cell Signalling, EUA), MTP (cód. 43618, Sigma, EUA), OXPHOS (cód. 110413, Abcam, EUA) e GAPDH (cód. G9545, Sigma, EUA). As membranas foram então incubadas com anticorpo policlonal anti-IgG (1:10000, Invitrogen, São Paulo, SP, BRA) por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção das proteínas foi realizada utilizando reagentes quimioluminescentes e o registro foi feito através de fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Illinois, EUA). A quantificação proteica foi feita através do software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), normalizada pela GAPDH, proteína utilizada como controle interno, seguido da divisão pela média dos valores do grupo controle.

3.9 qRT-PCR

Após coleta, um fragmento de tecido hepático foi lisado em 1000µl de solução Trizol (Ambion by Life Technologies, USA), e o RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria (ratio 260/ 280nm) e o cDNA foi sintetizado com 2µg de RNA, usando a reação de transcriptase reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, USA). RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), na 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com primers específicos para as reações de PCR. O gene do RPL 32 (Ribosomal Protein L32) foi utilizado como controle interno.

Quadro 2. Sequência dos *primers* utilizados

<i>Primer</i>	Sequência dos <i>primers</i>
SREBP1c	Forward: GCTTCTGAGGGTGGAGGGGT
	Reverse: CCTGGTGGTGGGCACTGAAGC
FAS	Forward: AGCGGCCATTTCATTGCCC

	Reverse: CCATGCCCAGAGGGTGGTTG
ACC	Forward: AGGCTGATGGTGAATGAAC
	Reverse: CACTGTGAACATGTGGAGG
PPAR α	Forward: AAAGCAGCCAGCTCTGTGTTGAGC
	Reverse: TAGGTACCGTGGACTCAGAGCTAG
CPT1	Forward: CTTGAAGTAACGGCCTCTGT
	Reverse: AGTGAAGTGGTGGGAGGAATA
ACOX	Forward: TGGTATGGTGTCTGACTTGAATGA
	Reverse: AATTTCTACCAATCTGGCTGCAC
Apo-B	Forward: CCGTGGAGCTGGCGTTGGG
	Reverse: GCGAGTGGCCCTGAAGGCTG
MTP	Forward: CATTGAGCACCTCCGGACTT
	Reverse: GACACTGCTGTCACTTTTGAAATCCA
BIP	Forward: ACTTGGGGACCACCTATTCTT
	Reverse: ATCGCCAATCAGACGCTCC
CHOP	Forward: CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT
	Reverse: CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
XBP1s	Forward: AGCAGCAAGTGGTGGATTG
	Reverse: GAGTTTTCTCCCGTAAAGCTGA
ATF6	Forward: GAGAGGTGTCTGTTCGGGG
	Reverse: CGTGGACTCCAGTCTTCAC
BAC	Forward: TCTATGGCCTAAAGTTCAGGCG
	Reverse: CTTGCCGCTCTAAAGCATCC
BAAT	Forward: GCAAACCTGTTAGTTCTCAGGC
	Reverse: GTGGACCCCATATAGTCTCC
SHP	Forward: TAACTTCACAAGGACTATGC
	Reverse: GCTCCAAGACTTCACACAGTG
TGR5	Forward: CCTGGCAAGCCTCATCGTC
	Reverse: AGCAGCCCGGCTAGTAGTAG
TNF α	Forward: CCCTCCACACTCAGATCATCATCTTTCT
	Reverse: GCTACGACGTGGGCTACAG
IL1- β	Forward: ACTCCTTAGTCCTCGGCCA
	Reverse: TGGTTTCTTGTGACCCTGAGC

RPL 32	Forward: CAAAATCGCCCTATTCCTCA
	Reverse: AGACCCAGCTTCGTTCTCCT

3.10 Quantificação de lipídeos neutros por Oil Red O (ORO)

Um fragmento do fígado foi coletado e incorporado em O.C.T. (Fisher Healthcare, Tissue Plus, O.C.T. Compound, Scigen Scientific Gardena, Houston, U.S.A.) e congelado à -80°C por 24 horas. Para os cortes foram feitas secções semi-seriadas de 5 µm no criostato (LEICA CM 1850, Heidelberger, Alemanha) à 15°C. Os cortes obtidos foram mantidos fixados em solução de paraformaldeído 4% durante 20 minutos e por fim, foram corados com solução de Oil Red O (ORO - Amresco®, Ohio, EUA) a 0,5% por 5 minutos e em seguida colocados durante 15 segundos em solução de hematoxilina e lavados com água (MEHLEM *et al.*, 2013).

Para a visualização e a quantificação da deposição de lipídeos nos hepatócitos foi selecionada 1 secção de cada fígado, na qual foram fotografados 3 campos aleatórios no aumento de 20x em microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus 29 Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA) acoplado a câmera digital para captura de imagem (Olympus DP71, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA). O percentual da área contendo gordura por campo registrado foi obtido pela quantificação da coloração do ORO. Com o Software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), as imagens capturas foram primeiramente convertidas de RGB para uma imagem com escala de cinza de 8 bits, depois foi aplicado a ferramenta color threshold, que separou pixéis com valores de intensidade diferentes e em seguida mensurada a área de cada imagem (MEHLEM *et al.*, 2013).

Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de 3,7% de formaldeído durante 1 hora em temperatura ambiente. Após, foram lavadas com PBS, seguidas de 1 lavagem com isopropanol a 60%. Foi então adicionada solução de 0,5% de Oil Red O (Amresco®, Ohio, EUA) diluído em isopropanol, mantida por 2 horas à temperatura ambiente. Depois, foi feita mais uma lavagem com isopropanol a 60%, seguido de lavagens com PBS e então as fotos foram feitas no microscópio FLoid Cell Imaging (Life Technologies, Califórnia, EUA). A absorbância do conteúdo de ORO foi realizada no aparelho Spectramax (Molecular Devices, Califórnia, EUA) após coleta de cada poço com isopropanol absoluto. A

normalização do experimento foi feita pelo conteúdo de células quantificado com o uso do cristal de violeta.

3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software, USA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e todos foram submetidos ao teste de distribuição de normalidade *Shapiro-Wilk*. A análise entre os grupos C e R e CTL e LH foram submetidas ao *test t* de Student (paramétricos) ou teste U de Mann Whitney (não paramétricos). As análises entre os grupos C, CT, R e RT foram submetidos ao *One-way ANOVA* seguido de *Tukey* (paramétricos) ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns* (não paramétricos). $P < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Indução da desnutrição em células HepG2

Para verificar se a ativação da via de resposta a aminoácidos promoveria o aumento do conteúdo lipídico associado à desregulação no metabolismo dos ácidos biliares, tratamos células de hepatócitos humanos da linhagem HepG2 com 2mM de L-histidinol (LH). O L-histidinol é um inibidor da síntese da histidina, utilizado como indutor farmacológico que simula a desnutrição de proteínas pois atua diretamente na via de resposta ao aminoácido através da ativação da GCN2 (WARRINGTON, 1977; SHAN *et al.*, 2015).

O tratamento com 4 horas ou 8 horas com o LH promoveu ao aumento da expressão proteica de pEIF2 α e ATF4 (Fig. 1A, B), proteínas *downstream* à GCN2. Como 8 horas de tratamento resultou no aumento mais exacerbado da expressão proteica de ambas as proteínas, escolhemos esse tempo de incubação para os experimentos posteriores.

Na Fig. 1C é possível ver que o tratamento de 8 horas com o LH resultou no aumento do conteúdo de lipídeos neutros nos hepatócitos, representado pela intensidade da absorção de células marcadas com ORO (Fig. 1D). Associado a esse aumento, o LH também acarretou no aumento do conteúdo de AB totais (Fig. 1E). Com esses resultados, é possível inferir que, de fato, a ativação da via de resposta

aos aminoácidos parece implicar em aumento de gordura nos hepatócitos e aumento da síntese de ácidos biliares totais.

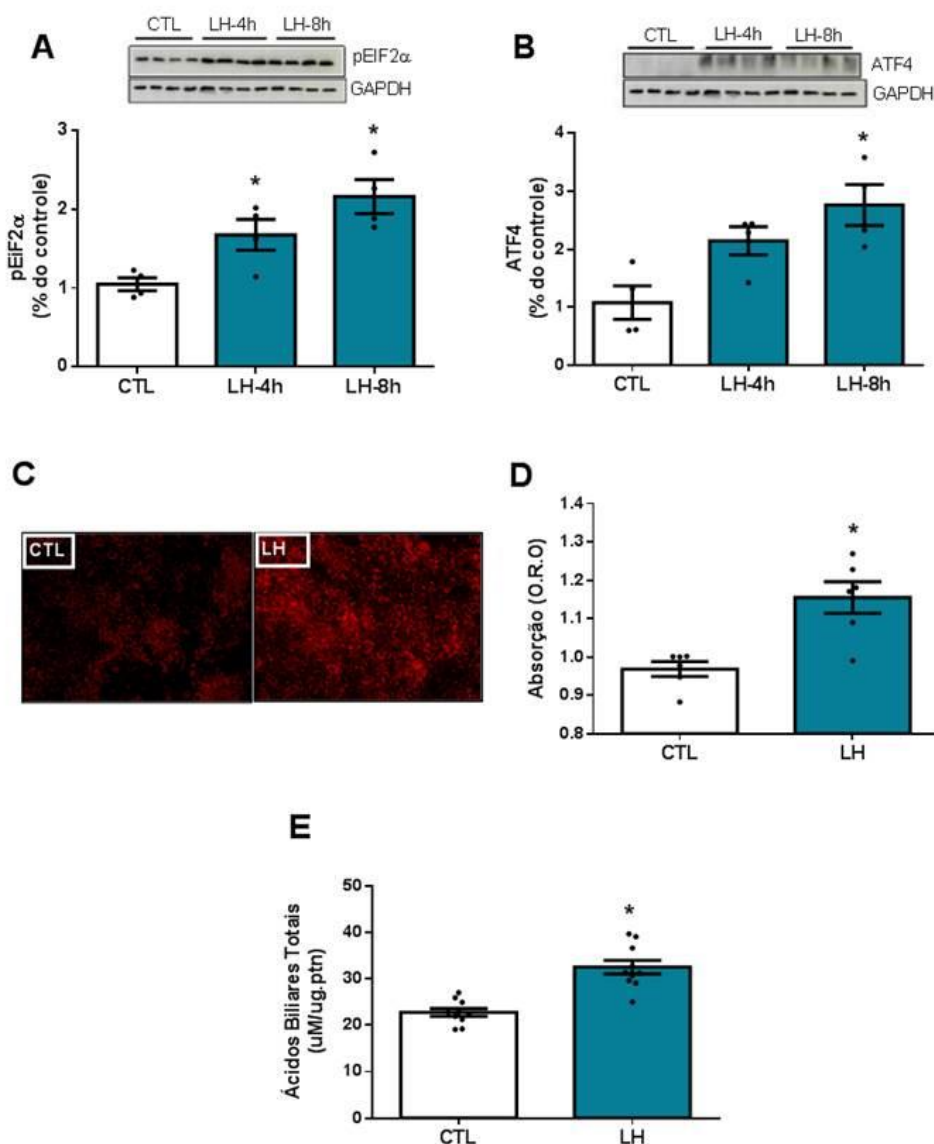


Figura 1. Caracterização da desnutrição proteica em células HepG2. Barra branca (CTL)= células em meio DMEM controle, barra azul (LH)= células em meio DMEM tratadas com 2mM de L-histidinol. Expressão proteica de (A) pEIF2a, (B) ATF4 de células CTL e LH incubadas 4 e 8 horas com L-histidinol, (C) células coradas com ORO, (D) quantificação da absorbância de células coradas com ORO, (E) dosagem de ácidos biliares totais em células CLT e LH incubadas 8 horas com L-histidinol. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) seguido de *t* test; * significa diferença estatística em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$); $n = 4-6$.

4.2 Caracterização do modelo experimental *in vivo*

Buscando *in vivo* compreender o envolvimento da restrição de proteínas no metabolismo de lipídeos e dos ácidos biliares, camundongos machos após desmame receberam durante 16 semanas dieta controle com 14% de proteínas totais (C) ou dieta restrita com 6% de proteínas totais (R). Como esperado, o grupo R apresentou redução do ganho de peso corporal a partir da 4ª semana (Fig. 2A), com redução média de 16% do peso corporal ao final do tratamento nutricional (Fig. 2B), em comparação com o grupo C. O grupo R também apresentou redução do peso relativo do fígado (Fig. 2C) associado e aumento relativo de gordura perigonadal (Fig. 2D). A desnutrição proteica também levou à redução de albumina e proteínas totais séricas (Fig. 2E, F).

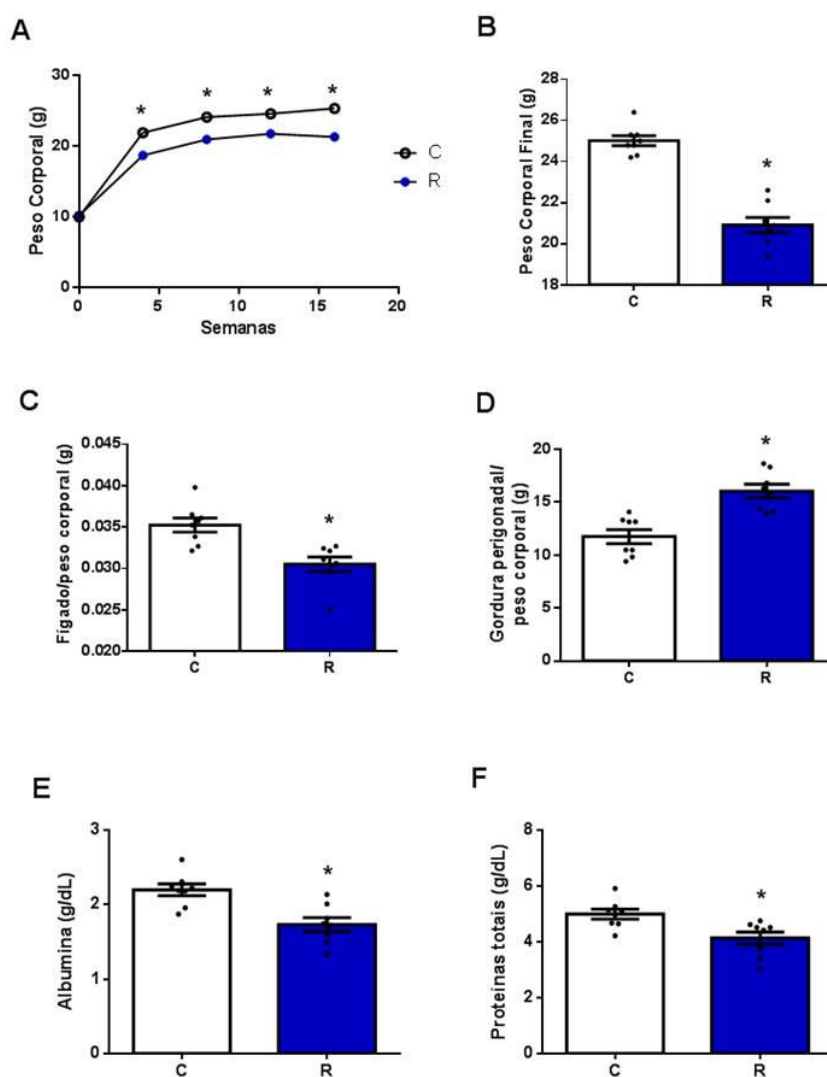


Figura 2. Caracterização do modelo experimental. C= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional (14% de proteínas totais), R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita (6% de proteínas totais), durante 16 semanas. Em (A) Registro semanal do peso corporal ao longo do período experimental de 16 semanas, (B) peso corporal final, (C) peso relativo do fígado, (D) peso relativo da gordura perigonadal, (E) albumina sérica, (F) proteínas totais sérica. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) seguido de *t test*; * significa diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$); $n=8$.

4.3 Avaliação da homeostase glicêmica

Como o grupo vem há anos estudando o metabolismo glicêmico nesse modelo de restrição de proteínas totais, fizemos a avaliação da homeostase da glicose a fim de garantir que o protocolo experimental atingiu resultados semelhantes anteriormente publicados pelo o grupo. Como esperado, os animais do grupo R apresentaram maior tolerância à glicose, que pôde ser observada na curva glicêmica do GTT após 90 minutos do desafio com glicose (Fig. 3A) e na menor área abaixo da curva (AUC, Fig. 3B) durante o referido teste. Para avaliar a sensibilidade à insulina, foi feito o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT, Fig. 3C), no qual o grupo R apresentou maior sensibilidade ao hormônio, verificada na redução da AUC (Fig. 3D) e no aumento do índice de decaimento da glicemia (kITT, Fig. 3E).

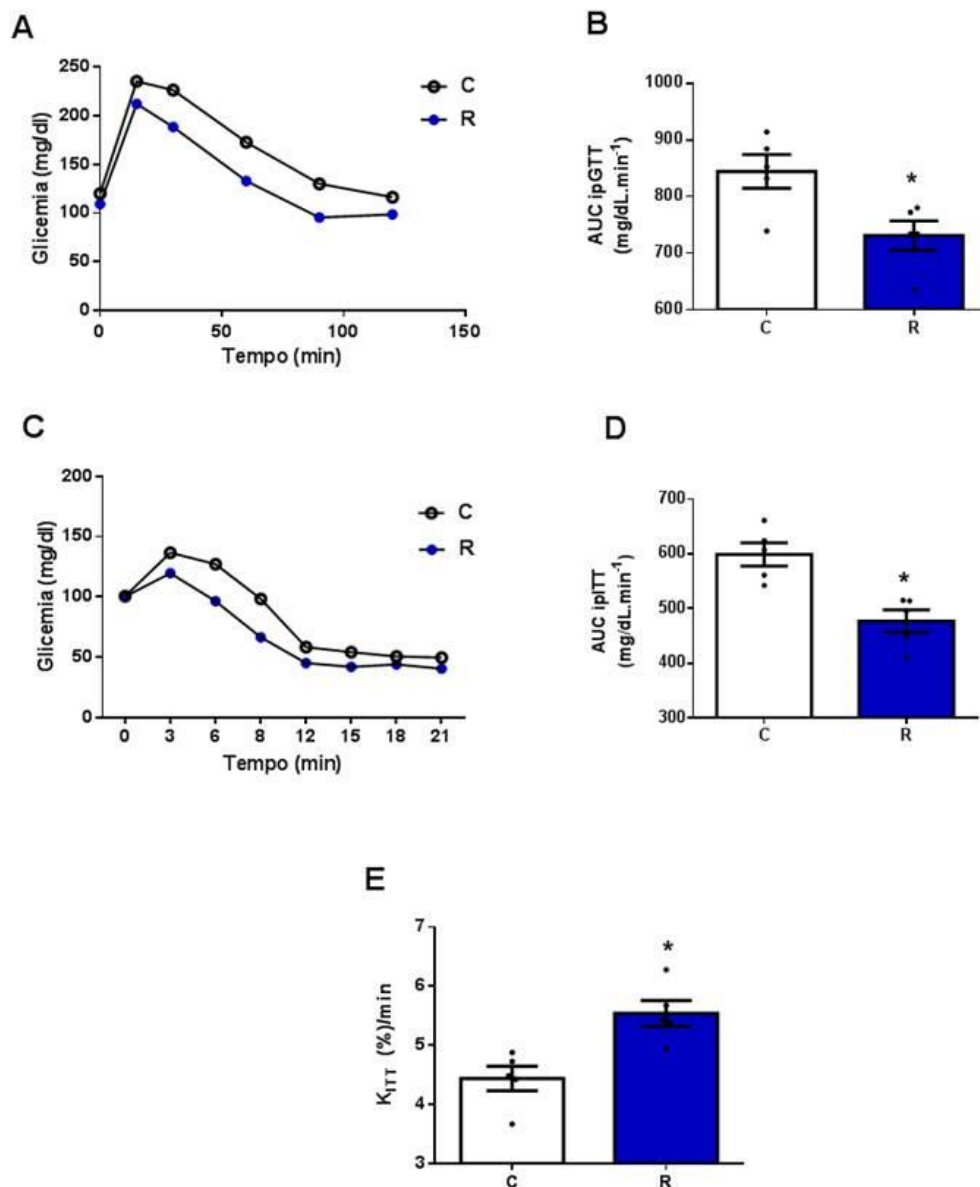


Figura 3. Avaliação da homeostase glicêmica. C= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional (14% de proteínas totais), R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita (6% de proteínas totais), durante 16 semanas. Em (A) perfil glicêmico durante o ipGTT, (B) AUC do ipGTT, (C) perfil glicêmico do ipITT, (D) AUC do ipITT, (E) taxa de decaimento da glicemia (k_{ITT}). Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) seguido de *t test*; * significa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$); $n=5$.

4.4 Avaliação do perfil lipídico sérico

Para avaliar se a restrição de proteínas resultou em alterações no metabolismo de lipídeos, fizemos a dosagem sorológica de triglicerídeos, colesterol total e ácidos biliares totais. O grupo R apresentou redução na concentração sérica de triglicerídeos (Fig. 4A), não houve diferenças no conteúdo de colesterol total (Fig. 4B), mas com

aumento da concentração de ácidos biliares totais (Fig. 4C), quando comparados ao grupo C.

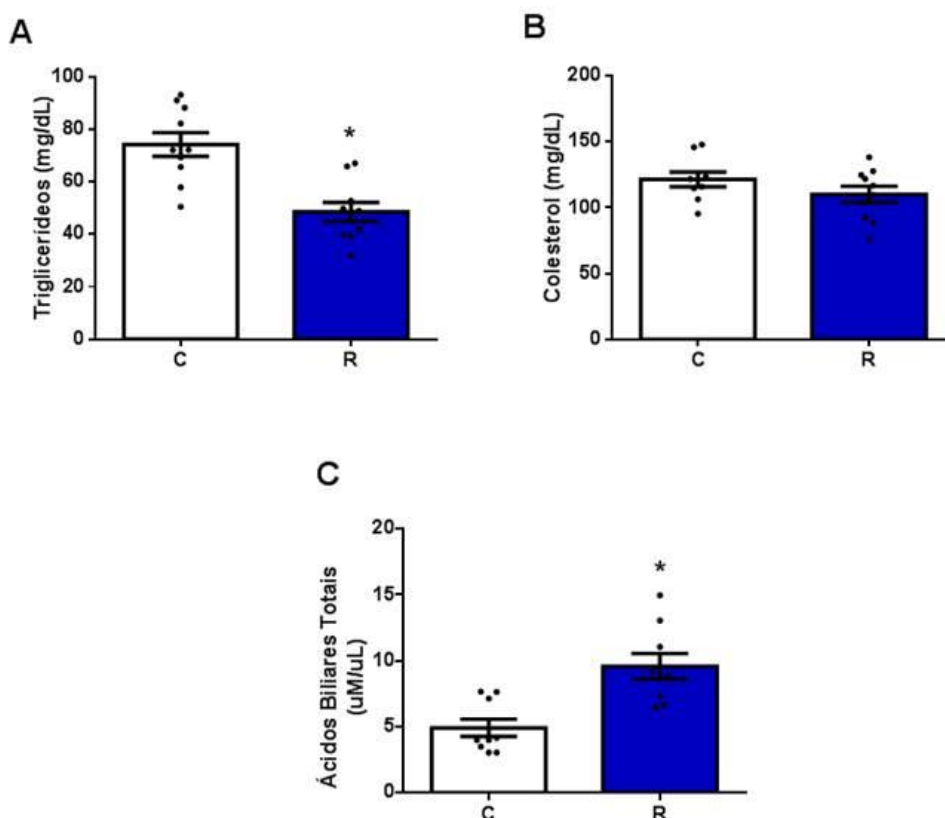


Figura 4. Avaliação do perfil lipídico sorológico. C= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional (14% de proteínas totais), R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita (6% de proteínas totais), durante 16 semanas. Em (A) triglicerídeos, (B) colesterol total, (C) ácidos biliares totais. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) seguido de *t test*; * significa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$); $n = 9-10$.

4.5 Avaliação do perfil lipídico hepático

Foi feita também a avaliação do perfil lipídico do fígado dos animais submetidos à restrição de proteínas totais. No grupo R foi observado o aumento do conteúdo hepático de triglicerídeos e de colesterol total (Fig. 5A, B), em comparação ao grupo C. O mesmo foi observado na avaliação do conteúdo de lipídeos totais nos fígados corados com ORO (Fig. 5C), no qual houve um aumento de, aproximadamente, 200% na unidade arbitrária de coloração com ORO no grupo R (Fig. 5D). Entretanto, não encontramos diferença no conteúdo hepático de ácidos biliares totais (Fig. 5E).

Com esses resultados é possível inferir que, em nosso modelo animal de desnutrição de proteínas, o metabolismo de lipídeos foi alterado, causando

hipolipidemia, esteatose hepática e aumento de ácidos biliares totais plasmáticos, não configurando um quadro de colestase hepática.

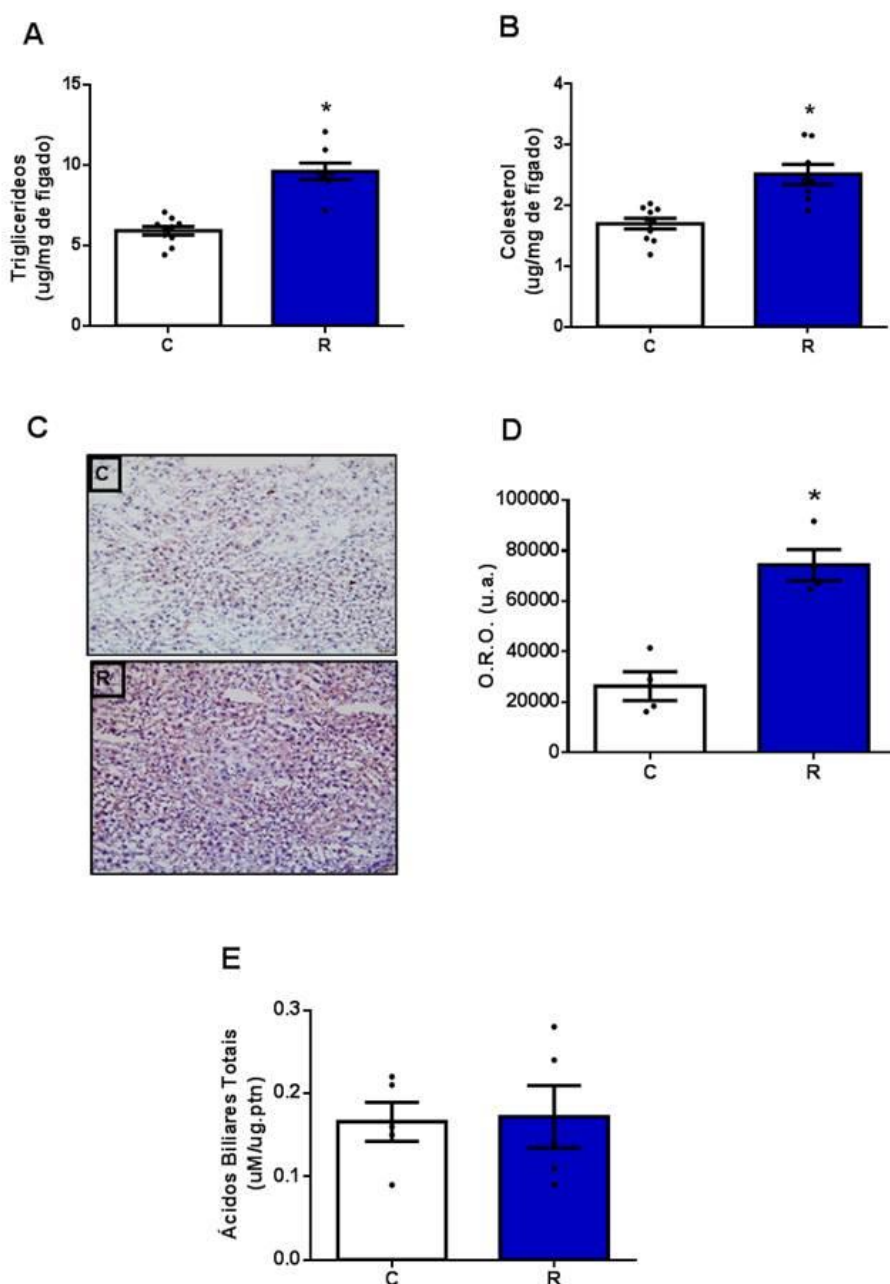


Figura 5. Avaliação do perfil lipídico hepático. C= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional (14% de proteínas totais), R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita (6% de proteínas totais), durante 16 semanas. Em (A) triglicerídeos, (B) colesterol total, (C) concentração de lipídeos totais dos fígados corados com ORO, (D) quantificação dos fígados corados com ORO, (E) ácidos biliares totais. Barra de escala= 20 μ m. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) seguido de *t* test; * significa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$); $n=4-10$.

4.6 Caracterização do modelo experimental após o tratamento com TUDCA

O tratamento com o TUDCA foi feito com a perspectiva de um possível alvo terapêutico para a melhoria do acúmulo de gordura hepática encontrada nos animais R e também, como um possível regulador do metabolismo dos ácidos biliares.

O TUDCA não interferiu no peso corporal final tanto do grupo CT quando comparado ao C, quanto no grupo RT quando comparado ao grupo R (Fig. 6A). O peso relativo do fígado também não se diferenciou no grupo CT em comparação ao C, mas apresentou leve aumento no grupo RT, embora diferenças estatísticas não tenham sido encontradas quando comparado aos grupos C e R (Fig. 6B). Em relação à gordura perigonadal relativa, o TUDCA também não interferiu no grupo CT quando comparado ao grupo C, e também não interferiu no RT quando comparado ao grupo R (Fig. 6C).

Em relação ao conteúdo sérico de albumina, o tratamento com o TUDCA no grupo RT, foi capaz de normalizar os valores em relação ao grupo C (Fig. 6E). Também o grupo RT apresentou leve aumento do conteúdo sérico de proteínas totais em relação ao grupo R, embora esse aumento não se diferenciou estatisticamente dos grupos C e R (Fig. 6D).

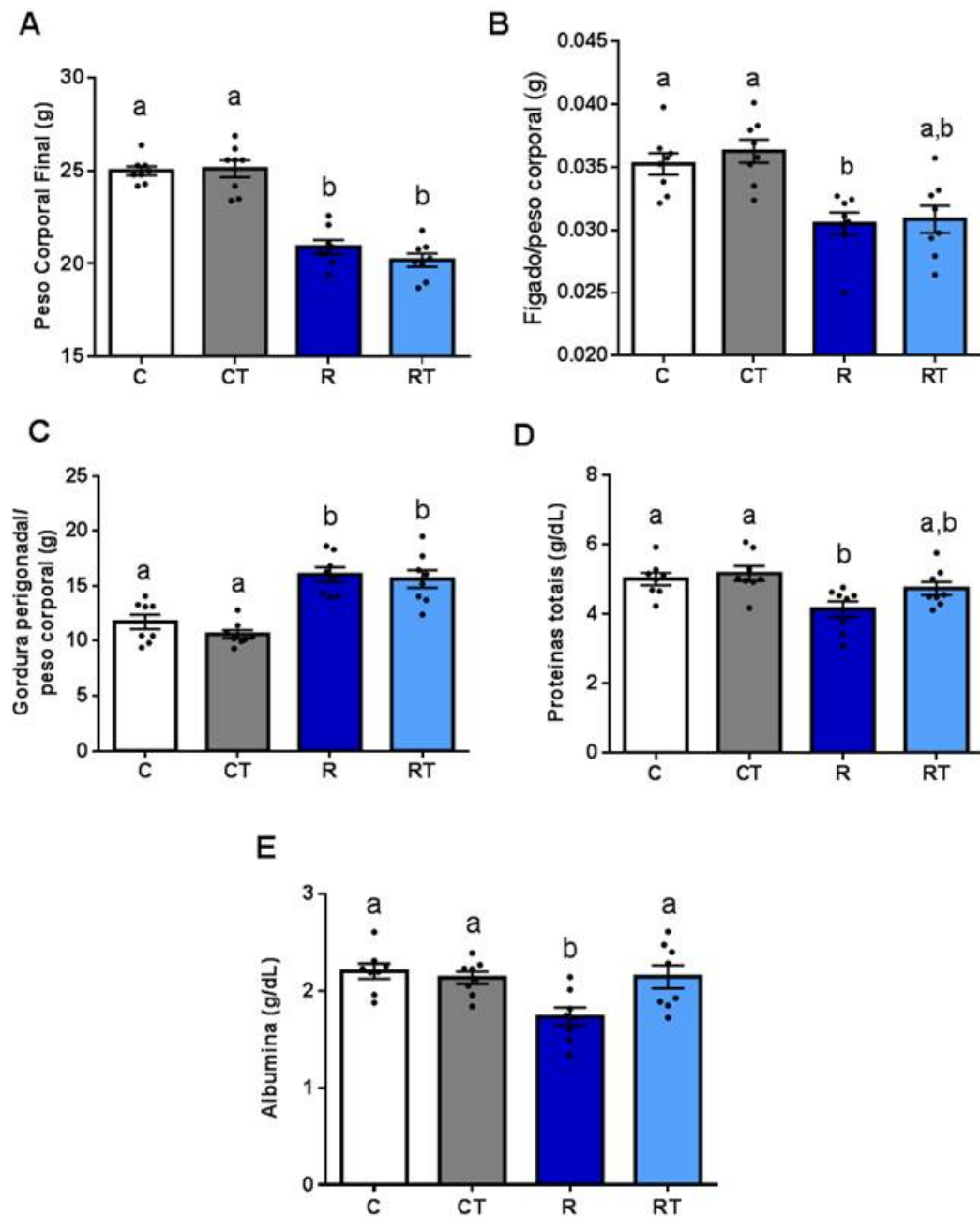


Figura 6. Caracterização do modelo experimental após o tratamento com TUDCA. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, CT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Em (A) peso corporal final, (B) peso relativo do fígado, (C) peso relativo da gordura perigonadal, (D) albumina sérica, (E) proteínas totais sérica. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way* ANOVA seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns* ; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n=9-10$.

4.7 Avaliação do perfil lipídico após o tratamento com TUDCA

Na avaliação do conteúdo sérico de triglicerídeos, o tratamento com o TUDCA no grupo RT foi capaz de normalizar os níveis desse, semelhante ao grupo C. Embora pequena redução tenha sido encontrada no grupo CT, essa não foi estatisticamente diferente quando comparado aos grupos C e R (Fig. 7A). Também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao conteúdo sérico de colesterol total (Fig. 7B). Em relação ao conteúdo hepático de triglicerídeos e colesterol total, o tratamento com o TUDCA no grupo RT, foi capaz de reduzir o conteúdo desses lipídeos em comparação ao grupo R, se assemelhando a valores encontrados no grupo C (Fig. 7C, D). Isso também foi observado no conteúdo e quantificação de lipídeos neutros totais dos fígados corados com ORO (Fig. 7E, F). Como o tratamento com o TUDCA no grupo CT não apresentou diferenças no perfil lipídico em comparação ao grupo C, seguimos com os próximos experimentos sem esse grupo.

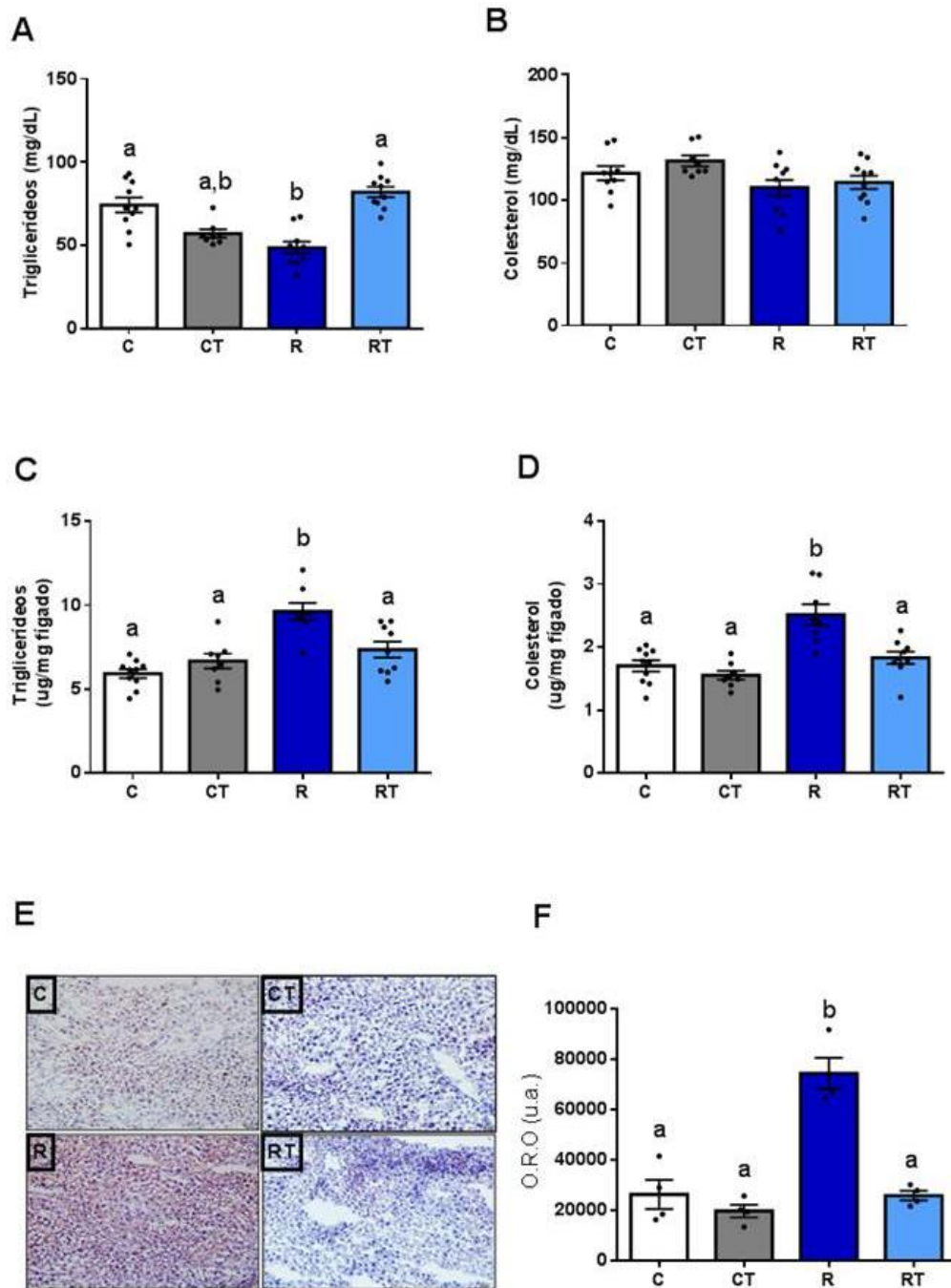


Figura 7. Avaliação do perfil lipídico após o tratamento com TUDCA. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, CT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Em triglicerídeos séricos, (B) colesterol total sérico, (C) triglicerídeos hepático, (D) colesterol hepático, (E) concentração de lipídeos totais dos fígados corados com ORO, (F) quantificação dos fígados corados com ORO. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way ANOVA* seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunn's*; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n=4-10$.

4.8 Avaliação das vias de lipogênese, β -oxidação e exportação hepática de lipídeos

A fim de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos tanto no aumento de gordura hepática encontrada no grupo R, quanto na melhora do quadro esteatótico encontrado no grupo RT, analisamos alguns genes e proteínas que possam estar envolvidos nesse contexto.

A produção hepática de gordura a partir da glicose, é regulada pelo fator de transcrição SREBP1-c, que regula as enzimas ACC e FAS, responsáveis por transformar o excesso de glicose em novo AG (BERLANGA, 2014). Tanto o grupo R quanto o RT apresentaram redução da expressão gênica do SREBP1c em comparação ao grupo C. Diferenças na expressão gênica da FAS e da ACC não foram encontradas entre os grupos (Fig. 8A). Esses dados nos fazem inferir que a *de novo* lipogênese não parece estar envolvida no aumento de gordura hepática do grupo R.

A oxidação dos ácidos graxos é regulada pelo fator de transcrição PPAR α , que ativa CPT-1 na mitocôndria e a Acil-coenzima peroxissômica A oxidase 1 (ACOX-1) nos peroxissomos, ambas enzimas chaves para o processo de β -oxidação. Não houve diferenças na expressão gênica do PPAR α , CPT-1 e ACOX-1 entre os grupos (Fig. 8B). Assim como também, não foi encontrado diferença na expressão proteica da CPT-1 (Fig. 8C). Como indicativo da função mitocondrial, foi feita a expressão proteica de complexos de proteínas responsáveis pela cadeia respiratória de elétrons (OXPHOS). Foi observado aumento da expressão proteica do complexo V no grupo R, e que foi parcialmente reduzido no grupo RT. Os outros complexos da OXPHOS não apresentaram diferenças entre os grupos (Fig. 8D).

Para a avaliação da exportação hepática de gordura, foi feita a expressão gênica da Apo-B e da MTP, proteínas responsáveis pela formação da molécula de VLDL. Houve aumento da expressão gênica da Apo-B no grupo R, e que foi reestabelecido à níveis do C após o tratamento com o TUDCA (RT). Não houve diferenças na expressão gênica e proteica da MTP entre os grupos (Fig. 8E, F).

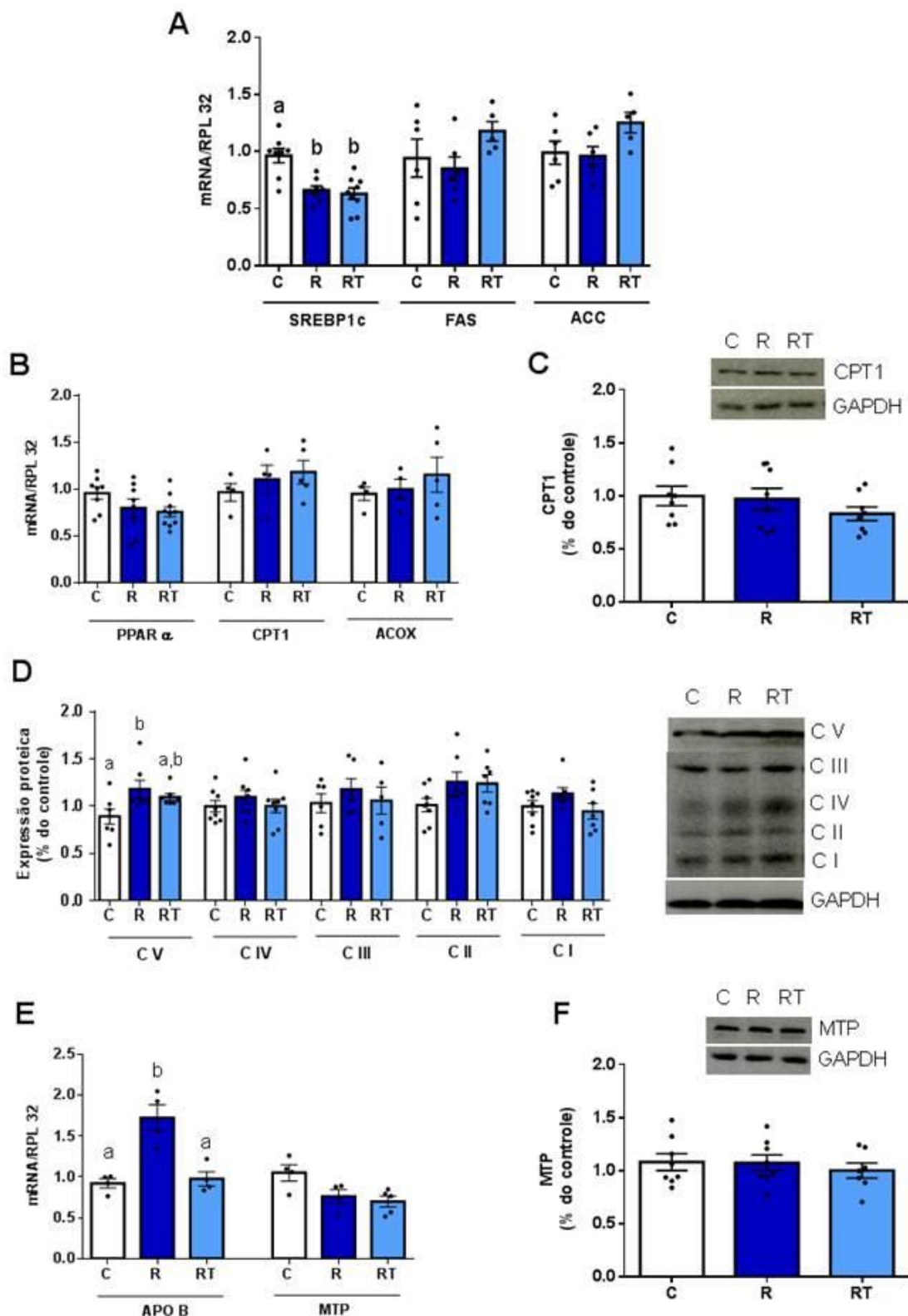


Figura 8. Avaliação das vias de lipogênese, β -oxidação e exportação hepática de lipídeos. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Em (A) expressão gênica de SREBP1c, ACC e FAS, (B) expressão gênica de PPAR α , CPT-1 e ACOX-1, (C) expressão proteica da CPT-1, (D) expressão

proteica da OXPHOS, (E) expressão gênica da Apo-B e MTP, (F) expressão proteica da MTP. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way* ANOVA seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns* ; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n=4-8$.

4.9 Avaliação do estresse de retículo

A desnutrição e o acúmulo de gordura hepática, podem desencadear o estresse de retículo por comprometer a formação de proteínas e assim ativar a via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) (LIU *et al.*, 2020). Observamos o aumento da expressão proteica do pEIF2 α e do ATF4 no grupo R, aumento esse que foi reestabelecido no grupo RT, se assemelhando aos valores encontrados no grupo C (Fig. 9A, B). Na figura 9C, o grupo R apresentou redução da expressão gênica da proteína de imunoglobulina de ligação (BIP), que foi normalizada no grupo RT. A desnutrição proteica aumentou a expressão gênica da proteína homóloga C/EBP (CHOP), mas o tratamento com o TUDCA não foi capaz de reverter. Redução na expressão gênica da proteína 1 de ligação x-box (XBP1s) foi encontrado nos grupos R e RT, quando comparados ao grupo C. Não houve diferença na expressão gênica do ativador fator de transcrição do 6 (ATF6) entre os grupos analisados (Fig. 9C).

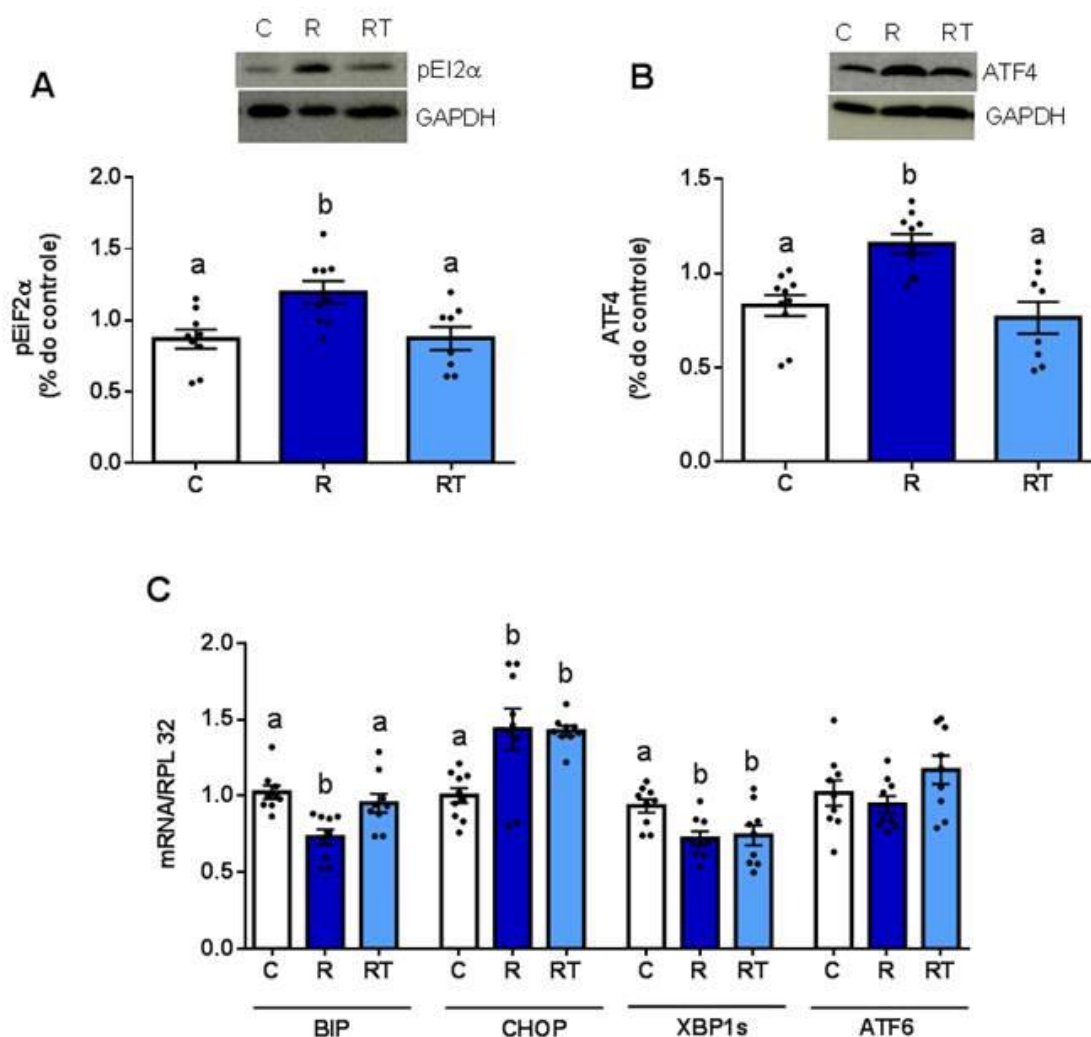


Figura 9. Avaliação do estresse de retículo. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Em (A) expressão proteica do pEIF2 α , (B) expressão proteica do ATF4, (C) expressão gênica da BIP, CHOP, XBP1s e ATF6. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way* ANOVA seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns*; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n = 8-10$.

4.10 Avaliação do metabolismo dos ácidos biliares

O tratamento com o TUDCA não influenciou no aumento dos ácidos biliares totais encontrado no grupo R (Fig. 10A). Como esperado, o grupo R apresentou aumento na expressão proteica da enzima CYP7A1, indicando aumento na síntese dos AB. O TUDCA no grupo RT, reduziu parcialmente a expressão dessa enzima, embora sem apresentar diferenças estatísticas entre os grupos C e R (Fig. 10B). A desnutrição também resultou no aumento da via alternativa de síntese dos AB,

indicada pela expressão proteica da enzima CYP27A1, e o tratamento com o TUDCA foi capaz de reverter esse aumento (Fig. 10C). A deficiência de proteínas na dieta, também pode ter influenciado na conjugação dos AB. O grupo R apresentou redução na expressão gênica da BAC, e que foi parcialmente reestabelecido após o tratamento com o TUDCA. Não foi observado diferença estatística entre os grupos na expressão proteica da BAAT (Fig. 10D).

Tanto a síntese quanto a conjugação dos AB, são reguladas à nível transcricional pelo receptor nuclear FXR. A desnutrição resultou no aumento da expressão proteica desse receptor no fígado, enquanto o tratamento com o TUDCA reduziu parcialmente no grupo RT (Fig. 10E). O FXR induz outro receptor nuclear, o SHP, que não teve sua expressão gênica aumentada no grupo R em comparação com o grupo C. Todavia, o TUDCA reduziu a expressão gênica do SHP no grupo RT (Fig. 10F).

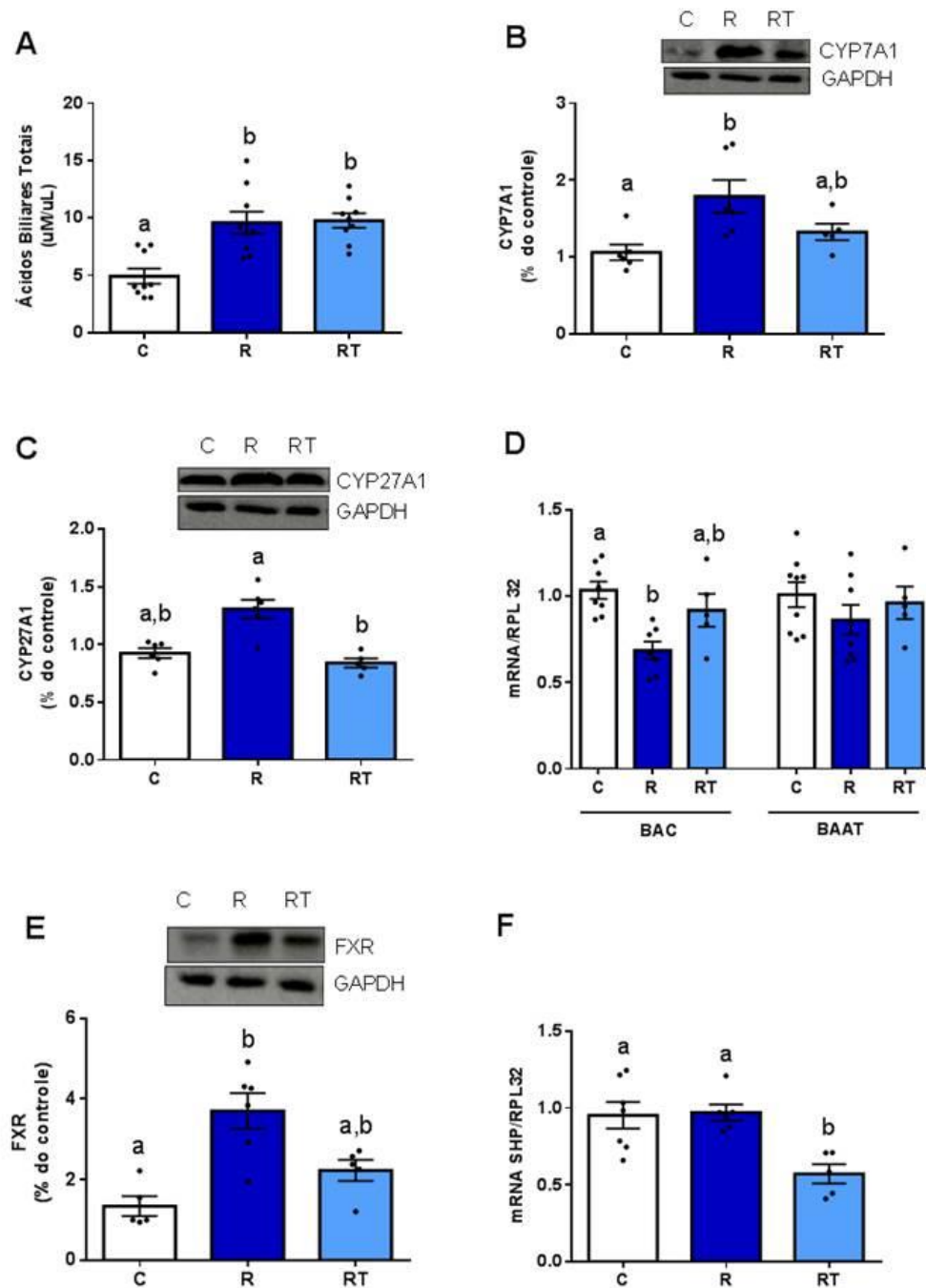


Figura 10. Avaliação do metabolismo dos ácidos biliares. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Em (A) ácidos biliares totais sérico, (B) expressão proteica da CYP7A1, (C) expressão proteica da CYP27A1, (D) expressão gênica da BAC e BAAT, (E) expressão proteica do FXR, (F) expressão gênica do SHP. Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way* ANOVA seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns*; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n = 5-10$.

4.11 Avaliação do processo inflamatório hepático

O TGR5 é um receptor de membrana de AB que, no fígado, está relacionado com a regulação da resposta inflamatória (KEITEL; HÄUSSINGER, 2018). Sendo assim, avaliamos a expressão gênica desse receptor, e embora diferenças não tenham sido encontradas entre os grupos C e R, houve um aumento na expressão desse receptor no grupo RT. Também avaliamos a citocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), que teve sua expressão gênica aumentada no grupo R, e revertida após o tratamento com o TUDCA. Não encontramos diferença na expressão gênica da interleucina 1 beta (IL1- β) entre os grupos (Fig. 11).

Esses resultados nos sugerem uma possível inflamação no fígado do grupo R, que pôde ter sido aliviado após o tratamento com o TUDCA. Entretanto, são necessários mais experimentos para a completa avaliação do processo inflamatório desses animais.

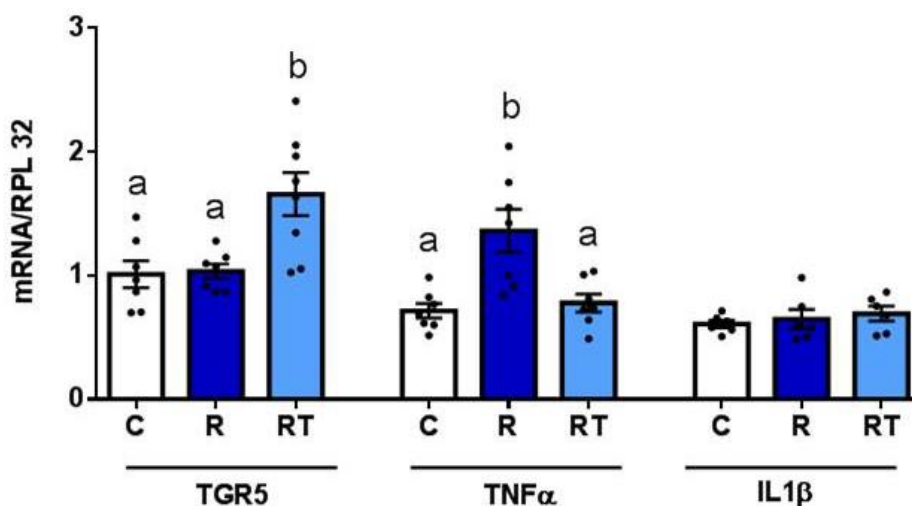


Figura 11. Avaliação do processo inflamatório hepático. C=camundongos C57BL/6 submetidos à dieta convencional, R= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita, RT= camundongos C57BL/6 submetidos à dieta restrita e tratados por 15 dias com 300mg/kg/dia de TUDCA, durante 16 semanas. Expressão gênica do TGR5, TNF α e IL1- β . Dados são expressos em $\pm$ EPM e foram submetidos ao teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e depois *One-way ANOVA* seguido de *Tukey's test* ou *Kruskal-wallis* seguido de *Dunns*; Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n = 7-8$.

5. DISCUSSÃO

Em nosso modelo de desnutrição proteica *in vitro* e *in vivo*, observamos aumento de gordura hepático associado ao aumento da concentração de ácidos biliares totais.

Células de linhagem de hepatócito humano (HepG2) foram tratados com L-histidinol, que é um ativador farmacológico da via da GCN2- ATF4 e mimetiza a privação de aminoácidos essenciais (IIBOSHI *et al.*, 1999; SHAN *et al.*, 2015). De fato, após 4 e 8 horas de incubação com esse composto, as células tratadas mostraram aumento da expressão proteica do ATF4 e do pEIF2 α , indicando a ativação da via de resposta ao aminoácido, que ocorre quando há ausência de aminoácidos essenciais ou em dietas de baixa disponibilidade de proteínas (GALLINETTI, 2013; HARO, 2019). Após 8 horas de tratamento com o L-histidinol, observamos o aumento do conteúdo de lipídeos nessas células, o que pode estar relacionado ao fato de GCN2 regular diferentes vias do metabolismo de gordura no fígado (GUO; CAVENER, 2007). Apesar de GCN2 regular negativamente SREBP1c (GUO; CAVENER, 2007), ou seja, inibindo a via de síntese de lipídeos, Nishi *et al.* (2018) mostraram que a ausência de aminoácidos em meio celular acarretou no aumento do conteúdo de triglicerídeos em linhagem de hepatócitos e cultura primária de ratos, a partir da ativação da via de lipogênese. Esses resultados sugerem que os hepatócitos parecem responder de maneira autônoma à privação de aminoácidos, o que resulta no aumento de triglicerídeos nessas células (NISHI *et al.*, 2018). O tratamento com o L-histidinol também foi capaz de promover o aumento do conteúdo de ácidos biliares totais. Embora a linhagem HepG2 pode ser utilizada como estudo das vias de síntese de ácidos biliares (COOPER, 1994), ainda não foi relatado o aumento da síntese desses compostos decorrente da ativação da via de resposta ao aminoácido em linhagem celular. Esses resultados nos indicam que, esse modelo *in vitro* de desnutrição de proteínas pode ser utilizado no estudo da esteatose hepática e desregulação do metabolismo dos ácidos biliares, como encontrado em crianças com desnutrição severa (ZHANG *et al.*, 2016).

Nosso grupo já tem demonstrado que, a redução de proteínas totais na dieta no pós-desmame leva à um menor ganho de peso corporal, aumento relativo de gordura perigonadal e redução plasmática de proteínas totais e albumina (BATISTA *et al.*, 2012 e 2013; CAPPELLI *et al.*, 2014). Estes animais também apresentaram aumento da tolerância à glicose e à insulina em comparação ao grupo controle, fator esse que, em partes, pode estar relacionado à uma maior ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no fígado desses animais (XIAO *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2012).

A desnutrição proteica leva à redução do conteúdo plasmático de triglicerídeos e o mesmo foi encontrado em nosso modelo experimental. Esse fator pode estar relacionado à redução de lipoproteínas plasmáticas e exportação hepática de VLDL encontrada nesses indivíduos e, dessa forma, contribuir para o acúmulo de lipídeos no fígado e instalação da esteatose hepática (FLORES, 1970; WHITEHEAD; ALLEYNE, 1972; EL HARIM *et al.*, 1993). Nosso modelo de restrição de proteínas totais também resultou no desenvolvimento de esteatose hepática, característica essa encontrada em outros estudos de desnutrição proteica instalada em modelo experimental (KUMAR, 1972; TOYOSHIMA *et al.*, 2014; VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016; BAUER *et al.*, 2020).

O acúmulo de gordura no fígado que ocorre em pacientes obesos e diabéticos está associado a uma maior concentração do *pool* de AB totais (BECHMANN *et al.*, 2013; MOUZAKI *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2018). Entretanto, este fenômeno parece não ser a causa da doença, mas sim uma consequência da mesma (CHIANG, 2013). A mesma condição também foi observada em crianças severamente desnutridas, que desenvolveram DHGNA e desregulação do metabolismo dos ácidos biliares (ZHANG *et al.*, 2016). Resultado semelhante ao encontrado em nosso modelo de desnutrição que apresentou esteatose hepática associada ao aumento do *pool* de ácidos biliares totais séricos.

Ratos tratados com dieta hipoproteica após o desmame, desenvolveram esteatose hepática associada ao aumento de AB totais e redução dos conjugados à taurina (VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016). O tratamento com TUDCA reduziu o acúmulo de gordura hepática em modelo animal de obesidade (YANG *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015) e esteato-hepatite não alcoólica (CHO *et al.*, 2014). Sendo assim, propomos utilizar o TUDCA como tratamento da esteatose hepática em nosso modelo de desnutrição proteica, e verificar também, o envolvimento desse composto na regulação da síntese dos AB.

O tratamento com o TUDCA não interferiu no peso corporal, do fígado e da gordura perigonadal de ambos os grupos tratados. A redução do peso corporal e de gordura após tratamento com o TUDCA foi observada em animais obesos, mas não em animais controle (VETTORAZZI *et al.*, 2017). Sendo assim, o efeito do TUDCA nesses tecidos parece estar relacionado ao sobrepeso e não a subnutrição. O conteúdo sérico de albumina foi reestabelecido após o tratamento com o TUDCA no grupo desnutrido, enquanto o de proteínas totais apresentou um leve aumento. Em

um estudo clínico, pacientes com cirrose tratados com TUDCA, apresentaram aumento dos níveis de albumina plasmática, fator esse que pode estar relacionado à melhora do quadro hepático após o tratamento (PAN *et al.*, 2013).

O tratamento com o TUDCA em nosso modelo de desnutrição proteica reduziu o acúmulo de gordura hepática encontrada nesses animais. Redução do conteúdo hepático de triglicerídeos e de colesterol total, também foi relatado em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com TUDCA (WANG *et al.*, 2018). Estudos prévios sugerem que o TUDCA pode melhorar a esteatose hepática de camundongos obesos através da redução do estresse de retículo e da *de novo* lipogênese, com aumento da autofagia e da oxidação dos AG (GUO *et al.*, 2015). Em modelo de esteato-hepatite, o TUDCA não foi capaz de reduzir o conteúdo hepático de lipídeos, mas reduziu a gravidade da doença através da redução de marcadores pró-inflamatórios, estresse oxidativo e apoptose (CHO *et al.*, 2014). Os efeitos benéficos do tratamento com TUDCA sobre a esteatose hepática também podem estar envolvidos com a modulação de genes envolvidos na *de novo* lipogênese e β -oxidação (YANG *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018), entretanto, nosso estudo sugere o envolvimento desse AB na exportação hepática de lipídeos, visto que o TUDCA reestabeleceu os níveis séricos de triglicerídeos encontrado nos animais desnutridos.

A fim de buscar um mecanismo pelo o qual o acúmulo de gordura possa estar ocorrendo no grupo desnutrido e de ação do TUDCA, analisamos alguns principais genes e proteínas envolvidos no metabolismo hepático de lipídeos. A *de novo* lipogênese parece não ser uma das vias responsáveis pela instalação da esteatose hepática nos animais desnutridos, visto que houve a redução da expressão gênica do SREBP1c. Esse fator pode estar relacionado à ativação da via de resposta a aminoácidos, que inibe a *de novo* lipogênese (GUO; CAVENER, 2007; ANTHONY, 2013). Embora estudos demonstrem a regulação do TUDCA em genes que participam da síntese hepática de lipídeos (YANG *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015), esse mecanismo de ação parece não ter ocorrido em nosso modelo.

A oxidação dos ácidos graxos está reduzida em crianças internadas com *Kwashiorkor* (BADALOO, 2006). Isso pode estar relacionado à deformações na morfologia das mitocôndrias e peroxissomos, e prejuízos na atividade dos complexos I e IV da OXPHOS (VAN ZUTPHEN *et al.*, 2016). Nossos resultados não indicam prejuízos na β -oxidação, embora haja necessidade de mais experimentos para validar

essa afirmação. Também vale ressaltar que, há diferenças no modelo animal e no tempo de indução da desnutrição proteica no estudo de Van Zutphen *et al.* (2016). Além do mais, o TUDCA parece também não ter influenciado na β -oxidação como outros estudos demonstraram (GUO *et al.*, 2015).

O aumento de triglicerídeos hepático associado à redução desses no soro nos indicam uma possível desregulação na exportação de VLDL nos animais desnutridos. O TUDCA pode ter atuado nessa via, pois a redução do conteúdo hepático de triglicerídeos após o tratamento com esse AB também resultou no reestabelecimento sérico de triglicerídeos. Embora nossos resultados moleculares não nos indiquem alterações na via de exportação hepática de lipídeos, mais experimentos podem ser feitos para responder essa hipótese. Em linhagem celular de hepatócitos e camundongos tratados com concentração moderada de ácido oleico, apresentaram aumento na expressão proteica da Apo-B. Entretanto, altas concentrações do ácido oleico, não modulou a expressão proteica dessa apolipoproteína, o que estava associado também a elevados níveis de marcadores do estresse de retículo, e comprometendo assim, a exportação de VLDL (OTA, 2008; CAVIGLIA *et al.*, 2011). Esse fator pode justificar o aumento da expressão gênica da Apo-B encontrada no grupo restrito, uma vez que a esteatose hepática decorrente da desnutrição se apresenta em níveis mais moderados do que a esteatose decorrente da obesidade.

O estresse de retículo também está relacionado à regulação do metabolismo lipídico hepático e ao desenvolvimento das DHGNA (ZHANG *et al.*, 2014). Em condições de estresse de retículo, a enzima 1 que requer inositol α (IRE1 α) exerce efeito protetor na instalação da esteatose hepática (ZHANG *et al.*, 2011). Entretanto, a deleção da via IRE1 α -XBP1s, resultou no acúmulo hepático de gordura, decorrente da redução da exportação de VLDL (ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2012), relataram que a redução na exportação hepática de lipídeos em camundongos *knockout* para o IRE1 α , ocorreu devido à má formação da molécula de VLDL, que ocorre no retículo endoplasmático, e isso se deu devido à redução na atividade da MTP. Entretanto, esses autores não observaram alterações na expressão gênica e proteica da MTP, mas sim redução da proteína dissulfeto isomerase (PDI), que é componente funcional da molécula de MTP. Sendo assim, a não diferença na expressão gênica e proteica da MTP encontrada entre nossos grupos experimentais, não necessariamente reflete como está a atividade dessa proteína. Também, a

redução na expressão gênica do XBP1s encontrada no grupo restrito pode indicar disfunção na exportação hepática do VLDL.

A redução de marcadores do estresse de retículo após o tratamento com o TUDCA pode ter contribuído para a melhora da esteatose hepática de nosso modelo (YANG *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015; MURAMATSU-KATO *et al.*, 2015). Entretanto, o tratamento com o AB não influenciou na expressão da CHOP e XBP1s, como mostrado por Cho *et al.* (2014), talvez por diferenças entre as doses administradas nos trabalhos.

O metabolismo dos ácidos biliares também exerce efeito no metabolismo lipídico hepático. A via de sinalização hepática FXR-SHP reduz hipertrigliceridemia e a lipogênese através da inibição do SREBP1-c (WATANABE *et al.*, 2004). Entretanto, exerce um efeito inibitório na secreção hepática de VLDL através da inibição do HNF4 α que reduz a atividade da MTP (HIROKANE *et al.*, 2004). Esse efeito também pode estar ocorrendo em nosso animal desnutrido, visto que houve o aumento da expressão proteica do FXR. A relação do TUDCA com o receptor nuclear FXR ainda precisa ser melhor compreendida. Alguns relatam apenas possuir baixa afinidade ao receptor (CHIANG, 2013), enquanto outros relatam o antagonismo (SUN *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2021). Entretanto, de alguma forma o TUDCA foi capaz de reduzir parcialmente a expressão proteica do FXR e reduzir a expressão gênica do SHP, o que pode ter contribuído por uma melhora na atividade da MTP e consequentemente, no aumento da exportação hepática de lipídeos.

O aumento da síntese de AB totais está relacionado com maior expressão da enzima CYP7A1 que pode ocorrer tanto no aumento (SUBBIAH; YUNKER, 1984; LI *et al.*, 2012; MOUZAKI *et al.*, 2016) como na redução do aporte energético (MEHTA, 1984; FU; KLAASSEN, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Nosso trabalho mostrou que a redução do aporte de proteínas totais da dieta levou ao aumento da síntese de AB e da expressão proteica da CYP7A1 e CYP27A1.

O FXR no fígado é ativado por AB sendo o CDCA o de maior afinidade. FXR ativado irá induzir SHP, o qual irá inibir a transcrição da CYP7A1 através da inibição de receptores nucleares que se ligam a região promotora da CYP7A1, como o LRH-1 e o HNF4 α (CHIANG, 2013). Camundongos *knockout* para o gene do FXR apresentam aumento de AB e da expressão da CYP7A1 (SINAL *et al.*, 2000). Nesses animais também é encontrado esteatose hepática severa, desregulação do metabolismo da glicose e resistência à insulina (MA, 2006). Em modelo animal de

diabetes e em pacientes com DHGNA foi relatado redução na expressão do FXR no fígado, fator esse que implicou no aumento da expressão da CYP7A1 (DURAN-SANDOVAL *et al.*, 2004; YANG; KIM *et al.*, 2010). Por outro lado, o aumento de AB encontrado em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica e também na restrição calórica, não foi suficiente para inibir a expressão da CYP7A1 através da ativação do FXR hepático (FU; KLAASSEN, 2013; JIAO *et al.*, 2018). Isso indica a participação de outra via, independente de FXR-SHP, na regulação da CYP7A1. De fato, a via do FXR intestinal que induz o hormônio FGF15/19 parece ser mais importante para a inibição da CYP7A1 (KIM *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2012). Nossos dados corroboram com essa hipótese, já que a ativação do FXR do fígado não foi capaz de inibir a síntese de AB, indicando um possível envolvimento da via FXR-FGF15/19 no intestino como principal reguladora da CYP7A1 em modelo de desnutrição proteica.

A conjugação dos AB é importante para reduzir sua toxicidade e aumentar a absorção intestinal de lipídeos. É realizada nos hepatócitos por duas enzimas, a BAC e a BAAT, responsáveis por agregar um aminoácido glicina ou taurina na molécula de AB (LI; CHIANG, 2014). A regulação dessas enzimas é realizada pelo FXR, que através da associação com o receptor retinóide α (RXR) se ligam a região promotora da BAC e da BAAT dando início a suas transcrições (PIRCHER *et al.*, 2003). A desnutrição parece prejudicar a conjugação dos AB (MEHTA, 1984; VAN ZUTPHEN; CIAPAITE *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016), fator esse que, em partes, pode explicar a má absorção intestinal encontrada nesses indivíduos (GOMEZ *et al.*, 1956; SCHNEIDER; VITERI, 1974; VITERI, 1973). Todavia, esses estudos não relacionaram o envolvimento das enzimas responsáveis pela conjugação do AB na desnutrição. No atual trabalho, encontramos redução na expressão gênica da BAC, mesmo havendo a ativação do FXR. Entretanto, ainda há necessidade de mais experimentos para determinar se em nosso modelo de desnutrição existe o comprometimento na conjugação dos AB.

O aumento de gordura hepática pode desencadear no desenvolvimento de processo inflamatório (LUCI *et al.*, 2020). Também foi relatado o aumento do marcador pró-inflamatório TNF α em crianças e modelo animal de desnutrição (GIOVANBATTISTA, 2000; DEWAN, 2009; MURAMATSU-KATO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2020;). Em nosso trabalho encontramos aumento na expressão gênica de TNF α nos animais desnutridos, e que foi revertida após o tratamento com o TUDCA. O TUDCA também reduziu a expressão do TNF α e de outros marcadores

de inflamação, em diferentes modelos de DHGNA (MURAMATSU-KATO *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2015; CHO *et al.*, 2014). Isso pode estar ocorrendo devido à ativação do TGR5 pelo TUDCA, principalmente nas células *Kupffer*, que gera uma cascata de eventos que resulta na redução da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias.

6. CONCLUSÃO

Os principais resultados encontrados no trabalho foram:

- A ativação da via de resposta à aminoácido em células HepG2 promoveram o aumento do conteúdo de gordura e de ácidos biliares totais nessas células.
- A restrição para 6% de proteínas totais na dieta de camundongos após o desmame durante 16 semanas resultou na redução do ganho de peso corporal, albumina, proteínas totais e triglicerídeos séricos; aumento hepático de gorduras totais; aumento sérico de ácidos biliares totais e de enzimas que regulam a síntese desses compostos; aumento de marcadores do estresse de retículo e de inflamação.
- O tratamento com o TUDCA reduziu o conteúdo hepático de gorduras totais, normalizou os níveis séricos de albumina e triglicerídeos, regulou enzimas responsáveis pela síntese dos ácidos biliares, reduziu marcadores do estresse de retículo e de inflamação de camundongos submetidos à dieta restrita em proteínas totais.

Sendo assim, embora ainda seja necessário elucidar melhor os mecanismos moleculares envolvidos na instalação do acúmulo de gordura no fígado decorrente da desnutrição, o TUDCA parece exercer um efeito positivo no tratamento dessa condição nesse modelo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. A.; WATERS, O. R.; KNUIMAN, M. W.; ELLIOTT, R. R. *et al.* NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. **Am J Gastroenterol**, 104, n. 4, p. 861-867, 2009.

AIRES, C. C.; IJLST, L.; STET, F.; PRIP-BUUS, C. *et al.* Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. **Biochem Pharmacol**, 79, n. 5, p. 792-799, 2010.

AMPONG, I.; WATKINS, A.; GUTIERREZ-MERINO, J.; IKWUOBE, J. *et al.* Dietary protein insufficiency: an important consideration in fatty liver disease? **Br J Nutr**, 123, n. 6, p. 601-609, 2020.

ANTHONY, T. G.; MORRISON, C. D.; GETTYS, T. W. Remodeling of lipid metabolism by dietary restriction of essential amino acids. **Diabetes**, 62, n. 8, p. 2635-2644, 2013.

ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annu Rev Pathol**, 13, p. 321-350, 2018.

BADALOO, A.; REID, M.; SOARES, D.; FORRESTER, T. *et al.* Relation between liver fat content and the rate of VLDL apolipoprotein B-100 synthesis in children with protein-energy malnutrition. **Am J Clin Nutr**, 81, n. 5, p. 1126-1132, 2005.

BADALOO, A. V.; FORRESTER, T.; REID, M.; JAHOOOR, F. Lipid kinetic differences between children with kwashiorkor and those with marasmus. **Am J Clin Nutr**, 83, n. 6, p. 1283-1288, 2006.

BANDSMA, R. H.; MENDEL, M.; SPOELSTRA, M. N.; REIJNGOUD, D. J. *et al.* Mechanisms behind decreased endogenous glucose production in malnourished children. **Pediatr Res**, 68, n. 5, p. 423-428, 2010.

BATISTA, T. M.; RIBEIRO, R. A.; AMARAL, A. G.; DE OLIVEIRA, C. A. *et al.* Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets

from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. **J Nutr Biochem**, 23, n. 3, p. 306-312, 2012.

BATISTA, T. M.; RIBEIRO, R. A.; DA SILVA, P. M.; CAMARGO, R. L. *et al.* Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. **Mol Nutr Food Res**, 57, n. 3, p. 423-434, 2013.

BAUER, K. C.; HUUS, K. E.; BROWN, E. M.; BOZORGMEHR, T. *et al.* Dietary Intervention Reverses Fatty Liver and Altered Gut Microbiota during Early-Life Undernutrition. **mSystems**, 5, n. 5, 2020.

BECHMANN, L. P.; KOCABAYOGLU, P.; SOWA, J. P.; SYDOR, S. *et al.* Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 57, n. 4, p. 1394-1406, 2013.

BERLANGA, A.; GUIU-JURADO, E.; PORRAS, J. A.; AUGUET, T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol**, 7, p. 221-239, 2014.

BEUERS, U.; BILZER, M.; CHITTATTU, A.; KULLAK-UBLICK, G. A. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. **Hepatology**, 33, n. 5, p. 1206-1216, 2001.

BHATTACHARYYA, A. K. Protein-energy malnutrition (Kwashiorkor-Marasmus syndrome): terminology, classification and evolution. **World Rev Nutr Diet**, 47, p. 80-133, 1986.

BHUTTA, Z. A.; BERKLEY, J. A.; BANDSMA, R. H. J.; KERAC, M. *et al.* Severe childhood malnutrition. **Nat Rev Dis Primers**, 3, p. 17067, 2017.

BRENSEKE, B.; PRATER, M. R.; BAHAMONDE, J.; GUTIERREZ, J. C. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. **J Pregnancy**, 2013, p. 368461, 2013.

BRONCZEK, G. A.; VETTORAZZI, J. F.; SOARES, G. M.; KURAUTI, M. A. *et al.* The Bile Acid TUDCA Improves Beta-Cell Mass and Reduces Insulin Degradation in Mice With Early-Stage of Type-1 Diabetes. **Front Physiol**, 10, p. 561, 2019.

CABRERA, D.; ARAB, J. P.; ARRESE, M. UDCA, NorUDCA, and TUDCA in Liver Diseases: A Review of Their Mechanisms of Action and Clinical Applications. **Handb Exp Pharmacol**, 256, p. 237-264, 2019.

CAPPELLI, A. P.; ZOPPI, C. C.; BARBOSA-SAMPAIO, H. C.; COSTA, J. M. *et al.* Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. **Liver Int**, 34, n. 5, p. 771-783, 2014.

CAVIGLIA, J. M.; GAYET, C.; OTA, T.; HERNANDEZ-ONO, A. *et al.* Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. **J Lipid Res**, 52, n. 9, p. 1636- 1651, 2011.

CHEN, W.; CHIANG, J. Y. Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). **Gene**, 313, p. 71-82, 2003.

CHIANG, J. Y. Bile acids: regulation of synthesis. **J Lipid Res**, 50, n. 10, p. 1955-1966, 2009.

CHIANG, J. Y. Bile acid metabolism and signaling. **Compr Physiol**, 3, n. 3, p. 1191-1212, 2013.

CHO, E. J.; YOON, J. H.; KWAK, M. S.; JANG, E. S. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid attenuates progression of steatohepatitis in mice fed a methionine-choline-deficient diet. **Dig Dis Sci**, 59, n. 7, p. 1461-1474, 2014.

CLAUDEL, T.; ZOLLNER, G.; WAGNER, M.; TRAUNER, M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. **Biochim Biophys Acta**, 1812, n. 8, p. 867-878, 2011.

COLELL, A.; COLL, O.; GARCÍA-RUIZ, C.; PARÍS, R. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. **Hepatology**, 34, n. 5, p. 964-971, 2001.

COOPER, A. D.; CRAIG, W. Y.; TANIGUCHI, T.; EVERSON, G. T. Characteristics and regulation of bile salt synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. **Hepatology**, 20, n.6, p. 1522-1531, 1994.

CORTEZ, L.; SIM, V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. **Prion**, 8, n. 2, 2014.

COWARD, W. A.; WHITEHEAD, R. G. Changes in serum -lipoprotein concentration during the development of kwashiorkor and in recovery. **Br J Nutr**, 27, n. 2, p. 383-394, 1972.

DA-SILVA, W. S.; RIBICH, S.; ARROJO E DRIGO, R.; CASTILLO, M. *et al.* The chemical chaperones tauroursodeoxycholic and 4-phenylbutyric acid accelerate thyroid hormone activation and energy expenditure. **FEBS Lett**, 585, n. 3, p. 539-544, 2011.

DEWAN, P.; KAUR, I. R.; FARIDI, M. M. A.; ANGARWAL, K. N. Cytokine response to dietary rehabilitation with curd (Indian dahi) & leaf protein concentrate in malnourished children. **Indian J. Med. Res.**, 130, n. 1, p. 31-36, 2009.

DURAN-SANDOVAL, D.; MAUTINO, G.; MARTIN, G.; PERCEVAULT, F. *et al.* Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. **Diabetes**, 53, n. 4, p. 890-898, 2004.

DÜFER, M.; HÖRTH, K.; WAGNER, R.; SCHITTENHELM, B. *et al.* Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. **Diabetes**, 61, n. 6, p. 1479-1489, 2012.

EL HARIM, I.; BEFORT, J. J.; BALAFREJ, A.; LAHRICHI, M. *et al.* Lipids and lipoproteins of malnourished children during early renutrition: apolipoprotein A-IV as a potential index of recovery. **Am J Clin Nutr**, 58, n. 3, p. 407-411, 1993.

FLETCHER, K. Observations on the origin of liver fat in infantile malnutrition. **Am J Clin Nutr**, 19, n. 3, p. 170-174, 1966.

FLORES, H.; PAK, N.; MACCIONI, A.; MONCKEBERG, F. Lipid transport in kwashiorkor. **Br J Nutr**, 24, n. 4, p. 1005-1011, 1970.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FU, Z. D.; KLAASSEN, C. D. Increased bile acids in enterohepatic circulation by short-term calorie restriction in male mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, 273, n. 3, p. 680-690, 2013.

FUCHS, C. D.; SCHWABL, P.; REIBERGER, T.; TRAUNER, M. Liver Capsule: FXR agonists against liver disease. **Hepatology**, 64, n. 5, p. 1773, 2016.

GALLINETTI, J.; HARPUTLUGIL, E.; MITCHELL, J. R. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. **Biochem J**, 449, n. 1, p. 1-10, 2013.

GIOVANBATTISTA, A.; SPINEDI, E.; SANJURJO, A.; CHISARI, A. *et al.* Circulating and mitogen-induced tumor necrosis factor (TNF) in malnourished children. **J. Medicine (B. Aires)**, 60, n. 6, p. 339-342, 2000.

GOMEZ, F.; GALVAN, R. R.; CRAVIOTO, J.; FRENK, S. *et al.* Fat absorption in chronic severe malnutrition in children. **Lancet**, 271, n. 6934, p. 121-122, 1956.

GONZÁLEZ-GARCÍA, I.; CONTRERAS, C.; ESTÉVEZ-SALGUERO, Á.; RUÍZ-PINO, F. *et al.* Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. **Cell Rep**, 25, n. 2, p. 413-423.e415, 2018.

GUO, F.; CAVENER, D. R. The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. **Cell Metab**, 5, n. 2, p. 103-114, 2007.

GUO, Q.; SHI, Q.; LI, H.; LIU, J. *et al.* Glycolipid Metabolism Disorder in the Liver of Obese Mice Is Improved by TUDCA via the Restoration of Defective Hepatic Autophagy. **Int J Endocrinol**, 2015, p. 687938, 2015.

HALES, C. N. Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. **Acta Paediatr Suppl**, 423, p. 184-187; discussion 188, 1997.

HARO, D.; MARRERO, P. F.; RELAT, J. Nutritional Regulation of Gene Expression: Carbohydrate-, Fat- and Amino Acid-Dependent Modulation of Transcriptional Activity. **Int J Mol Sci**, 20, n. 6, 2019.

HERMAN, M. A.; SAMUEL, V. T. The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. **Trends Endocrinol Metab**, 27, n. 10, p. 719-730, 2016.

HIROKANE, H.; NAKAHARA, M.; TACHIBANA, S.; SHIMIZU, M. *et al.* Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. **J Biol Chem**, 279, n. 44, p. 45685-45692, 2004.

HUANG, J.; IQBAL, J.; SAHA, P. K.; LIU, J. *et al.* Molecular characterization of the role of orphan receptor small heterodimer partner in development of fatty liver. **Hepatology**, 46, n. 1, p. 147-157, 2007.

IIBOSHI, Y.; PAPST, P. J.; KAWASOME, H.; HOSOI, H. *et al.* Amino acid-dependent control of p70(s6k). Involvement of tRNA aminoacylation in the regulation. **J Biol Chem**, 274, n. 2, p. 1092-1099, 1999.

JIAO, N.; BAKER, S. S.; CHAPA-RODRIGUEZ, A.; LIU, W. *et al.* Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. **Gut**, 67, n. 10, p. 1881-1891, 2018.

KARS, M.; YANG, L.; GREGOR, M. F.; MOHAMMED, B. S. *et al.* Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. **Diabetes**, 59, n. 8, p. 1899-1905, 2010.

KAST, H. R.; NGUYEN, C. M.; SINAL, C. J.; JONES, S. A. *et al.* Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. **Mol Endocrinol**, 15, n. 10, p. 1720-1728, 2001.
KEITEL, V.; HÄUSSINGER, D. Role of TGR5 (GPBAR1) in liver disease. **Seminars in liver disease**, 38, n. 4, p. 333-339, 2018.

KIM, I.; AHN, S. H.; INAGAKI, T.; CHOI, M. *et al.* Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. **J Lipid Res**, 48, n. 12, p. 2664-2672, 2007.

KONG, B.; WANG, L.; CHIANG, J. Y.; ZHANG, Y. *et al.* Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. **Hepatology**, 56, n. 3, p. 1034-1043, 2012.

KUMAR, V.; DEO, M. G.; RAMALINGASWAMI, V. Mechanism of fatty liver in protein deficiency. An experimental study in the rhesus monkey. **Gastroenterology**, 62, n. 3, p. 445-451, 1972.

KUSACZUK, M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. **Cells**, 8, n. 12, 2019.

LEFEBVRE, P.; CARIOU, B.; LIEN, F.; KUIPERS, F. *et al.* Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. **Physiol Rev**, 89, n. 1, p. 147-191, 2009.

LEWIS, B.; HANSEN, J. D.; WITTMAN, W.; KRUT, L. H. *et al.* PLASMA FREE FATTY ACIDS IN KWASHIORKOR AND THE PATHOGENESIS OF THE FATTY LIVER. **Am J Clin Nutr**, 15, p. 161-168, 1964.

LEWIS, B.; WITTMANN, W.; KRUT, L. H.; HANSEN, J. D. *et al.* Free fatty acid flux through plasma in protein malnutrition of infants. **Clin Sci**, 30, n. 3, p. 371-375, 1966.

LEWIS, G. F.; CARPENTIER, A.; ADELI, K.; GIACCA, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocr Rev**, 23, n. 2, p. 201-229, 2002.

LI, Q.; DUTTA, A.; KRESGE, C.; BUGDE, A. *et al.* Bile acids stimulate cholangiocyte fluid secretion by activation of transmembrane member 16A Cl. **Hepatology**, 68, n. 1, p. 187-199, 2018.

LI, T.; CHIANG, J. Y. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacol Rev**, 66, n. 4, p. 948-983, 2014.

LI, T.; FRANCL, J. M.; BOEHME, S.; OCHOA, A. *et al.* Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. **J Biol Chem**, 287, n. 3, p. 1861-1873, 2012.

LIU, X.; GUO, Y.; WANG, J.; ZHU, L. *et al.* Dysregulation in the Unfolded Protein Response in the FGR Rat Pancreas. **Int J Endocrinol**, 20, 2020.

LUCI, C.; BOURINET, M.; LECLÈRE, P. S.; ANTY, R. *et al.* Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Front. Endocrinol.**, 14, v. 11, 2020.

MA, K.; SAHA, P. K.; CHAN, L.; MOORE, D. D. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. **J Clin Invest**, 116, n. 4, p. 1102-1109, 2006.

MARTINS, V. J.; TOLEDO FLORÊNCIO, T. M.; GRILLO, L. P.; DO CARMO P FRANCO, M. *et al.* Long-lasting effects of undernutrition. **Int J Environ Res Public Health**, 8, n. 6, p. 1817-1846, 2011.

MEHLEM, A.; HAGBERG, C. E.; MUHL, L.; ERIKSSON, U. *et al.* Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nat Protoc**, 8, n. 6, p. 1149-1154, 2013.

MEHTA, H. C.; SAINI, A. S.; SINGH, H.; DHATT, P. S. Biochemical aspects of malabsorption in marasmus. **Br J Nutr**, 51, n. 1, p. 1-6, 1984.

MIAO, J.; XIAO, Z.; KANAMALURU, D.; MIN, G. *et al.* Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation. **Genes Dev**, 23, n. 8, p. 986-996, 2009.

MOUZAKI, M.; WANG, A. Y.; BANDSMA, R.; COMELLI, E. M. *et al.* Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **PLoS One**, 11, n. 5, p. e0151829, 2016.

MURAMATSU-KATO, K.; ITOH, H.; KOHMURA-KOBAYASHI, Y.; FERDOUS, U. J. *et al.* Undernourishment in utero Primes Hepatic Steatosis in Adult Mice Offspring on an Obesogenic Diet; Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress. **Sci Rep**, 5, p. 16867, 2015.

NAGAHASHI, M.; TAKABE, K.; LIU, R.; PENG, K. *et al.* Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. **Hepatology**, 61, n. 4, p. 1216-1226, 2015.

NAGAHASHI, M.; YUZA, K.; HIROSE, Y.; NAKAJIMA, M. *et al.* The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases. **J Lipid Res**, 57, n. 9, p. 1636-1643, 2016.

NISHI, H.; YAMANAKA, D.; KAMEI, H.; GODA, Y. *et al.* Importance of Serum Amino Acid Profile for Induction of Hepatic Steatosis under Protein Malnutrition. **Sci Rep**, 8, n. 3, p. 5461, 2018.

OTA, T.; GAYET, C.; GINSBERG, H. N. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. **J Clin Invest**, 118, n. 1, p. 316-332, 2008.

OZCAN, L.; ERGIN, A. S.; LU, A.; CHUNG, J. *et al.* Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell Metab**, 9, n. 1, p. 35-51, 2009.

OZCAN, U.; YILMAZ, E.; OZCAN, L.; FURUHASHI, M. *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**, 313, n. 5790, p. 1137-1140, 2006.

PAN, X.; ZHAO, L.; LI, L.; LI, A. *et al.* Efficacy and safety of tauroursodeoxycholic acid in the treatment of liver cirrhosis: A double-blind randomized controlled trial. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 33, n. 2, p. 189-194, 2013.

PEREZ, M. J.; BRIZ, O. Bile-acid-induced cell injury and protection. **World J Gastroenterol**, 15, n. 14, p. 1677-1689, 2009.

PIRCHER, P. C.; KITTO, J. L.; PETROWSKI, M. L.; TANGIRALA, R. K. *et al.* Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. **J Biol Chem**, 278, n. 30, p. 27703-27711, 2003.

PISCAGLIA, F.; SVEGLIATI-BARONI, G.; BARCHETTI, A.; PECORELLI, A. *et al.* Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. **Hepatology**, 63, n. 3, p. 827-838, 2016.

POREZ, G.; PRAWITT, J.; GROSS, B.; STAELS, B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. **J Lipid Res**, 53, n. 9, p. 1723-1737, 2012.

RUSSELL, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. **Annu Rev Biochem**, 72, p. 137-174, 2003.

SANTOS, M. J. S.; CANUTO, K. M.; DE AQUINO, C. C.; MARTINS, C. S. *et al.* Brazilian regional basic diet-induced chronic malnutrition drives liver inflammation with higher ApoA-I activity in C57BL6J mice. **Braz J Med Biol Res**, 53, n. 6, 2020

SCHNEIDER, R. E.; VITERI, F. E. Luminal events of lipid absorption in protein-calorie malnourished children; relationship with nutritional recovery and diarrhea. I. Capacity of the duodenal content to achieve micellar solubilization of lipids. **Am J Clin Nutr**, 27, n. 8, p. 777-787, 1974.

SCHOEMAKER, M. H.; CONDE DE LA ROSA, L.; BUIST-HOMAN, M.; VRENKEN, T. E. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. **Hepatology**, 39, n. 6, p. 1563-1573, 2004.

SHAN, J.; DONELAN, W.; HAYNER, J. N.; ZHANG, F. *et al.* MAPK signaling triggers transcriptional induction of cFOS during amino acid limitation of HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta**, 1853, n. 3, p. 539-548, 2015.

SINAL, C. J.; TOHKIN, M.; MIYATA, M.; WARD, J. M. *et al.* Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. **Cell**, 102, n. 6, p. 731-744, 2000.

SKOGEN, J. C.; OVERLAND, S. The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. **JRSM Short Rep**, 3, n. 8, p. 59, 2012.

STAELS, B.; HANDELSMAN, Y.; FONSECA, V. Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. **Curr Diab Rep**, 10, n. 1, p. 70-77, 2010.

SUBBIAH, M. T.; YUNKER, R. L. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase of rat liver: an insulin sensitive enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, 124, n. 3, p. 896-902, 1984.

SUN, L.; XIE, C.; WANG, G.; WU, Y. *et al.* Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. **Nat Med**, 24, n. 12, p. 1919-1929, 2018.

THOMAS, C.; PELLICCIARI, R.; PRUZANSKI, M.; AUWERX, J. *et al.* Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 7, n. 8, p. 678-693, 2008.

TOYOSHIMA, Y.; TOKITA, R.; TAGUCHI, Y. *et al.* Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. **Endocr J**, 61, n. 5, p. 499-512, 2014.

TRUSWELL, A. S.; MILLER, J. C. Pathogenesis of the fatty liver in protein-energy malnutrition. **Am J Clin Nutr**, 57, n. 5, p. 695-696, 1993.

VAN ZUTPHEN, T.; CIAPAITE, J.; BLOKS, V. W.; ACKERELEY, C. *et al.* Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. **J Hepatol**, 65, n. 6, p. 1198-1208, 2016.

VETTORAZZI, J. F.; KURAUTI, M. A.; SOARES, G. M.; BORCK, P. C. *et al.* Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 14876, 2017.

VETTORAZZI, J. F.; RIBEIRO, R. A.; BORCK, P. C.; BRANCO, R. C. *et al.* The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via the cAMP/PKA pathway in pancreatic beta cells. **Metabolism**, 65, n. 3, p. 54-63, 2016.

VITERI, F. E.; FLORES, J. M.; ALVARADO, J.; BÉHAR, M. Intestinal malabsorption in malnourished children before and during recovery. Relation between severity of protein deficiency and the malabsorption process. **Am J Dig Dis**, 18, n. 3, p. 201-211, 1973.

WANG, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. **Cell Death Dis**, 5, p. e996, 2014.

WANG, W.; ZHAO, J.; GUI, W.; SUN, D. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid inhibits intestinal inflammation and barrier disruption in mice with non-alcoholic fatty liver disease. **Br J Pharmacol**, 175, n. 3, p. 469-484, 2018.

WANG, S.; CHEN, Z.; LAM, V.; FINCK, B. N. *et al.* IRE1a-XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 473-486, 2012.

WARRINGTON, R. C.; WRATTEN, N.; HECHTMAN, R. L-Histidinol inhibits specifically and reversibly protein and ribosomal RNA synthesis in mouse L cells. **J Biol Chem**, 252, n. 15, p. 5251-5257, 1977.

WATANABE, M.; HOUTEN, S. M.; WANG, L.; MOSCHETTA, A. *et al.* Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. **J Clin Invest**, 113, n. 10, p. 1408-1418, 2004.

WHITEHEAD, R. G.; ALLEYNE, G. A. Pathophysiological factors of importance in protein-calorie malnutrition. **Br Med Bull**, 28, n. 1, p. 72-79, 1972.

WHO. **Fact sheets - Malnutrition**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>>. Acesso em: 24 de março de 2021.

XIAO, F.; HUANG, Z.; LI, H.; YU, J. *et al.* Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. **Diabetes**, 60, n. 3, p. 746-756, 2011.

XIE, Q.; KHAOUSTOV, V. I.; CHUNG, C. C.; SOHN, J. *et al.* Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. **Hepatology**, 36, n. 3, p. 592-601, 2002.

YANG, J. S.; KIM, J. T.; JEON, J.; PARK, H. S. *et al.* Changes in hepatic gene expression upon oral administration of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid in ob/ob mice. **PLoS One**, 5, n. 11, p. e13858, 2010.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZHANG, K.; WANG, S.; MALHOTRA, J.; HASSLER, J. R. *et al.* The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis. **Embo. J.**, 30, n. 7, p. 1357-1375, 2011.

ZHANG, X.; XU, C.; YU, C.; CHEN, W. *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J. Gastroenterol.**, 20, n. 7, p. 1768-1776, 2014.

ZHANG, L.; VOSKUIJL, W.; MOUZAKI, M.; GROEN, A. K. *et al.* Impaired Bile Acid Homeostasis in Children with Severe Acute Malnutrition. **PLoS One**, 11, n. 5, p. e0155143, 2016.

ZHENG, X.; CHEN, T.; JIANG, R.; ZHAO, A. *et al.* Hyocholic acid species improve glucose homeostasis through a distinct TGR5 and FXR signaling mechanism. **Cell Metab**, 33, n. 4, p. 791-803.e797, 2021.

ANEXO I



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Papel do ácido biliar TUDCA na síntese e conjugação de ácidos biliares durante a desnutrição: impactos na função hepática**, registrada com o nº **5239-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro** e **Maressa Fernandes Bonfim**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **09/05/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	04/03/2019 a 01/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	09/05/2019 a 01/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6/Junib
No. de animais:	72
idade/Peso:	1.00 Meses / 15.00 Gramas
Sexo:	72 Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **19 de junho de 2019**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO II

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TUDCA NA DEPOSIÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA E NO METABOLISMO DOS ÁCIDOS BILIARES DURANTE A RESTRIÇÃO PROTEICA, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 3 de fevereiro de 2022.

Assinatura: _____



Nome do(a) autor(a): Maressa Fernandes Bonfim

RG n.º 37.672.520-5

Assinatura: _____



Nome do(a) orientador(a): Everardo Magalhães Carneiro

RG n.º 6.633.076