

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

MARCELO FONTANA VITTO

**REVERSÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE
OLIGUNUCLEOTÍDEO ANTISENSE SREBP-1c NÃO MELHORA A
AÇÃO DA INSULINA EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS
INDUZIDOS POR DIETA**

CRICIÚMA, MAIO DE 2013

MARCELO FONTANA VITTO

**REVERSÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE
OLIGUNUCLEOTÍDEO ANTISENSE SREBP-1c NÃO MELHORA A
AÇÃO DA INSULINA EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS
INDUZIDOS POR DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Farmacêutico no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza

CRICIÚMA, MAIO DE 2013

MARCELO FONTANA VITTO

**REVERSÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE
OLIGUNUCLEOTÍDEO ANTISENSE SREBP-1c NÃO MELHORA A
AÇÃO DA INSULINA EM FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS
INDUZIDOS POR DIETA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutico no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Ciências da Saúde.

Criciúma, 27 de Junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Claudio Teodoro de Souza - Doutor - (UNESC) – Orientador

Prof. Hugo da Silva Dal Pont - Mestre - (Instituição)

Prof. Silvia Dal Bó - Doutora - (Instituição)

AGRADECIMENTOS

Durante esta longa jornada que durou quatro anos e meio, que me fez conhecer várias pessoas, e principalmente que me trouxe muito conhecimento para seguir minha jornada profissional, para isso começo agradecendo todos os professores do curso de Farmácia que eles são os principais para eu estar nesse dia escrevendo esses agradecimentos.

Começo agradecendo a minha família, em especial a meus pais Edevaldo Luiz Vitto e Luciane Fontana Vitto, pois sem eles não estaria aqui, são os principais responsáveis por eu estar aqui, por ter me dado à oportunidade de estudar. Agradeço a minha adorável irmã, sem ela eu seria um pouco mais largado. Outra pessoa muito especial por eu ter realizado este curso, foi meu tio Eduardo, nunca vou esquecer o dia em que fui ao seu laboratório, e ele me disse pode fazer farmácia, que eu fiz e posso dizer que é um ótimo curso.

Agradeço a faculdade por ter me aberto várias oportunidades, e numa delas eu escolhi o Laboratório de fisiologia do Exercício (LAFIBE) onde conheci várias pessoas muito importantes que com certeza me ajudaram muito nessa vida. Uma pessoa muito especial que foi a que me deu esta oportunidade é o professor Claudio, que certamente com certeza é meu espelho para o resto da vida, muito grato por tudo o que ele me ensinou. Outras pessoas marcantes foi Patrícia, pois afinal ela e eu passamos vários momentos juntos, muitas risadas muitas brigas, afinal éramos duas pessoas, mas que faziam as mesmas coisas estudava junto trabalhávamos juntos, e saíamos de noite, que tristeza em? Saudades. Agradeço ao Lucianinho, ótima pessoa, coração gigante, meu outro espelho; a Thaís menininha

das perguntas; Marisa; Viviane cada dia era uma surpresa, me ensinou muitas coisas, e principalmente a batalhar pelo que queremos nunca desistir; Scherolin; Dani; Alemão e Bianca.

Principalmente aos meus colegas de faculdade, que para nós era tudo diferente, cidade nova, amigos novos, que queríamos que durasse para sempre, muito feliz por tê-los conhecido. E para eles em especial agradeço, Dyeison, Luana, Patricia, Jhonnathan, Henrique, Mariana, Jéssica Darolt, Milena, Lislaine, Juliana e Deise. Alguns deles eram alegrias do meu dia tarde e Noite.

Enfim fico humildemente agradecido às pessoas que passaram na minha vida e que continuam passando por ela, pois que muitas pessoas passam todo dia pela sua vida, mais só alguns continuam nela, e construindo ela para cada vez ser melhor.

“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso verificamos a quantidade e, na desgraça a qualidade.”

Confúcio

**Reversion of steatosis by SREBP-1c antisense
oligonucleotide did not improve hepatic insulin action in
diet-induced obesity mice**

¹Marcelo F Vitto, ¹Gabrielle Luz, ¹Thais F Luciano, ¹Scherolin O Marques, ¹Daneila R Souza, ¹Ricardo A. de Pinho, ¹Fabio S Lira, ²Dennys E Cintra, ^{1,*}Cláudio T. De Souza

¹Exercise Biochemistry and Physiology Laboratory, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

²Faculty of Applied Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Limeira, SP, Brazil.

Abstract

The literature has associated hepatic insulin action and NAFLD. In this sense, treatments to revert steatosis and improve hepatic insulin action become important. Our group has demonstrated that inhibition of Sterol Regulatory Element Binding Proteins-1c (SREBP-1c) reverses hepatic steatosis. However, insulin signals after NAFLD reversion require better investigation. Thus, in this study, we investigated if the reversal of NAFLD by SREBP-1c inhibitor results in improvement in the hepatic insulin signal in obesity mice. After installation/achievement of diet-induced obesity and insulin resistance, Swiss mice were divided in three groups: i) Lean, ii) D-IHS, diet-induced hepatic steatosis (no treatment with ASO) and iii) RD-IHS, reversion of diet-induced hepatic steatosis (treated with ASO). The mice were treated with ASO SREBP-1c as previously described by our group. After ASO treatment, one set of animals was anaesthetized and used for in vivo test, and another mice set was anaesthetized and used for histology and Western blot analysis. Reversion of diet-induced hepatic steatosis did not change blood glucose, glucose decay constant (k_{ITT}), body weight, or serum insulin levels. In addition, results showed that the protocol did not improve insulin pathway signaling, as confirmed by the absence of changes in IR, IRS1, Akt and Foxo1 phosphorylation in hepatic tissue. In parallel, no alterations were observed in pro-inflammatory molecules. Thus, results suggest that the inhibition of SREBP-1c revert steatosis, but without improving insulin hepatic resistance, possibly due steatosis reversion does not alter the pro-inflammatory molecules.

Keywords: SREBP-1c; steatosis; insulin resistance; inflammation.

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an expanding clinical entity and is considered the most common liver disorder in Western countries [1]. The spectrum of the disease covers steatosis to steatohepatitis that can evolve to cirrhosis, the end-stage liver disease. NAFLD is associated with genetics and environmental factors, such as sedentarism, high fat diet and obesity. In the liver, the transcription factor SREBP-1c, the crucial transcription factor responsible for lipogenesis, regulates the production of lipids, inducing the transcription of almost all the genes that encode enzymes involved in fatty acid synthesis and esterification of fatty acids to triglycerides [2]. Previous studies by our group demonstrate that the blocking of SREBP-1c by antisense oligonucleotide (ASO) decreased protein levels of lipogenic enzymes, reducing total liver fat accumulation and, finally, reversing hepatic steatosis in mice [3].

NAFLD is associated with insulin resistance and hyperinsulinemia. Considering the fact that NAFLD patients often have a feature of metabolic syndrome such as insulin resistance and diabetes [4], this dysfunction deserves to be better investigated. The insulin receptor (IR) is a protein with endogenous tyrosine kinase activity that, following activation by insulin, undergoes rapid autophosphorylation and, subsequently, phosphorylates intracellular protein substrates, including insulin receptor substrate (IRS) 1 and 2 [5,6]. After stimulation by insulin, IRS1 and IRS2 associate with several proteins, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Downstream from PI3K, the serine threonine kinase, Akt, is activated and plays a pivotal role in the regulation of various biological processes [7,8]. There is a current consensus that insulin resistance is caused by defects in intracellular insulin

signaling, and several causes have been proposed to justify how the insulin signaling defects is present in NAFLD subjects [9]. Intake of high fat diet and accumulation of hepatocellular lipids activate the two main inflammatory pathways that impair the action of insulin; JNK and IKK/NF κ B. Together, JNK and IKK κ might serve as an inhibitor of insulin signaling, by inducing inhibitory serine 307 (Ser307) phosphorylation of IRS1 [10]. IKK is a serine kinase, and its activation phosphorylates of inhibitor of kappaB (I κ B). After phosphorylation, I κ B is ubiquitinated and degraded in the proteasome, releasing nuclear factor κ B (NF κ B) for the translocation to the nucleus and activation of gene expression [11]. It has been proposed that increased NF κ B activation may play an important role in the pathogenesis of insulin resistance [12].

Hepatic lipid accumulation leads to insulin resistance. However, the reduction in liver lipids to result in improved hepatic insulin resistance needs further investigation. Based on the premises that accumulation of hepatocellular lipids is linked with insulin resistance in NAFLD, we hypothesized that blocking the SREBP-1c reverse steatosis may improve the molecular insulin pathway and reduce hepatic insulin resistance. In this sense, the aim of the present study was to evaluate whether a reversion of diet-induced hepatic steatosis by ASO SREBP-1c improves hepatic insulin resistance in obese mice.

Materials and Methods

Animals and diet

Male, 4-week-old Swiss mice were obtained from our breeding colony (UNESC) and maintained on a 12-h artificial light–dark cycle and housed in individual cages. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies. After the acclimatizing period (3 days), the animals were randomly divided into two groups; control mice (Lean) fed on standard rodent chow and obese mice, fed on a high-fat diet for 2 months (DIO). Eight weeks of fat-rich diet feeding was set as the time by which all mice should have developed obesity [13]. After installation/achievement of diet-induced obesity, mice were divided in two groups: D-IHS, diet-induced hepatic steatosis (no treatment with ASO), and RD-IHS, reversion of diet-induced hepatic steatosis (treated with ASO). The mice were treated intraperitoneally with ASO SREBP-1c (3 nmol/day) for 14 days concurrently with a high-fat diet, as described by Frederico and colleagues [3]. One set of animals was anaesthetized and used for in vivo test, and another mice set was anaesthetized and used for histology and Western blot analysis.

Hormone and biochemical measurements

Serum insulin and TNF α were measured by ELISA kit (Crystal Chem Inc., Chicago, IL). Blood glucose was measured by glucosimeter.

Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT)

Insulin (2 U/kg body weight) was injected via i.p. and blood samples were collected from the tail at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min for blood glucose determination. The constant rate for glucose disappearance (k_{ITT}) was calculated

using the formula $0.693/t_{1/2}$. Glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase [13].

Protein analysis by immunoblotting

As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened. For analysis of the insulin pathway, mice were opened and the animals received an injection of insulin (+) (100 μ l, 10^{-6} mol/l) or saline (-) (100 μ l) through the cava vein. Afterwards, fragments of hepatic tissue were excised. For pro-inflammatory analysis insulin was not injected. The tissues were homogenized immediately in extraction buffer at 4°C with a Polytron MR 2100 (Kinematica, Switzerland), operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 11000 rpm and 4°C (5804R), (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for protein quantification, using the Bradford method [14] and proteins were denatured by boiling in Laemmli [15] sample buffer containing 100 mM DTT. After, 0.2 mg of protein extracts obtained from each sample were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-IR, anti-IRS1, anti-Akt, anti-phospho[Ser473]Akt, anti-Foxo1, anti- β -actin, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-TLR2, anti-MyD88, anti-NF κ B, and anti-IKK β antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-phospho-Foxo1, anti-phospho-IR, anti-phospho-IKK β , anti-TNF α , anti-IL-1 β antibodies was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The original membrane was stripped and reblotted for total protein levels and β -actin loading protein. Chemiluminescent detection was

performed with horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies. Autoradiographs of membranes were taken for visualization of protein bands. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software.

Histology

Hydrated, 5.0 μm sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver fragments of four mice were stained with haematoxylin/eosin and photo-documented using an Olympus BX60 microscope.

Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SEM. Differences between the groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a Bonferroni *post hoc* test was performed. A probability of less than 0.05 was considered significant. The software used for analysis of the data was the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 for Windows.

Results

Diet-induced hepatic steatosis was used in the present study, since studies performed by our group have demonstrated it [3, 16,17]. On the other hand, our group has proved the reversion of steatosis using the ASO technique anti-SREBP-1c

[3]. Thus, in the present study we used ASO SREBP-1c for reversion of diet-induced hepatic steatosis (Fig. 1).

The next step was to evaluate the effect of reversion of steatosis on metabolic and physiological parameters. Table 1 shows comparative data regarding lean, D-IHS and RD-IHS mice. The D-IHS mice had a higher body weight, epididymal fat, serum insulin, blood glucose, serum TNF α , and a lower glucose disappearance than age-matched controls. In RD-IHS mice these parameters were not altered (Table 1). The results of serum insulin, blood glucose and k_{ITT} (Table 1) suggested that the reversion of diet-induced hepatic steatosis model (Fig. 1) is not sufficient to alter the insulin resistance. There was no significant difference in food intake in the group treated with antisense SREBP-1c (data not shown).

The insulin signaling was examined in the liver of D-IHS mice. High-fat diet reduced IR and IRS1 phosphorylation (Figs. 2a and b, respectively). Reversion of steatosis did not result in significant changes in IR and IRS1 phosphorylation. In addition, D-IHS mice demonstrated reduced Akt^{ser473} phosphorylation, when compared with the lean mice (Fig. 2c). Results of equal magnitude occur in the phosphorylation of Foxo1 (Fig. 2d). As a result of the sequence of the state of insulin resistance described above (k_{ITT}), in the livers of the RD-IHS group, Akt^{ser473} and Foxo1 phosphorylation did not change (Figs. 2c and d). No differences were observed in the basal (no insulin) levels of either Akt^{ser473} or Foxo1 phosphorylation between the groups. The IR, IRS1, Akt and Foxo1 protein levels did not differ between the groups (Figs. 2a, b, c and d, lower panels).

To verify why the fatty liver does not alter resistance to insulin, we analyzed inflammatory protein expression. The high-fat diet induced an increase the cytokine TNF α and IL-1 β , when compared with Lean group. The use of SREBP-1c revert

steatosis but not alter the protein levels these cytokines (Figs. 3a and b, respectively). Toll like receptor 2 (TLR2) is a crucial receptor activated to inflammatory signal and saturated fatty acids through of their molecule adaptator MyD88. Livers of the obese mice showed increased protein levels of TLR2 and MyD88, when compared with Lean group (Fig. 3c upper and lower panels, respectively). Steatosis reversion not changes protein levels of TLR2 and MyD88. The high-fat diet increased both IKK β phosphorylation and NF κ B protein levels, when compared to the lean diet (Figs. 3d and e, respectively). Reversion of diet-induced hepatic steatosis does not cause significant changes in either IKK β phosphorylation and NF κ B protein levels, when compared with respective D-IHS mice (Figs. 3d and e, respectively). In The high-fat diet induced an increase JNK phosphorylation in the liver of D-IHS mice, when compared with lean mice (Fig. 3f). In RD-HIS mice significant changes in JNK phosphorylation were observed (Fig. 3f).

Discussion

Hepatic insulin resistance is associated with NAFLD and is a major factor in the pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome [18, 19]. In NAFLD, fat accumulation in the liver may occur as a result of increased fat deposition, increased fat synthesis and reduced fatty acid oxidation [20]. Scientific advances have identified possible molecular mechanisms related to the onset of steatosis. In this sense, some studies have shown that the accumulation of fat in the liver is associated with high levels of SREBP-1c protein [20-22]. Our group has previously demonstrated that inhibition of SREBP-1c by ASO results in decreased protein levels of the lipogenic enzymes, reduction of 69% in total liver fat and, finally,

a reversion of hepatic steatosis in obese mice [3]. However, hepatic insulin action in this model of reversion steatosis has not been described. With this in mind, we evaluated whether the reversion of steatosis by SREBP-1c inhibitor improves hepatic insulin action in obese mice.

In the present study we observed that high-fat diet leads to reduction in whole body insulin sensitivity (k_{ITT}), elevated blood glucose levels, serum insulin, epididymal fat and serum TNF α . On the other hand, the use of ASO reverted steatosis in RD-HIS group, but no improvement systemic insulin sensitivity; demonstrated by the absence of changes in disappearance of glucose, blood glucose and serum insulin. In addition, no change was observed in body weight and epididymal fat. Thus, our data indicate that the reduction in intrahepatic lipids alone was not an effective treatment of systemic insulin resistance. More recently, Moon et al [23] have found similar data, the authors also showing that elimination of nuclear SREBPs in liver ameliorates pathologic triglycerides accumulation in different experimental models, but the authors related that the reduced hepatic fatty acid overproduction is not required for the development of systemic insulin resistance in mice, since hepatic resistance to insulin action was not recovery. Taken together, our results suggest that other alterations are necessary for improvement insulin resistance, such as reduced adiposity and inflammation, mainly.

Next, we analyzed the hepatic insulin action, through IR, IRS, Akt and Foxo1 phosphorylation, in obese mice treated with ASO SREBP-1c. Hepatic tissue of obese mice showed reduced IR, IRS1, Akt and Foxo1 phosphorylation. The treatment with ASO SREBP-1c reverses hepatic steatosis, but no altered the phosphorylation of these molecules. We suggest that the reversion of hepatic steatosis by ASO SREBP-

1c did not reverse hepatic insulin action because it does not reverse TNF α and proinflammatory molecules.

The excess fat affects the integration of metabolic and immune response pathways. Recently, several studies have demonstrated that obesity is associated with low-grade chronic inflammation that is causally involved in the development of insulin resistance [24]. The negative impact of increased fat accumulation in sensitivity to insulin can be clearly demonstrated in most subjects, as well as reduction in insulin resistance observed with weight loss. Inflammation is markedly evident in a number of human and mouse models of obesity, as determined by increased of inflammatory cytokines [24]. The cytokine TNF α was the first indication that inflammatory mediators are associated with obesity [25]. Moreover, the TNF α have been implicated in development of insulin resistance [26]. Our study showed that the use of ASO reverses steatosis, but it does not reduce adiposity and serum levels of TNF α .

One mechanism by which proinflammatory-induced cytokines by lipids induce insulin resistance is active through proinflammatory molecules, including JNK and NF κ B/IKK. Suppression of the JNK pathway in liver ameliorates insulin resistance status and glucose tolerance in both genetic and dietary models of diabetes [27]. On the other hand, studies indicate that lipid accumulation in the liver leads to hepatic inflammation through NF κ B activation and downstream cytokine production; this causes insulin resistance both in liver and systemically [11, 28, 29]. Our results show that animals submitted to high-fat diet has pronounced increase of IKK β phosphorylation and NF κ B protein levels and, after treatment with ASO, no changes were observed these parameters.

In the present study, we also examined the contribution of the toll like receptors (TRL2) upon inflammatory response. The inflammatory response in part, is mediated by toll like receptors, following by activation NFκB pathway. Studies have showed increased expression of key components of the innate immune cascade in states of obesity and diabetes mellitus type 2, in particular TLR2 and TLR4 [34, 35, 36]. In the present study was observed that TLR2 protein levels exhibited the same pattern of the other proteins involved in inflammatory pathway.

In summary, our results demonstrate that antisense oligonucleotide treatment attenuates the incidence of fatty liver, but not obesity or insulin resistance in DIO mice. The inhibition with ASO may represent a pharmacological treatment in humans after the establishment of disease, but when the objective is to reverse steatosis and also reduce hepatic insulin resistance, other drugs should be associated.

References

- 1 Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 339-350
- 2 Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discovery Today* 2007; 12: 740-747
- 3 Frederico MJ, Vitto MF Cesconetto PA, Engelmann J, De Souza DR, Luz G, Pinho RA, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT. Short-term inhibition of SREBP-1c

expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 1381-1388

4 Bugianesi E, Moscatiello, S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1941-1951

5 Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16: 117-142

6 Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 873-891

7 MacDonald PE, Joseph JW, Yau D, Diao J, Asghar Z, Dai F, Oudit GY, Patel MM, Backx PH, Wheeler MB. Impaired glucose-stimulated insulin secretion, enhanced intraperitoneal insulin tolerance, and increased beta-cell mass in mice lacking the p110gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase. *Endocrinology* 2004; 145: 4078-483

8 Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8292-8297

9 Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver

disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 74-80

10 Hotamisligil GS, Arner P; Caro JF; Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409–2415

11 Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004; 119: 285-298

12 Ragheb R, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG. Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NF κ B activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370: 134-139

13 Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 374–378

14 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254

15 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685

16 De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192-199

17 Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 2007; 194: 539–550

18 Marchesini G, Bianchi G. Nonalcoholic fatty liver disease: Disease and comorbidity effects on quality of life. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 504-506

19 Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 202–208

20 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353

21 Lam TK, Van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol* 2003; 284: 281-290

- 22 He XM, Yang QH, Li PF, Chen Z, Feng GF, Wang WJ, Liu HT, Zhang YP, Ji GY. Effect of soothing liver and invigorating spleen recipes on SREBP-1c mRNA and protein expression in hepatic tissues of rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Zhong Yao Cai* 2011; 34: 931-937
23. Moon YA, Liang G, Xie X, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Koteliansky V, Brown MS, Goldstein JL, Horton JD. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab.* 2012;15: 240-246.
- 24 Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J Biol Chem* 2004; 279:45803-45809
- 25 Hotamisligil, GS Shargill, NS Spiegelman, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91
- 26 Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 739–745
- 27 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336

28 Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198

29 Jiang S, Messina JL. Role of inhibitory κ B kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase in the development of hepatic insulin resistance in critical illness diabetes. *Am J Physiol* 2011; 301: 454-63

30 Turner JJ, Foxwell KM, Kanji R, Brenner C, Wood S, Foxwell BM, Feldmann M. Investigation of nuclear factor- κ B inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162: 487-493.

31 Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, do Nascimento CO. Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine*. 2012; 57: 98-106.

32 Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaïss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez JP, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012; 482: 179-185.

Figures

Figure 1

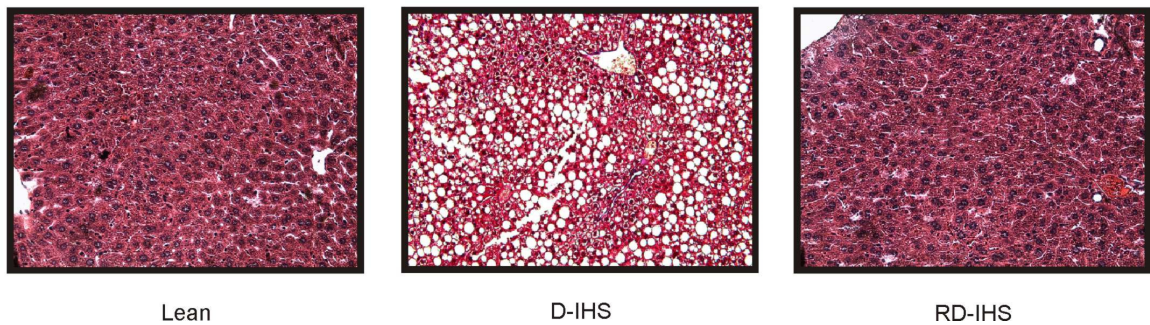


Fig. 1. *Haematoxylin/eosin staining in the liver of Lean, D-HIS and RD-HIS mice.*

Hematoxylin/Eosin staining of 5.0- μm sections of livers ($n = 4$) was performed to confirm efficiency of diet for induce hepatic steatosis (**D-IHS**) and ASO treatment to revert hepatic steatosis (**RD-IHS**).

Figure 2

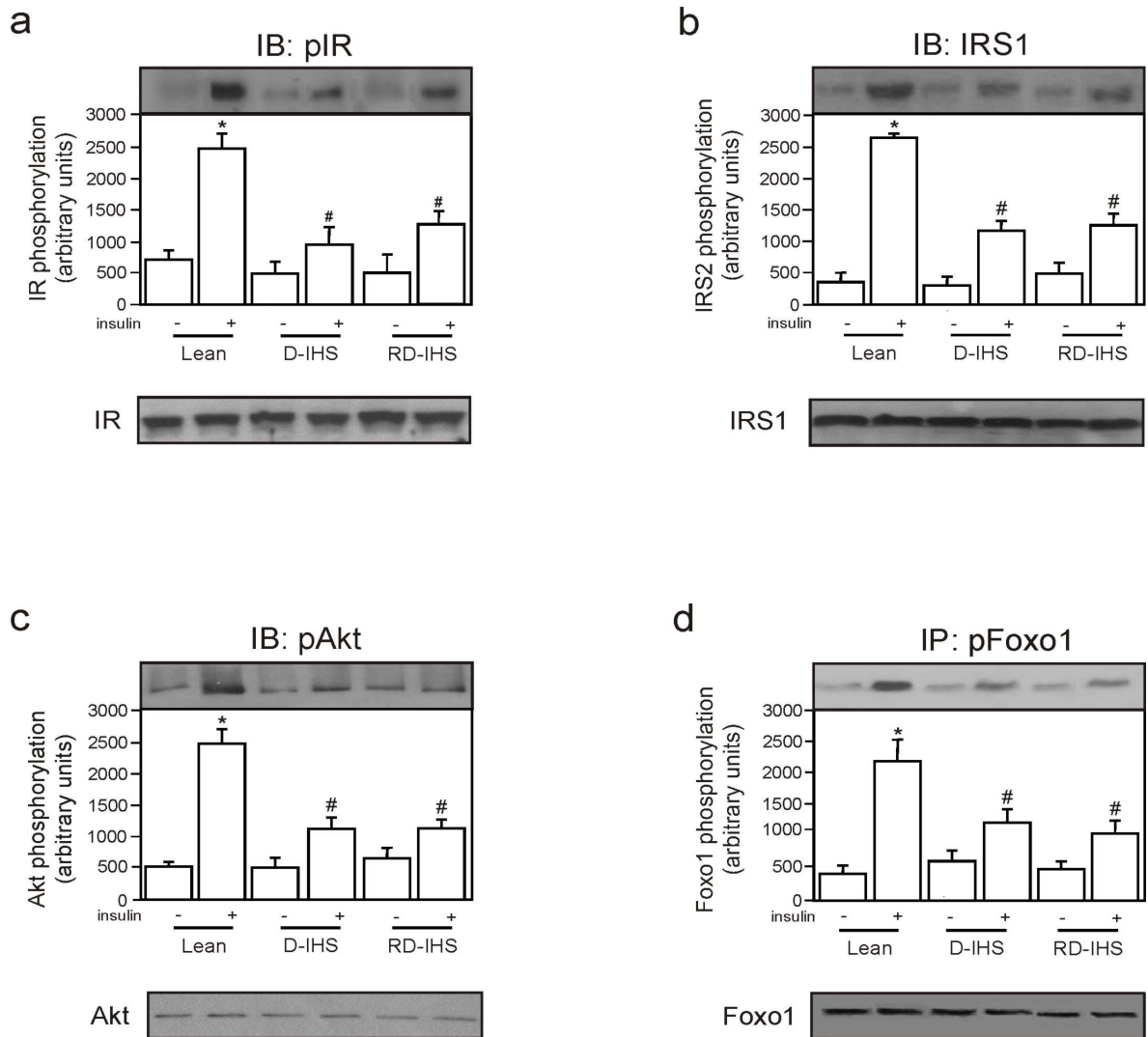


Fig. 2. Effects of reversion of steatosis on insulin signaling in the liver of obese mice.

Analysis of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR (a), IRS1 (b), phosphorylation of Akt^{Ser473} (c) and phosphorylation of Foxo1 (d). Upper panels predict representative bands of phosphorylated proteins. Bottom panels show original membrane stripped and reblotted for IR, IRS1, Akt and Foxo1 total protein levels (a, b, c and d, respectively). The results are presented as means \pm SEM of n=6, *p<0.05.

Figure 3

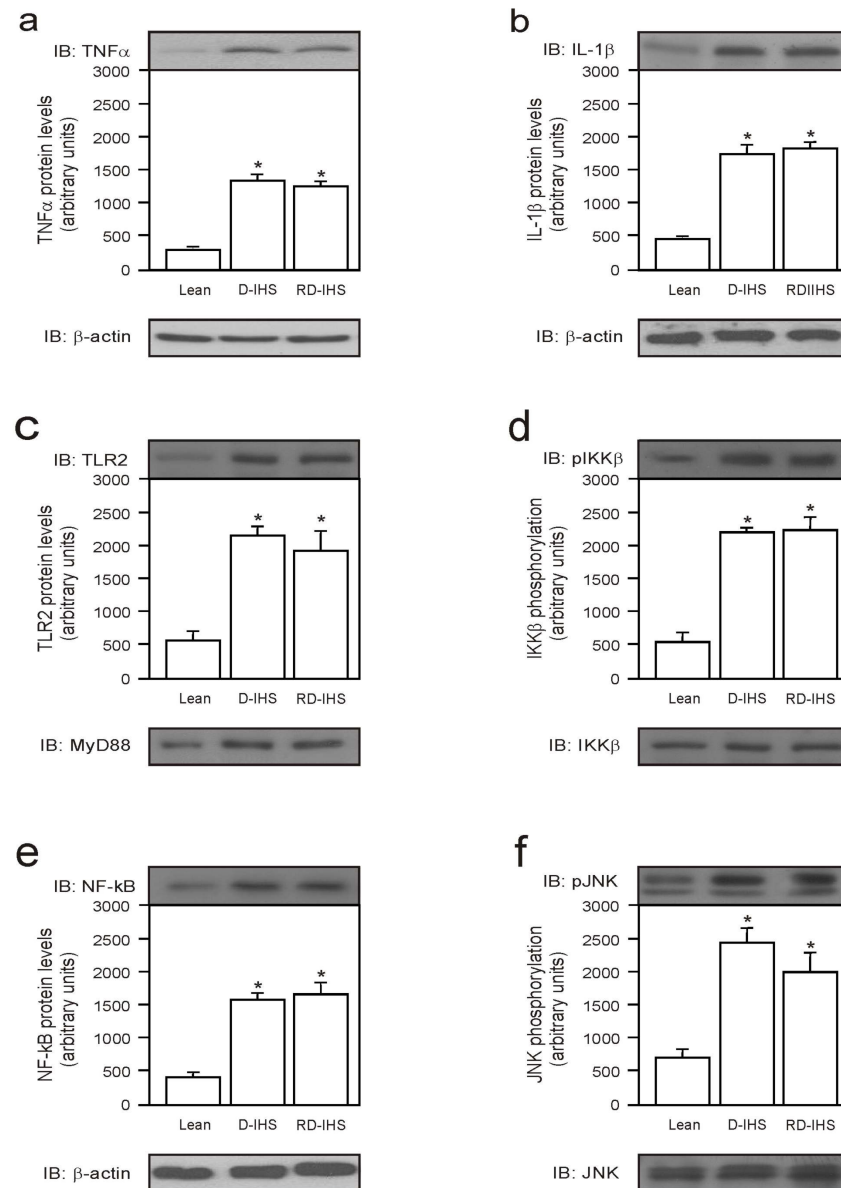


Fig. 3. Effects of reversion of steatosis on the pro-inflammatory protein levels. Analysis of phosphorylation of TNF α (a), IL-1 β (b), TLR2 (c, upper panel), IKK β (d) and NF κ B (e) protein levels and JNK phosphorylation (f). Top panels predict representative bands of phosphorylated and total proteins levels. Lower panels show original membrane stripped and reblotted for MyD88 (c), IKK β (d), JNK (f), and β -actin (a, b and e) total protein levels. The results are presented as means \pm SEM of n=6, *p<0.05.

Table

Table 1. Metabolic characteristics.

	Lean	D-IHS	RD-IHS
Body weight (g)	39.3 ± 2.0	53.4± 1.9*	51.6 ± 1.7*
Epididymal Fat (%/b.w.)	1.0±0.2	4.3±0.3*	4.1±0.5*
Insulin (ng/ml)	2.0±0.6	12.3±2.5*	11.9±3.1*
Blood Glucose (mmol/l)	5.8±0.4	11.1±0.7*	10.7±0.7*
k _{ITT} (%/min)	4.0±0.9	2.3±0.4*	2.6±0.6*
TNFα (pg/ml)	4.0±1.5	31.8±6.1*	29.7±7.2*

Symbols represent statistical significance. n = 8, *p<0.05 D-IHS and RD-IHS groups when compared with Lean mice, and #p<0.05; RD-IHS group when compared with D-IHS group.

Reversão da esteatose hepática através do oligonucleotídeo antisense SREBP-1c não melhora a ação da insulina em fígado de camundongos obesos induzidos por dieta

¹Marcelo F Vitto, ¹Gabrielle Luz, ¹Thais F Luciano, ¹Scherolin O Marques, ¹Daneila R Souza, ¹Ricardo A. de Pinho, ¹Fabio S Lira, ²Dennys E Cintra, ^{1,*}Cláudio T. De Souza

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

²Faculdade de Ciências Aplicadas – Universidade de Campinas– UNICAMP, Limeira, SP, Brasil.

Resumo

A literatura tem associado à ação da insulina com a esteatose hepática. Neste sentido, os tratamentos para reverter a esteatose e melhorar a ação da insulina tornam-se importantes. Nosso grupo demonstrou que a inibição da proteína 1c ligadora do elemento regulatório do esterol (SREBP-1c) reverte a esteatose hepática. No entanto a sinalização da insulina após a reversão da esteatose requer maior investigação. Assim, no presente estudo, nós investigamos se a reversão da esteatose hepática através do inibidor de SREBP-1c melhoraria a sinalização da insulina hepática de ratos obesos. Após a indução de obesidade por dieta e consequentemente o surgimento da resistência à insulina, camundongos Swiss foram divididos em três grupos: i) Controle, ii) D-IHS, esteatose hepática induzida por dieta (sem tratamento com ASO) e iii) RD-IHS, a reversão da esteatose hepática induzida por dieta (tratado com ASO). Os camundongos foram tratados com ASO SREBP-1c, como descrito anteriormente pelo nosso grupo. Após o tratamento de ASO, um conjunto de animais anestesiados foram usados para ensaios in vivo, e outros camundongos anestesiados foram usados para exame histológico e análise de Western blot. A reversão da esteatose hepática não alterou a glicose sanguínea, constante de decaimento da glicose (k_{ITT}), peso corporal, e os níveis de insulina sérica. Além disso, os resultados demonstraram que o protocolo não melhorou a via de sinalização da insulina, confirmado pela ausência de alterações na fosforilação de IR, IRS1, Akt e Foxo1. Em paralelo, não foram observadas alterações nas moléculas pró-inflamatórias. Assim, os resultados sugerem que a inibição da SREBP-1c reverte a esteatose, mas sem melhorar a resistência à insulina hepática, possivelmente devido não alterar as moléculas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: SREBP-1c, esteatose, resistência à insulina, inflamação.

Introdução

Doença do fígado gorduroso não alcóolica (NAFLD) é uma preocupação clínica e é considerada uma das doenças mais comum em países ocidentais [1]. O espectro da doença abrange esteatose à esteatohepatite, podendo evoluir a cirrose, que é o estágio final da doença hepática. NAFLD está extremamente associada com fatores genéticos e ambientais, como sedentarismo, uma dieta rica em gordura e obesidade. No fígado, o fator de transcrição SREBP-1c, é um fator essencial responsável pela lipogênese, regulando a produção de lipídios, induzindo a transcrição de quase todos os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e esterificação de ácidos graxos e triglicerídeos [2]. Estudos anteriores por nosso grupo demonstraram que a inibição de SREBP-1c pelo oligonucleotídeo antisense (ASO) diminui o nível de proteínas de enzimas lipogênicas, reduzindo a acumulação de gordura no fígado revertendo a esteatose hepática em camundongos.

NAFLD está associada com a resistência a insulina e hiperinsulinemia. Considerando o fato de que os pacientes NAFLD muitas vezes têm uma característica da síndrome metabólica, como resistência à insulina e diabetes [4], esta disfunção merece ser melhor investigado. O receptor de insulina (IR) é uma proteína com atividade de tirosina-quinase endógena que, a seguir à ativação por insulina, sofre autofosforilação rápida e, subsequentemente, fosforila substratos de proteínas intracelulares, incluindo o substrato do receptor da insulina (IRS), 1 e 2 [5,6]. Depois da estimulação pela insulina, IRS1 e IRS2 associado com diversas proteínas, incluindo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Abaixo da PI3K, a serina treonina-quinase, Akt, é ativada e desempenha um papel central na regulação de

diversos processos biológicos [7,8]. Existe um consenso atual que a resistência à insulina é causada por defeitos na sinalização intracelular de insulina, e diversas causas têm sido propostas para justificar como defeitos de sinalização da insulina em indivíduos com NAFLD [9]. A ingestão de dieta rica em gordura e acúmulo de lipídios hepáticos ativa as duas principais vias inflamatórias que prejudicam a ação da insulina; JNK e IKK / NF κ B. Juntos, JNK e IKK β pode servir como um inibidor de sinalização de insulina, induzindo a inibidora serina 307 (Ser307) na fosforilação de IRS1 [10]. IKK é uma cinase de serina, e a sua activação fosforila o inibidor kappaB (I κ B). Após a fosforilação, I κ B é ubiquitinado e degradado no proteossoma, liberando o fator nuclear κ B (NF κ B) para a translocação para o núcleo e ativação da expressão do gene [11]. Tem sido proposto que o aumento da ativação de NF κ B pode desempenhar um papel importante na patogênese da resistência à insulina [12].

Acúmulo de lipídios hepáticos leva à resistência à insulina. No entanto, a redução dos lipídios no fígado para resultar a melhoria da resistência à insulina hepática precisa ser mais investigada. Com base na literatura o acúmulo de lipídios hepáticos está relacionado com a resistência à insulina em NAFLD, nossa hipótese é que a inibição do SREBP-1c reverta a esteatose e melhore os percursos moleculares da insulina e assim revertendo à resistência hepática à insulina. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a reversão da esteatose hepática por ASO SREBP-1c melhora a resistência à insulina em fígado de camundongos obesos.

Materiais e Métodos

Animais e Dieta

Camundongos Swiss machos de 4 semanas de idade foram obtidos a partir de nossa colônia de reprodução (UNESC) e mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 h artificial e alojados em gaiolas individuais. O estudo seguiu as diretrizes da Universidade para o uso de animais em estudos experimentais. Após o período de aclimação (3 dias), os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, os ratos controle (magros) alimentados com ração para roedores padrão e camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura durante 2 meses (DIO). Oito semanas da alimentação da dieta rica em gorduras foi definido para que os animais desenvolvessem a obesidade [13]. Após a indução de obesidade por uma dieta rica em gordura, os animais foram divididos em dois grupos: D-IHS, esteatose hepática induzida por dieta (sem tratamento com ASO) e RD-IHS, a reversão da esteatose hepática induzida por dieta (tratados com ASO). Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com a ASO SREBP-1c (3 nmol / dia) durante 14 dias, em simultâneo com uma dieta rica em gordura, tal como descrito por Frederico e colaboradores [3]. Um conjunto de animais anestesiados foi usado para ensaios in vivo, e outros camundongos anestesiados foram usados para exame histológico e análise de Western blot.

Hormônios e Dosagens Bioquímicas

A insulina sérica e TNF α foram quantificadas por ELISA (Crystal Chem Inc., Chicago, IL). Glicose sanguínea foi medida por glicosímetro.

Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Insulina (2 U / kg de peso corporal) foi injetado via ip e amostras sanguíneas foram coletadas da cauda nos intervalos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min para a determinação de glicose sanguínea. A taxa constante para o decaimento da glicose (K_{ITT}) foi calculada utilizando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. Glicose $t_{1/2}$ foi calculado a partir da inclinação da análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose no plasma durante a fase de decaimento linear [13].

Análise de proteínas por imunoblotting

Assim que a anestesia foi assegurada pela perda de reflexos do pé e da córnea, a cavidade abdominal foi aberta. Para a análise da via da insulina, os camundongos foram abertos, e os animais receberam uma injeção de insulina (+) (100 μ l, 10^{-6} mol/L) ou de solução salina (-) (100 μ l) através da veia cava inferior. Posteriormente, os fragmentos de tecido hepático foram retirados. Para as análises pró-inflamatória não foi injetado insulina. Os tecidos foram imediatamente homogeneizados em tampão de extração a 4° C com um Polytron MR 2100 (Kinematica, Suíça), operado à velocidade máxima durante 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4° C (5804R), (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) durante 40 minutos para remover o material insolúvel, e os sobrenadantes foram usados para a quantificação de proteínas, utilizando o método de Bradford [14] e as proteínas foram desnaturadas por fervura em Laemmli [15] tampão de amostra contendo 100 mM DTT. Depois, 0,2 mg de extratos proteicos obtidos a partir de cada amostra sendo separados por SDS-PAGE, transferidos para

membranas de nitrocelulose, e aplicados anticorpos anti-IR, anti-IRS1, anti-AKT, anti-fosfo [Ser473] Akt, anti-Foxo1, anti- β -actina, anti-fosfo-JNK, anti-JNK, anti-TLR2, e anti-NF κ B e anticorpos anti-anti-IKK β MyD88 eram de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), anti-fosfo-Foxo1, anti-fosfo-IR, anti-fosfo-IKK β , anti-TNF α , anti-IL-1 β anticorpos era de tecnologia de sinalização celular (Beverly, MA, EUA). A membrana original foi estripada e re-blotada para analisar os níveis totais de proteína e β -actina. Detecção de quimioluminescência foi realizada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Autorradiografias de membranas foram levadas para a visualização de bandas proteicas. Os resultados são apresentados como manchas comparações diretas de bandas em autorradiografias e quantificada por densitometria utilizando o software Scion Image.

Histologia

Seções de 5,0 mM de fragmentos de fígado hidratados, incluídos em parafina paraformaldeído-fixos de quatro ratos foram coradas com hematoxilina / eosina e foto-documentadas usando um microscópio Olympus BX60.

Análise Estatística

Os resultados são expressos como médias \pm SEM. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando análise de uma via da variância (ANOVA). Quando o significado indicado ANOVA, teste de Bonferroni pós hoc foi realizado. Uma probabilidade inferior a 0,05 foi considerada significativa. O software utilizado para a análise dos dados foi o Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 17.0

para Windows.

Resultados

A esteatose hepática induzida por dieta foi utilizada no presente estudo, uma vez que o nosso grupo já havia utilizado esse modelo [3,16,17]. No entanto, o nosso grupo demonstrou a reversão da esteatose utilizando a técnica de ASO anti-SREBP-1c [3]. Assim no presente estudo foi utilizada ASO SREBP-1c para a reversão da esteatose.

O passo seguinte foi o de avaliar o efeito da reversão da esteatose nos parâmetros metabólicos e fisiológicos. A tabela 1 mostra os dados comparativos em relação ao peso, camundongos D-IHS e RD-IHS. Os camundongos D-IHS tiveram um aumento no peso corporal, gordura epididimal, insulina sérica, glicose sanguínea, TNF α sérico e o k_{ITT} mais baixo do que o controles. Nos camundongos RD-IHS estes parâmetros não foram alterados (Tabela 1). Os resultados dos níveis séricos de insulina, glicose no sangue e k_{ITT} (tabela 1) sugerem que a reversão deste modelo de esteatose hepática (figura 1) não é o suficiente para alterar a resistência a insulina. Não houve diferença significativa na ingestão de alimentos no grupo tratado com anti-sense SREBP-1c (dados não mostrados).

A sinalização de insulina foi examinada no fígado de camundongos D-IHS. Uma dieta de alto teor de gordura reduziu a fosforilação de IR e IRS1 (figuras 2a e 2b, respectivamente). Reversão da esteatose não resultou mudanças significativas na fosforilação dos mesmos. Além disso, os camundongos D-IHS demonstraram a redução da fosforilação Akt^{ser473}, quando comparados com os camundongos magros (fig. 2c). Resultados de igual magnitude ocorrem na fosforilação de Foxo1 (fig. 2 d).

Como o resultado da sequência do estado da resistência a insulina descrito acima (k_{ITT}), dos fígados do grupo de RD-IHS, Akt^{ser473} e fosforilação Foxo1 não se alteraram (figs. 2c, d). Não foram observadas diferenças nos (sem insulina), nos níveis basais de ambos Akt^{ser473} ou fosforilação Foxo1 entre os grupos. O IR, IRS1, Akt e os níveis de proteína Foxo1 não diferiram entre os grupos (figuras 2 a,b,c e d, painéis inferiores).

Para verificar porque a reversão do fígado não altera a resistência à insulina; nós analisamos a expressão da proteína inflamatória. A dieta rica em gordura induziu o aumento da citocina TNF α e IL-1 β , quando comparado com o grupo controle. O uso de SREBP-1c reverte a esteatose, mas não alteram os níveis de proteína destas citocinas (figs. 3 a e b, respectivamente). Toll like receptor 2 (TLR2) é um receptor fundamental ativando o sinal inflamatório de ácidos graxos saturados através de sua molécula adaptadora MyD88. Os fígados dos ratos obesos mostraram um aumento dos níveis de proteína de TLR2 e Myd88, quando comparado com o controle (fig 3c superior e painéis inferiores, respectivamente). A reversão da esteatose não altera os níveis de proteína de TLR2 e MyD88. A dieta rica em gordura aumentou tanto a fosforilação de IKK α e níveis de proteína de NF κ B, quando comparada com o controle (figura 3d e E, respectivamente). Reversão da esteatose por dieta não causa mudanças significativas na fosforilação de IKK e níveis de proteína de NF κ B, quando comparados com os camundongos D-IHS (fig 3d e E, respectivamente). Nos camundongos com dieta rica em gordura aumentou a fosforilação de JNK no fígado de camundongos D-IHS, quando comparados com ratos magros (Fig. 3f). Nos camundongos RD-IHS foram observadas mudanças significativas na fosforilação de JNK (fig. 3f).

Discussão

Resistência hepática à insulina está associada a esteatose hepática que é o maior fator envolvido na patogênese do diabetes Mellitus tipo 2 e síndrome metabólica [18,19]. Em NAFLD, a acumulação de gordura no fígado pode ocorrer como resultado da deposição de gordura, e aumentando a síntese de gordura e redução da oxidação de ácidos graxos [20]. Os avanços científicos identificam possíveis mecanismos moleculares relacionados ao aparecimento de esteatose. Nesse sentido, alguns estudos mostraram que a acumulação de gordura no fígado, está associada com níveis elevados de proteína SREBP-1c [20-22]. O nosso grupo tem demonstrado previamente que a inibição de SREBP-1c por ASO resulta na diminuição dos níveis de proteínas das enzimas lipogênicas, redução de 69% no total de gordura no fígado e, finalmente, uma reversão de esteatose hepática em camundongos obesos [3]. No entanto, a ação da insulina hepática neste modelo de reversão da esteatose não foi descrita. Com isto em mente, nós avaliamos se a reversão da esteatose pelo inibidor de SREBP-1c melhora a ação da insulina hepática em camundongos obesos.

No presente estudo observou-se que a dieta rica em gordura leva a redução da sensibilidade a insulina (k_{ITT}), níveis elevados de glicose sanguínea, a insulina sérica, gordura epididimal e TNF α sérico. Por outro lado, a utilização de ASO reverte a esteatose no grupo RD-IHS, mas não melhora a sensibilidade à insulina sistêmica; demonstrada pela ausência de alterações no k_{ITT} . Além disso, não foi observada nenhuma possibilidade na redução do peso corporal e tecido adiposo epididimal. Assim os nossos dados indicam que a redução de lipídeos intrahepáticos por si só não era um tratamento eficaz da resistência a insulina sistêmica mais recentemente,

Moon et al [23], que encontraram dados semelhantes, os autores também mostraram que a eliminação da SREBPs nucleares no fígado melhora a acumulação patológica de triglicerídeos em diferentes modelos experimentais, mas os autores relacionaram que o excesso de produção hepática reduzindo o ácido graxo não é necessário para o desenvolvimento da resistência a insulina sistêmica em camundongos, uma vez que a resistência a ação da insulina hepática não foi revertida. Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que outras alterações são necessárias para a melhora da resistência a insulina, tais como adiposidade reduzida e principalmente a inflamação.

Em seguida, analisamos a ação da insulina hepática, por meio da fosforilação de IR, IRS, Akt e Foxo1, em camundongos tratados com ASO SREBP-1c. Tecido hepático de camundongos obesos apresentou uma redução na fosforilação de IR, IRS1, Akt e Foxo1. O tratamento com ASO SREBP-1c reverte a esteatose hepática, mas não altera a fosforilação destas moléculas. Sugerimos que a reversão da esteatose hepática por ASO SREBP-1c não reverte à ação da insulina hepática por não inverter TNF α e moléculas inflamatórias.

O excesso de gordura afeta a integração das vias imunológicas e metabólicas. Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a obesidade está associada com a inflamação crônica de baixo grau que está casualmente envolvida no desenvolvimento da resistência a insulina [24]. Os efeitos negativos do aumento da acumulação de gordura na resistência a insulina pode ser claramente demonstrado na maioria dos indivíduos, bem como na redução da resistência a insulina observada com a perda de peso. Inflamação é marcadamente evidente numa série de modelos humanos e de ratos obesos, tal como determinado pelo aumento de citocinas inflamatórias [24]. A citocina TNF α foi à primeira indicação de

que os mediadores inflamatórios estão associados com a obesidade [25]. Além disso, o TNF α foi implicado no desenvolvimento da resistência à insulina [26]. O nosso estudo mostrou que o uso de ASO reverte esteatose, mas não reduz a adiposidade e os níveis séricos de TNF α .

Um mecanismo pelo qual as citocinas pró-inflamatórias induzida por lipídios pode induzir a resistência à insulina é ativação de moléculas pró-inflamatórias, incluindo JNK e NF κ B/IKK. Supressão da via JNK no fígado melhora o estado da resistência à insulina e a tolerância à glicose em ambos os modelos genéticos e dietéticos de diabetes [27]. Por outro lado, os estudos indicam que a acumulação de lipídeos no fígado leva a inflamação hepática através da ativação de NF κ B e produção de citocinas, o que faz com que torne resistente a insulina tanto no fígado e sistemicamente [11,28,29]. Nossos resultados mostram que animais submetidos à dieta rica em gordura levam a um aumento da fosforilação de IKK β e níveis de NF κ B e, após o tratamento com ASO, não foram observadas alterações nestes parâmetros.

No presente estudo, também analisamos a contribuição do toll like receptors (TLR2) na resposta inflamatória. A resposta Inflamatória em parte, é mediado por receptores do tipo toll, seguindo por via de ativação de NF κ B. Estudos mostraram aumento da expressão de componentes-chave da cascata imunológica inata em estados de obesidade e diabetes mellitus tipo 2, em particular, TLR2 e TLR4 [34,35,36]. No presente estudo observou-se que os níveis de proteína TLR2 exibiu o mesmo padrão de outras proteínas envolvidas na via inflamatória.

Em resumo, os nossos resultados demonstram que o tratamento com oligonucleótido anti-sense atenua na incidência de gordura no fígado, mas não na obesidade ou na resistência à insulina em camundongos DIO. A inibição com ASO

pode representar um tratamento farmacológico em seres humanos após o estabelecimento da doença, mas quando o objetivo consiste em reverter a esteatose e também reduzir a resistência à insulina hepática, outros fármacos devem ser associados.

Referencias

- 1 Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 339-350
- 2 Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discovery Today* 2007; 12: 740-747
- 3 Frederico MJ, Vitto MF; Cesconetto PA, Engelmann J, De Souza DR, Luz G, Pinho RA, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 1381-1388
- 4 Bugianesi E, Moscatiello, S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1941-1951
- 5 Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16: 117-142

6 Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 873-891

7 MacDonald PE, Joseph JW, Yau D, Diao J, Asghar Z, Dai F, Oudit GY, Patel MM, Backx PH, Wheeler MB. Impaired glucose-stimulated insulin secretion, enhanced intraperitoneal insulin tolerance, and increased beta-cell mass in mice lacking the p110gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase. *Endocrinology* 2004; 145: 4078-483

8 Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8292-8297

9 Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 74-80

10 Hotamisligil GS, Arner P; Caro JF; Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415

11 Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004; 119: 285-298

12 Ragheb R, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG. Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NFkappaB activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370: 134-139

13 Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 374–378

14 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254

15 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685

16 De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192-199

- 17 Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 2007; 194: 539–550
- 18 Marchesini G, Bianchi G. Nonalcoholic fatty liver disease: Disease and comorbidity effects on quality of life. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 504-506
- 19 Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 202–208
- 20 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353
- 21 Lam TK, Van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol* 2003; 284: 281-290
- 22 He XM, Yang QH, Li PF, Chen Z, Feng GF, Wang WJ, Liu HT, Zhang YP, Ji GY. Effect of soothing liver and invigorating spleen recipes on SREBP-1c mRNA and protein expression in hepatic tissues of rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Zhong Yao Cai* 2011; 34: 931-937
23. Moon YA, Liang G, Xie X, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Kotliansky V, Brown MS, Goldstein JL, Horton JD. The Scap/SREBP pathway is essential for

developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab.* 2012;15: 240-246.

24 Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J Biol Chem* 2004; 279:45803-45809

25 Hotamisligil, GS Shargill, NS Spiegelman, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91

26 Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 739–745

27 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336

28 Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198

29 Jiang S, Messina JL. Role of inhibitory κ B kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in the development of hepatic insulin resistance in critical illness diabetes. *Am J Physiol* 2011; 301: 454-63

30 Turner JJ, Foxwell KM, Kanji R, Brenner C, Wood S, Foxwell BM, Feldmann M. Investigation of nuclear factor- κ B inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162: 487-493.

31 Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, do Nascimento CO. Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine*. 2012; 57: 98-106.

32 Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez JP, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012; 482: 179-185.

Figuras

Figure 1

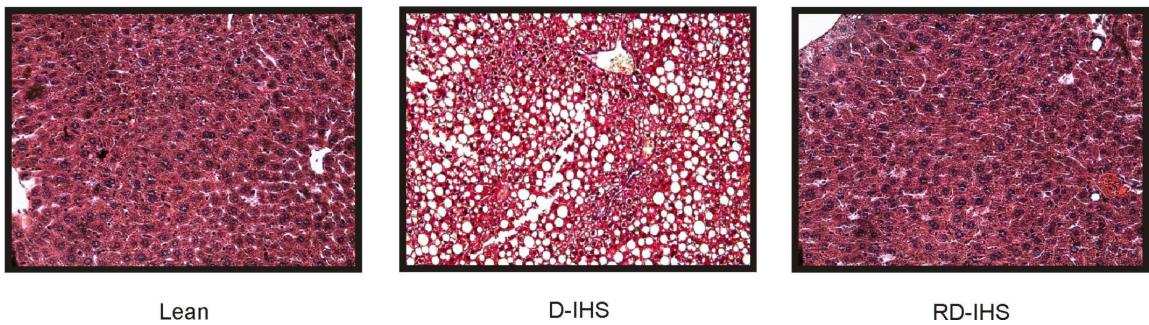


FIG. 1. *Hematoxilina / eosina no fígado de camundongos controle, D-HIS e RD HIS.* Hematoxilina / Eosina de secções de 5.0 μ M de fígados ($n = 4$) foi realizada para confirmar a eficácia da dieta para induzir a esteatose hepática (D-IHS), e ASO tratamento para reverter a esteatose hepática (RD-IHS).

Figure 2

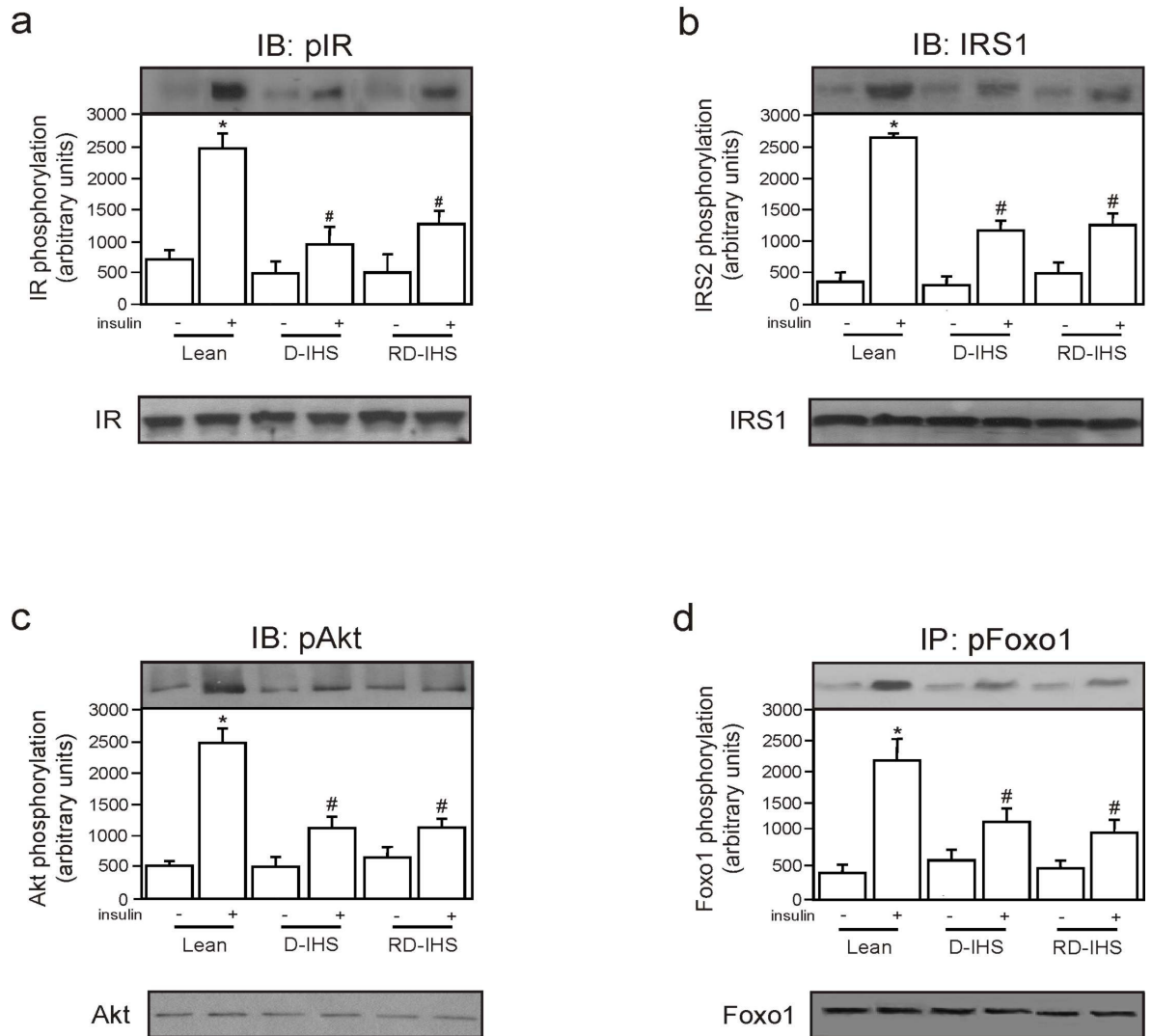


FIG. 2. Efeitos de reversão da esteatose na sinalização da insulina no fígado de camundongos obesos. Análise da fosforilação da tirosina induzida por insulina de IV (a), IRS1 (b), a fosforilação de Akt^{Ser473} (c) e fosforilação de Foxo1 (d). Os painéis superiores mostram bandas representativas da fosforilação de proteínas. Painéis inferiores mostram membrana original e re-blotada para IR, IRS1, Akt e os níveis totais de proteína Foxo1 (a, b, c e d, respectivamente). Os resultados são apresentados como médias \pm SEM de $n = 6$, * $p < 0,05$.

Figure 3

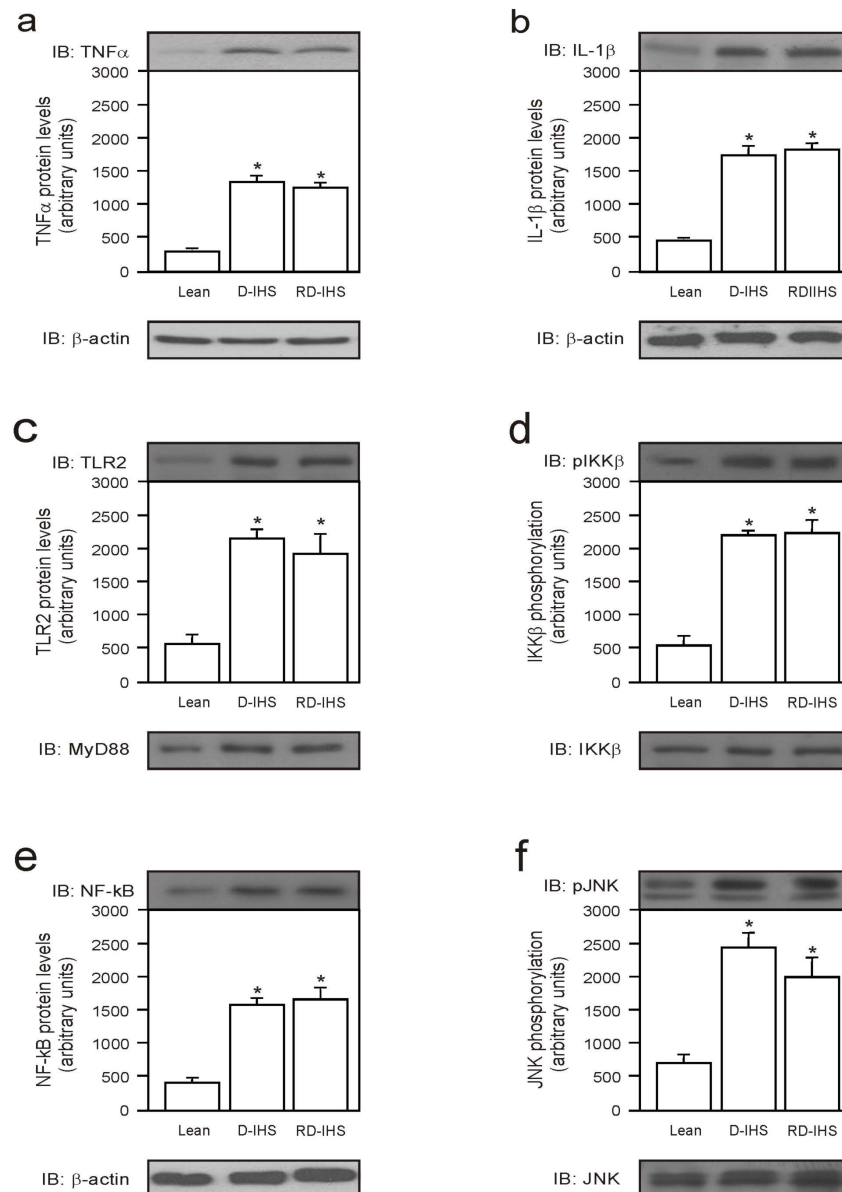


FIG. 3. *Efeitos de reversão da esteatose sobre os níveis de proteínas pró-inflamatórias.* A análise da fosforilação de TNF α (a), IL-1 β (b), o TLR2 (c, painel superior), IKK β (d) e NF κ B (e), os níveis de proteína e de fosforilação de JNK (f). Painéis superiores mostram bandas representativas dos níveis totais e fosforilação de proteínas. Os painéis inferiores mostram membrana original e re-blotada em MyD88 (c), IKK β (d), JNK (f), e β -actina (a, b e e) os níveis de proteínas totais. Os resultados são apresentados como médias \pm SEM de n = 6, * p < 0,05.

Table

Tabela 1. Metabolic characteristics.

	Lean	D-IHS	RD-IHS
Peso corporal (g)	39.3 ± 2.0	53.4± 1.9*	51.6 ± 1.7*
Gordura epididimal (%/b.w.)	1.0±0.2	4.3±0.3*	4.1±0.5*
Insulina (ng/ml)	2.0±0.6	12.3±2.5*	11.9±3.1*
Glicose Sanguínea (mmol/l)	5.8±0.4	11.1±0.7*	10.7±0.7*
k _{ITT} (%/min)	4.0±0.9	2.3±0.4*	2.6±0.6*
TNFα (pg/ml)	4.0±1.5	31.8±6.1*	29.7±7.2*

Símbolos representam significância estatística. n = 8, * p <0,05 D-IHS para os grupos RD-IHS, quando comparados com os ratos magros e # p <0,05; grupo RD-IHS, quando comparado com o grupo D-IHS.

**PROJETO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ELABORADO ANTERIORMENTE OU NA DISCIPLINA DE TCC I**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE-UNESC
CURSO DE FARMÁCIA**

MARCELO FONTANA VITTO

**REVERSÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA POR INIBIÇÃO DE SREBP-1C NÃO
MELHORA A SENSIBILIDADE DA INSULINA EM RATOS OBESOS INDUZIDOS A
DIETA**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2012.

MARCELO FONTANA VITTO

**REVERSÃO DA ESTEATOSE HEPÁTICA POR INIBIÇÃO DE SREBP-1C NÃO
MELHORA A SENSIBILIDADE DA INSULINA EM RATOS OBESOS INDUZIDOS A
DIETA**

Projeto de trabalho de conclusão de curso,
apresentado para a disciplina de TCC I, da 8ª
fase do curso de Farmácia da Universidade do
Extremo Sul Catarinense - UNESC.
Orientador: Profº Dr. Cláudio T. de Souza

CRICIÚMA, JUNHO DE 2012

INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos problemas de Saúde pública no mundo (Mokadad,2001). O sobrepeso e a obesidade estão tornando-se cada vez mais prevalentes em todo mundo principalmente em países desenvolvidos, mas esses índices também estão associados com países em desenvolvimento (Vantalie, 1994). Esta doença decorre através de diversos fatores, dentre eles por uma mudança no padrão alimentar, falta de atividade física e fatores genéticos. As pessoas estão se alimentando através de uma ingesta rica em gordura, principalmente de comidas rápidas como fast foods (Bauer et al; 2012) e associado a uma falta de atividade física (Rodriguez, 2012) mais fatores genéticos são fatores essenciais para o aumento da prevalência da doença (Finelli & Tarantino, 2012). A obesidade está associada a várias patologias, como diabetes tipo II e a doença do fígado gorduroso não-alcóolica, uma das doenças que mais acometem pessoas em países ocidentais (Clark, 2006; Marchesini & Babini).

Como relatado acima a doença do fígado gorduroso está extremamente relacionada à obesidade (Saito et al, 2007) , na literatura ela é designada como doença do fígado gorduroso não-alcóolica (*NAFLD* do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*). Há ainda uma falta de informações sobre a incidência da doença, mas segundo alguns estudos a doença está aumentando cada vez mais. *NAFLD* afeta mais de 23% de pacientes nos Estados Unidos, dos quais 75% são obesos e possuem diabetes. Diabetes, idade e obesidade sendo considerado um quadro síndrome metabólica são fatores que podem contribuir com a prevalência de *NAFLD* (Janus, 2007). O espectro de *NAFLD* pode variar de um simples fígado gorduroso (esteatose hepática), com prognóstico benigno, para a forma potencialmente

progressiva, a esteatohepatite não-alcóolica (NASH do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*), a qual pode levar a uma fibrose hepática e cirrose, resultando em um aumento da morbidade e mortalidade. Day & James (1998) propuseram um modelo que envolve duas fases na progressão desta patologia. A primeira fase é o desenvolvimento da esteatose hepática: acúmulo de triglicérides nos hepatócitos. Na segunda fase ocorre a transição de NAFLD para NASH como resultado das ações de moléculas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. No entanto, a inflamação em si é o principal fator na transição de NAFLD para NASH (Jansen, 2004).

Se tratando de deposição de gordura no fígado, ainda não se sabe qual é o principal mecanismo que ocorre essa deposição (Janus, 2007), mas alguns estudos têm sido desenvolvidos para determinar a contribuição da lipogênese na progressão da esteatose hepática. A lipogênese é a síntese de ácidos graxos no organismo a partir da acetil CoA). As principais reações de síntese de ácidos graxos envolvem a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido-graxo sintase (FAS) que ocorrem no citoplasma. Onde ocorre as seguintes reações: acetil CoA carboxilase (ACC), converte a acetil CoA em malonil CoA e a ácido graxo sintetase (FAS), converte a malonil CoA em palmitato (Girard et al., 1997). Donnelly e colaboradores (2005) estimaram a contribuição da síntese do conteúdo de gorduras hepáticas em pacientes com NAFLD.

Um mecanismo que está extremamente relacionado com a lipogênese é fator de transcrição chamado SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol) ele leva a um aumento do RNA mensageiro para importantes enzimas lipogênicas tais como a esteril-Coa desaturase (SCD1), enzima málica acetil-CoA carboxilase (ACC), e ácido graxo sintetase (FAZ) (Ji, 2006). Em camundongos transgênicos a superexpressão de SREBP-1c no fígado de leva a um aumento

marcante da lipogênese e o aumento de deposição de gordura no fígado (Shimomura et al., 1999). A ativação da ACC resulta síntese de ácidos gordos e de diminuição da oxidação de ácidos gordos (Harnwood, 2004). Outra importante enzima é a SCD-1 (Sampath et al., 2007). Esta é uma enzima chave envolvida na síntese de ácidos graxos monoinsaturados e catalisa a inserção de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 na cadeia de ácidos graxos longos saturados (Ntambi & Miyazaki, 2004).

Como descrito anteriormente outra doença relacionada é a diabetes mellitus tipo 2 onde o fator chave é a resistência a insulina (Alisi, 2009). A resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina resultam em uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células, especialmente nas musculares e gordurosas e na produção de glicose pelo fígado. Dessa forma, a hiperglicemia resultante está relacionada à diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos e a um aumento na produção hepática de glicose. Em indivíduos com função da célula beta normal, aumentos na demanda de insulina devido à resistência periférica ao hormônio são compensados por um aumento coordenado na secreção de insulina, mantendo assim os níveis de glicose plasmática dentro da normalidade. Em indivíduos geneticamente predispostos ao diabetes mellitus tipo 2, a falha da célula beta em compensar o aumento na demanda, resulta em progressiva elevação dos níveis de glicose e determina o início do quadro clínico da doença (Donath & Halban, 2004).

Para o melhor entendimento da resistência à insulina faz-se importante o conhecimento da ação da insulina desde sua ativação molecular até seus efeitos fisiológicos finais. A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico secretado pelas células beta do pâncreas, cuja síntese é ativada primariamente pelo aumento dos

níveis circulantes de glicose e modulada também por aminoácidos, ácidos graxos e estímulos neurais. Uma vez liberada na corrente sanguínea, este hormônio age em diferentes tecidos periférico, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da proteólise e da lipólise, entre outros (Saltiel & Kahn, 2001).

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR) (Kasuga, 1982; Saltiel & Kahn, 2001). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2) (White, 1998). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outra proteína citosólica denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3K), promovendo sua ativação. A PI 3K é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina (Saad et al., 1993; Shepherd et al., 1995). A PI 3K foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3K ativa o sítio catalítico associado (Myers et al., 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol -3 fosfato, fosfatidilinositol - 3,4 difosfato e fosfatidilinositol -3,4,5 trifosfato. A ativação da PI 3K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt).

A proteína quinase B, ou Akt, é uma serina treonina quinase que possui três isoformas (Akt1, Akt2 e Akt3) todas expressas em tecido muscular e hepático (Datta et al., 1999). A proteína Akt tem a habilidade de fosforilar e ativar vários alvos metabólicos. A Akt estimula captação de glicose, síntese de glicogênio e de proteínas (Ogg et al., 1997).

Vários autores têm observado grande associação entre resistência à insulina e a elevada deposição de gordura em tecido hepático (Saloranta et al., 1993; Rebrin et al., 1995; Lam et al., 2003; Samuel et al., 2004). Há muita probabilidade de gordura no fígado levarem a resistência à insulina (Samuel et al., 2004). Isso por alguns mecanismos que envolvem a competição por substrato, antagonismo da sinalização da insulina ou lipotoxicidade (Schmitz-Peiffer, 2000; Cho et al., 2006; Guo, 2008; Lionetti et al., 2009; Riant et al., 2009;).

A insulina também estimula genes lipogênicos chaves, incluindo aqueles que codificam ACC e a FAS (Shimomura et al., 2000). SREBP-1c e insulina reduzem a oxidação de ácidos graxos e aumentam a síntese de ácidos graxos contribuindo para a acumulação de gordura no fígado em indivíduos resistentes a insulina. A própria glicose, por ser convertida a acetil-CoA através da via glicolítica, estimula a lipogênese pelo fato de ser um importante substrato para o processo. Além disso, a glicose plasmática estimula a lipogênese por agir no processo de liberação de insulina (Pessiam, 2000). Uma ação clássica da insulina é estimular a síntese de ácido graxo no fígado em períodos de excesso de carboidratos e várias evidências sugerem que esses efeitos da insulina são mediados pelo aumento do SREBP-1c. *In vivo* (Shimoura, 1999). Portanto os níveis aumentados de insulina presentes na resistência à insulina exacerbam a ativação de SREBP-1c resultando no aumento da lipogênese. No jejum, quando os níveis de insulina são baixos, a expressão dos

genes lipogênicos está diminuída assim como de SREBP-1c. A superexpressão hepática de SREBP-1c em camundongos reverte os efeitos do jejum sobre a expressão gênica desta molécula e das enzimas lipogênicas controladas por SREBP-1c (Horton et al., 1998), sugerindo que SREBP-1c é um regulador chave da resposta rápida do fígado à insulina.

Vários pacientes obesos e resistentes à insulina apresentam esteatose hepática. Estudos indicam que a esteatose hepática da resistência à insulina é causada pelo acúmulo de SREBP-1c, que está elevada em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. Apesar da presença de resistência à insulina nos tecidos periféricos, a insulina continua a estimular a transcrição do SREBP-1c no fígado desses camundongos aumentando a expressão de genes lipogênicos, com isso o aumento depósito de gordura no fígado (Shimoura, 1999).

Isso sugere que SREBP-1c é muito sensível para as ações da insulina, mesmo sob condições de reduzida sensibilidade à insulina em todo organismo. Isto é, em parte, explicado pelo fato de que efeitos da insulina sobre a produção de glicose são mediados via IRS2, que está menos ativo em animais insulino-resistentes, enquanto que os efeitos da insulina sobre o metabolismo lipídico são amplamente regulados via IRS1 (Taniguchi et al., 2005). Shimomura e colaboradores (2000) mostraram que, apesar da deficiência de IRS2 devido à crônica hiperinsulinemia em camundongos *ob/ob*, a insulina estimulou a transcrição de SREBP-1c. Alternativamente a clivagem de SREBP-1c poderia ser secundária a outra via de sinalização. Estudos têm invocado a ativação do estresse de retículo endoplasmático (Schroder & Kaufman, 2005; Flowers et al., 2008).

Como a doença do fígado gorduroso vêm aumentando a prevalência em vários países isso associado é fortemente relacionado a resistência a insulina.

Vários estudos sugerem que lipídeos hepáticos podem ser o principal causador da resistência à insulina. E ainda não há um tratamento farmacológico específico para essa reversão da esteatose, por isso pesquisas tentam buscar qual é o mecanismo alvo para a intervenção terapêutica.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente projeto visará a estudar se a inibição *in vivo* da proteína SREBP-1c reverte à resistência à ação da insulina em fígado de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os resultados obtidos a partir deste estudo direcionam para um potencial alvo terapêutico na reversão da esteatose hepática não alcoólica.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar os efeitos da inibição da expressão de SREBP-1c sobre a via molecular de ação da insulina;
- Avaliar a gordura do fígado através de parâmetros histológicos da inibição da expressão de SREBP-1c;
- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a expressão da SREBP-1c;
- Avaliar os efeitos da inibição da expressão de SREBP-1c sobre os parâmetros glicêmicos e lipídicos no tratamento da esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica;

METODOLOGIA

Animais

Serão utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss, com 4 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESC. Após o recebimento, os camundongos serão divididos em dois grupos: Controle (camundongos Swiss que serão alimentados com ração comercial para roedores da Nuvital) e (camundongos Swiss que serão alimentados com dieta hiperlipídica, a qual será oferecida ad libitum). Estudo prévio de De Souza e colaboradores (2005) utilizando a mesma linhagem de camundongos comprovou a eficiência desta dieta em induzir esteatose hepática após 2 meses de alimentação. Os animais serão mantidos em ciclo de luz controlado de 12hs. Todos os experimentos animais serão realizados em conformidade com as recomendações do comitê de ética da UNESC.

Oligonucleotídeos (antisense):

O oligonucleotídeo antisense portando modificação fosforotioato da SREBP-1c (antisense, 5' GTT CCA GAG CCG CCT CAC CG 3') serão produzidos pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Através de imunoblot será avaliado a habilidade do oligonucleotídeo antisense em bloquear a expressão da proteína SREBP-1c no fígado. A seqüência selecionada será analisada pelo programa BLAST – NCBI. Para este estudo o oligonucleotídeo será utilizado por 16 dias, com aplicação intraperitoneal (IP) diária, determinada em nmol de oligonucleotídeo diluído em veículo.

Avaliação da efetividade do composto (curva dose-resposta):

Estudos anteriores do nosso grupo determinou uma dose do oligonucleotídeo específico; foi realizada a determinação da dose a ser utilizada para avaliar a

efetividade do composto. Foi utilizado camundongos magros com 8 semanas de idade. Os animais receberam diferentes doses do composto (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol/dia), via IP e após três dias de aplicação foram sacrificados e diferentes tecidos analisados para verificação da inibição tecido-específica (tecido hepático, muscular e adiposo) (De Souza et al., 2005). Esse composto tem grande estabilidade e assim uma única dose diária é suficiente para inibição (De Souza et al., 2005), a dose mais eficaz foi a de 3 nmol/dia por 14 dias (Frederico, 2012).

Protocolo experimental

Após dois meses de alimentação com dieta hiperlipídica (instalação da esteatose hepática), os animais serão subdivididos em três grupos: camundongos Swiss alimentados com dieta padrão (Magros); camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica (obesos); camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica que serão submetidos ao tratamento com oligonucleotídeo antisense SREBP1c (obesos + ASO).

Determinação da massa corporal

A massa corporal será determinada através de balança de precisão, imediatamente antes do sacrifício.

Extração do tecido hepático

Os camundongos serão anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano serão usados como controle da anestesia. Amostras do fígado serão retiradas, homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto

de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado será então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante será determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (41) e posteriormente será realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoblot com anticorpo específico.

O teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Insulina (2 U de peso corporal / kg) foi injectada via ip e amostras de sangue foram colhidas a partir da cauda aos 0, 5, 10, 15, 20, 25, e 30 min para a determinação de glicose no sangue. A constante de velocidade para a glicose desaparecimento (k ITT) foi calculada usando a fórmula $0,693 / t^{1/2}$. T glicose meia foi calculado a partir da inclinação do mínimos quadrados. A análise das concentrações de glicose no plasma, durante o linearfase de decadência.

Histologia com coloração Hematoxilina - Eosina

Fragmentos do tecido hepático serão coletados e colocados em frasco contendo paraformaldeído à 4% por 12 horas. O órgão será então processado com álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100 %), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o tecido será incluído em blocos de parafina, onde será seccionado em cortes de 5 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas serão desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool. Em seguida será realizada a coloração com hematoxilina e eosina. A análise será realizada através de microscopia óptica (Olympos BX 60).

Western blotting

Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra serão aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. A eletroforese será realizada em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE será submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, serão transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 1,5 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas serão incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas serão lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpos específicos, sob agitação constante durante uma noite a 4°C. Serão então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ¹²⁵I, durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A será lavado com solução basal e então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 5 dias, os filmes serão revelados na forma convencional. A intensidade das bandas será determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

Análise estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação de dois grupos, será utilizado teste t de Student para dados não pareados, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para comparação de mais que 2 grupos de valores, será utilizado análise de variância (ANOVA), seguida de teste para comparação múltipla de médias, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

RONOGRAMA

Tabela 1: Atividades realizadas no ano de 2012.

ATIVIDADES	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Revisão Bibliográfica	x	X	x	x	
Indução da obesidade (dieta hiperlipídica)	x	X			
Tratamento com oligonucleotídeo antisense em ratos obesos		X			
Determinação da massa corporal			x		
Extração do tecido hepático			x		
Determinação do triglicerídeo sérico			x		
O teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)			x		
Histologia			x		
Análise das amostras (Westernblotting)				x	
Análise estatísticas				x	
Interpretação dos resultados				x	
Elaboração do TCC				x	x
Apresentação do TCC					x

ORÇAMENTO

Tabela 2: Gastos na execução do projeto.

Discriminação	Quantidade	Valor Unitário R\$	Valor Total R\$
Anticorpos :SREBP-1 ,IR, IRS1, AKT, pIR, pIRS1, pAKT,	7	1.200,00	8.400,00
Albumina (100g)	1 frasco	700,00	700,00
Membrana de nitrocelulose	1 rolo	1.200,00	1.200,00
Histologia		500,00	500,00
Compra da dieta hiperlipidica	50	60,00	3.000,00
Insulina	1	40,00	40,00
Tira de Glicose	2	110,00	220,00
TOTAL			14.060,00

REFERÊNCIA

ALISI A; MANCO M; PANERA N; NOBILI V. Association between type two diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in youth. **Ann Hepatol.** 8 (suppl1) S44-50. 2009.

BAUER KW; HEARST MO; EARNEST AA; FRENCH AS; OAKES JM; HARNACK LJ. Energy content of u.a. Fast-Food restaurant offerings: 14 years trends. **Am J Prev Med** 43(5) 490-7. 2012.

CHO CY; KOO SH; WANG Y; CALLAWAY S; HEDRICK S; MAK PA; ORTH AP; PETERS EC; SAEZ E; MONTMINY M; SCHULTZ PG; CHANDA SK. Identification of the tyrosine phosphatase PTP-MEG2 as an antagonist of hepatic insulin signaling. **Cell Metabolism** 367-378. 2006.

CLARK JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **Journal of Clinical Gastroenterology.** 40, Suppl. 1, S5–S10. 2006.

DATTA SR; BRUNET A; GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Development.** 13: 2905-2927. 1999.

DAY CP; JAMES OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology** 114: 842-845. 1998.

DE SOUZA CT; ARAÚJO EP; PRADA PO; SAAD MJA; BOSCHERO AC; VELLOSO LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. **Diabetologia**. 48: 1860–1871. 2005.

DONATH MY; HALBAN PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, 47 (3): 581-9, 2004.

DONNELLY KL; SMITH CI; SCHWARZENBERG SJ; JESSURUN J; BOLDT MD; PARKS EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**. 115: 1343- 1351. 2005.

FINELLI C; TARANTINO G. Is there any consensus as to what diet or lifestyle approach is the right one for NAFLD patients? **J Gastrointestin Liver Dis** 21(3):293-302. 2012.

FLOWERS MT; KELLER MP; CHOI Y; LAN H; KENDZIORSKI C; NTAMBI JM; ATTIE AD. Liver gene expression analysis reveals endoplasmic reticulum stress and metabolic dysfunction in SCD1-deficient mice fed a very low-fat diet. **Physiological Genomics**. 13: 361-72. 2008.

FREDERICO MJ; VITTO MF; CESCO NETTO PA; ENGELMANN J; DE SOUZA DR; LUZ G; PINHO RA; ROPELLE ER; CINTRA DE; DE SOUZA CT. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver

disease in mice. **Scand J Gastroenterol.** 2011 Nov;46(11):1381-8. Epub 2011 Sep 22.

GIRARD J; FOUFELLE F; FERRÉ P. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. **Annual Review of Nutrition** 17: 325. 1997.

GUO Z. Intramyocellular lipids: maker vs. marker of insulin resistance. **Medical Hypotheses.** 70(3):625-9. 2008.

HARWOOD HJ. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. **Curr Opin Investg Drugs** 5(3):283-9. 2004.

HORTON JD; BASHMAKOV Y; SHIMOMURA I; SHIMANO H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 95: 5987-5992. 1998.

JANSEN PLM. Nonalcoholic steatohepatitis. **The Netherlands Journal of Medicine.** 62: 217-224. 2004.

JI C; CHAN C; KAPLOWITZ N. Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. **J Hepatol.** 45:717-724. 2006.

KASUGA M; ZICK Y; BLITH DL; KARLSSON FA; HÄRING HU; KAHN CR. Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. **The Journal of Biology Chemistry**. 17: 9891-9894. 1982.

LAM TK; VAN DE WERVE G; GIACCA A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. 284: E281–329. 2003.

LIONETTI L; MOLLICA MP; LOMBARDI A; CAVALIERE G; GIFUNI G; BARLETTA A. From chronic overnutrition to insulin resistance: The role of fat-storing capacity and inflammation. **Nutrition Metabolism Cardiovascular Diseases**. 2009.

MARCHESINI G; BABINI M. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Minerva Cardioangiologica**. 54: 229 –239. 2006.

MYERS MG JR; BACKER JM; SUN XJ; SHOELSON S; HU P; SCHLESSINGER J; YOAKIM M; SCHAFFHAUSEN B; WHITE MF. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 21: 10350-10354. 1992.

NTAMBI JM; MIYAZAKI M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research** 2: 91-104. 2004.

ONG JP; YOUNOSSI ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. **Clin Liver Dis.** 11(1): 1-16. 2007.

OGG S; PARADIS S; GOTTLIEB S; PATTERSON GI; LEE L; TISSENBAUM HA; RUVKUN G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature.** 6654:994-6659. 1997.

PESSIN JE; SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest** 106:165-9. 2000

REBRIN K; STEIL GM; GETTY L; BERGMAN RN. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. **Diabetes.** 44: 1038–1045. 1995.

RIANT E; WAGET A; COGO H; ARNAL JF; BURCELIN R; GOURDY P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology.** 2009

RODRIGUEZ B; TORRES DM; HARRISON SA. Physical activity: an essential component of lifestyle modification in NAFLD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 23. 2012.

SAAD MJ; FOLLI F; KAHN JA; KAHN CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **The Journal of Clinical Investigation.** 4: 2065-2072. 1993.

SAITO T; MISAWA K; KAWATA S. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis.

Intem Med. 46(2):101-3. 2007

SALORANTA C; KOIVISTO V; WIDEN E; FALHOLT K; DEFRONZO RA; HARKONEN M; GROOP L. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. **The American Journal of Physiology.** 264: E599–605. 1993.

SAMPATH H; MIYAZAKI M; DOBRZYN A; NTAMBI JM. Stearoyl-CoA Desaturase-1 Mediates the Pro-lipogenic Effects of Dietary Saturated Fat. **The Journal of Biology Chemistry.** 4: 2483–2493. 2007.

SAMUEL VT; LIU ZX; QU X; ELDER BD; BILZ S; BEFROY D; ROMANELLI AJ; SHULMAN GI. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **The Journal of Biology Chemistry.** 31: 32345–32353. 2004.

SCHMITZ-PEIFFER C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. **Cell Signal** 12: 583–594. 2000.

SCHRODER M; KAUFMAN RJ. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochemistry** 74: 739–789. 2005.

SHEPHERD PR; NAVÉ BT; SIDDLE K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **The Biochemical Journal.** 305: 25-8. 1995.

SHIMOMURA I; BASHMAKOV Y; HORTON JD. Increased levels of nuclear srebp-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **The Journal of Biology Chemistry**. 274: 30028-30032. 1999.

SHIMOMURA I; MATSUDA M; HAMMER RE; BASHMAKOV Y; BROWN MS; GOLDSTEIN JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular Cell**. 6: 77–86. 2000.

TANIGUCHI CM; UEKI K; KAHN CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**. 113: 718-727. 2005.

VANLTALLIE TB. Worldwide epidemiology of obesity. **Pharmacoeconomics**. 5 (Suppl 1): 1-7. 1994

WHITE MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 182 1-2:3-11, 1998

NORMAS DE ENVIO DE ARTIGOS DA REVISTA SELECIONADA