



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Flávia Maria da Silva Veiga

**Implicações e efeitos da utilização do inibidor da DPP-4 e ativação do ppar-
alfa, isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático de
camundongos alimentados com dieta rica em frutose ou lipídeos**

Rio de Janeiro

2022

Flávia Maria da Silva Veiga

Implicações e efeitos da utilização do inibidor da DPP-4 e ativação do ppar-alfa, isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático de camundongos alimentados com dieta rica em frutose ou lipídeos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V426 Veiga, Flávia Maria da Silva.
 Implicações e efeitos da utilização do inibidor da DPP-4 e ativação do ppar-alfa, isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático de camundongos alimentados com dieta rica em frutose ou lipídeos / Flávia Maria da Silva Veiga. – 2022.
 127 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Inibidores da dipeptidil peptidase IV. 2. PPAR alfa - Teses. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Frutose – Efeitos adversos. I. Mello, Vanessa de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 577.25:616.399

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávia Maria da Silva Veiga

Implicações e efeitos da utilização do inibidor da DPP-4 e ativação do ppar-alfa, isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático de camundongos alimentados com dieta rica em frutose ou lipídeos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de julho de 2022.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Erica Patrícia Garcia de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo amor e carinho em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, pelo apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me sustentado nos momentos difíceis da minha caminhada.

À minha mãe, Jacinéa, por ser a minha base e me apoiar sempre com muito amor, paciência e carinho. Obrigada por cuidar de mim, sem você eu nada seria.

Ao meu marido André Senra pelo apoio, compreensão e companheirismo. Obrigada por acreditar em mim e me acompanhar com amor e carinho nessa fase da minha vida. Obrigada por me escutar e me aconselhar.

A todos familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, seja pelo incentivo, acolhimento e motivação durante minha trajetória o que contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e científico.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa de Souza-Mello, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me acolher, mostrar caminhos, e me orientar ao longo dos seis anos da minha vida científica. Você é uma referência intelectual e pessoal, sou muito grata por tê-la como orientadora!

Ao professor Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda pela oportunidade e confiança por abrir as portas do laboratório a mim. Obrigada à Tamiris Rachid, por me auxiliar inúmeras vezes com carinho e atenção, pelas dúvidas tiradas e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de laboratório, pelos ensinamentos e pela ajuda, nada seria possível sem o auxílio que me deram ao longo dessa árdua jornada. Em especial aos Vanessetes pregressos e atuais (como chamamos carinhosamente aos orientados da Prof^a Vanessa). Obrigada as vanessetes Aline e Daiana pelo carinho. A vanessete Caroline Miranda, minha dupla de biotério, bancada e trocas ideias. Obrigada por compartilhar tanto comigo, pelos conselhos e pela sua amizade. Sou muito grata de ter tido a oportunidade de partilhar minha vida científica com vocês. Obrigada a Pós-Doutoranda Fabiane Martins, por contribuir e compartilhar seus conhecimentos e pela atenção.

A todos os professores do programa de pós-graduação BHEX pelas disciplinas ministradas e pelos ensinamentos repassados. À CAPES, e as agências de fomento pelo suporte financeiro deste trabalho e pela bolsa concedida.

Crê em ti mesmo.
Age e verá os resultados.
Quando te esforças, a vida também
se esforça para te ajudar.

Chico Xavier

RESUMO

VEIGA, Flávia Maria da Silva. *Implicações e efeitos da utilização do inibidor da DPP-4 e ativação do PPAR-alfa, isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático de camundongos alimentados com dieta rica em frutose ou lipídeos*. 127f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A dieta hiperlipídica ou rica em frutose configuram um dos principais catalisadores para a gênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) intensificada pelas alterações do eixo entero-hepático. Este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da ativação do inibidor da DPP-4 e da ativação do PPAR-alfa (WY14643), isolados ou em associação, sobre o eixo entero-hepático, inflamação e metabolismo energético hepático de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (3 meses de idade) que receberam dieta controle (C, 10% da energia proveniente de lipídeos, n=20), dieta hiperlipídica (HF, 50% da energia proveniente de lipídeos, n=40) ou dieta rica em frutose (HFRU, 50% da energia proveniente da frutose, n=40) durante 12 semanas. Após as 12 semanas, os grupos HF e HFRU foram subdivididos para receber o tratamento durante 5 semanas (n=10 por grupo): HF, HFA (agonista PPAR- α , 3,5 mg/kg/MC incorporado à dieta HF), HFT (Linagliptina–Trayenta–15mg/kg incorporada à dieta HF) e HFC (agonista PPAR- α associado com Linagliptina incorporados nas mesmas doses à dieta HF); HFRU, HFRUA (agonista PPAR- α , 3,5 mg/kg/MC incorporado à dieta HFRU), HFRUT (Linagliptina 15mg/kg incorporado à dieta HFRU) e HFRUC (agonista PPAR- α associado com Linagliptina nas mesmas doses incorporados à dieta HFRU). Foram realizadas análises bioquímicas, RT-qPCR, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão no fígado e intestino. O grupo HFRU apresentou intolerância à glicose, endotoxemia e disbiose (com aumento de *Proteobacteria*) sem alterações na massa corporal (MC), mas com danos na ultraestrutura intestinal, o que levou à inflamação e esteatose hepática acentuada no grupo HFRU comparado ao grupo C. Os tratamentos contornaram a intolerância à glicose, a endotoxemia e a disbiose, melhorando a ultraestrutura da barreira intestinal e reduzindo a expressão de *Tlr4* no fígado dos animais tratados. Esses efeitos benéficos suprimiram a lipogênese e atenuaram a esteatose. Já a dieta HF foi obesogênica em comparação com a dieta C. Todos os tratamentos provocaram perda de MC, e o grupo HFC mostrou MC semelhante ao grupo C. Todos os tratamentos minimizaram a intolerância oral à glicose e aumentaram os níveis de GLP1. Esses benefícios metabólicos restauraram a relação *Bacteroidetes/Firmicutes*, resultando em aumento de células caliciformes por área do intestino grosso e níveis reduzidos de LPS nos grupos tratados, os quais também mostraram maior expressão de *Mucina 2*, *Ocludina* e *Zo-1* em relação ao grupo HF. A endotoxemia reduzida suprimiu a expressão gênica de inflamassomas e macrófagos no fígado dos animais tratados. Esses resultados coincidem com a redução da densidade de volume da esteatose e triacilglicerol hepático, reafirmando o papel do tratamento proposto na mitigação da DHGNA. Ambos os tratamentos melhoraram a resistência à insulina e maximizaram o metabolismo energético hepático com o favorecimento da beta-oxidação e reduziram a disbiose intestinal. No entanto, os tratamentos combinados apresentaram resultados mais expressivos na reversão dos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica ou rica em frutose. A ativação do PPAR- α e a inibição da DPP-4 se configura como uma ferramenta importante para evitar a progressão da DHGNA e de comorbidades associadas à obesidade.

Palavras-chave: PPAR-alfa. Inibidor da DPP-4. DHGNA. Intestino. Dieta hiperlipídicas. Dieta rica em frutose.

ABSTRACT

VEIGA, Flávia Maria da Silva. *Implications and effects of the use of DPP-4 inhibitor and PPAR- α agonist, alone or in association, on the enterohepatic axis of mice fed diets rich in fructose or lipids*. 127f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

High-fat and high-fructose diets are potent triggers of non-alcoholic fatty liver disease, intensified by gut-liver axis impairments. This study aimed to evaluate the effects of DPP-4 inhibitor activation and PPAR- α (WY14643) activation, alone or in combination, on the enterohepatic axis, inflammation and hepatic energy metabolism of mice fed a high-fat or high-fat diet fructose. Male C57BL/6 mice (3 months old) were fed a control diet (C, 10% of energy from lipid, n = 20), high-fat diet (HF, 50% of energy from lipid, n = 40) or high-fructose diet (HFRU, 50% of energy from fructose, n=40) for 12 weeks. After 12 weeks, the HF and HFRU groups were subdivided to receive treatment for 5 weeks (n = 10 per group): HF, HFA (PPAR- α agonist, 3.5 mg/kg/MC incorporated into the HF diet) , HFT (Linagliptin – Trayenta – 15mg/kg incorporated into the HF diet) and HFC (PPAR- α agonist associated with Linagliptin incorporated in the same doses to the HF diet); HFRU, HFRUA (PPAR- α agonist, 3.5 mg / kg /MC incorporated into the HFRU diet), HFRUT (Linagliptin 15mg/kg incorporated into the HFRU diet) and HFRUC (PPAR- α agonist associated with Linagliptin at the same doses incorporated into the HFRU diet). Biochemical analysis, RT-qPCR, immunofluorescence, and transmission electron microscopy (TEM) were performed in liver and intestine samples. The HFRU group presented glucose intolerance, endotoxemia and dysbiosis (with increased *Proteobacteria*) with no changes in body mass compared to the C group, but with intestinal ultrastructure damage, which led to liver inflammation and marked hepatic steatosis in the HFRU group compared to group C. The treatments rescued glucose intolerance, endotoxemia and dysbiosis, improving the ultrastructure of the intestinal barrier and reducing *Tlr4* expression in the liver of treated animals. These beneficial effects suppressed lipogenesis and attenuated steatosis. The HF diet was obesogenic compared to the C diet. All treatments caused significant body mass loss, and the HFC group showed similar body mass to the C group. All treatments mitigated oral glucose intolerance and increased GLP1 levels. These metabolic benefits restored the *Bacteroidetes/Firmicutes* ratio, resulting in increased goblet cells per large intestine area and reduced LPS levels in the treated groups, which also showed higher *Mucin 2*, *Occludin* and *Zo-1* expression compared to the HF group. Reduced endotoxemia suppressed gene expression of inflammasomes and macrophages in the liver of treated animals. These observations complied with a marked reduction in the volume density of steatosis and hepatic triacylglycerol, reaffirming the role of the proposed treatment in the mitigation of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Both treatments improved insulin resistance and maximized hepatic energy metabolism, favoring beta-oxidation, and controlling gut dysbiosis. However, the combined treatments showed the most expressive results in reversing the deleterious effects of high-fat and high-fructose diets. The activation of PPAR- α and inhibition of DPP-4 may be an approach to prevent the progression of NAFLD and other obesity comorbidities.

Keywords: PPAR- α . DPP-4 inhibitor. NAFLD. Intestine. High-fat diet. High-fructose diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura molecular da glicose e frutose.....	21
Figura 2 –	Efeitos do excesso da ingestão de frutose ou HFCS em órgãos-alvo.....	22
Figura 3 –	Ilustração do transporte da frutose através do epitélio intestinal.....	23
Figura 4 –	Esquema resumido da vida de oxidação da frutose nos hepatócitos.....	25
Figura 5 –	Esquema geral da constituição dos lipídeos.....	26
Figura 6 –	Esquema representativo da digestão de lipídeos.....	28
Figura 7 –	Esquema representativo de fatores que podem favorecer a obesidade	30
Figura 8 –	Esquema representativo da permeabilidade intestinal.....	33
Figura 9 –	Perfil de distribuição bacteriana ao longo do Intestino.....	35
Figura 10 –	Ilustração macroscópica do fígado de camundongos.....	38
Figura 11 –	Esquema das células presentes no tecido hepático.....	40
Figura 12 –	Esquema simplificado do metabolismo lipídico hepático.....	43
Figura 13 –	Esquema da progressão da DHGNA.....	45
Figura 14 -	Composição estrutural dos receptores nucleares.....	50
Figura 15 -	Esquema representativo da regulação dos complexos coativadores e correpressores.....	52
Figura 16 –	Esquema representativo do heterodímero formado entre os receptores PPAR e RXR e da de ativação dos PPARs.....	54
Figura 17 –	Esquema representativo da inibição da DPP-4 pelas incretinas intestinais....	59
Figura 18 -	Massa corporal, Ingestão alimentar e hídrica do grupo HFRU.....	70
Figura 19 -	Curva teste oral de tolerância à glicose e GLP-1.....	72
Figura 20 –	16S rRNA da microbiota intestinal, LPS e expressão relativa de RNA mensageiro do Tlr4.....	73
Figura 21 -	Microscopia eletrônica de transmissão do ceco.....	75
Figura 22 -	Expressão relativa de RNA mensageiro da Mucina, ZO-1 e DPP-4.....	77
Figura 23 –	Fotomicrografias representativas do tecido hepático; densidade de volume de esteatose hepática (%) e expressão relativa de RNA mensageiro do PPAR-alfa e CPT1- α	78
Figura 24 –	Expressão relativa de RNA mensageiro do PPAR-gamma, SREBP-1c, FAS e TLR4.....	80
Figura 25 -	Imunofluorescência para ALFA-AML, RELINA e PLIN-2.....	81

Figura 26 -	Esquema representativo dos principais achados dos efeitos do tratamento com PPAR-alfa e inibidor da DPP4.....	86
Figura 27 -	Massa Corporal, Ingestão alimentar e Consumo energético.....	93
Figura 28 -	TOTG, ASC e GLP-1.....	94
Figura 29 -	Genes de rRNA 16S da microbiota intestinal e expressão relativa de RNA mensageiro de LBP e TLR4.....	95
Figura 30 -	Expressão relativa de RNA mensageiro: Mucina, Zo-1 e Ocludina; estereologia e QA [células caliciformes].....	97
Figura 31 -	Fotomicrografias representativas do tecido hepático ao final do experimento, Vv esteatose (%) e níveis hepáticos de TAG.....	98
Figura 32 -	Expressão relativa de RNA mensageiro: CD206, IL-10, NLRP3 e IL-13.....	100
Figura 33 -	Representação esquemática dos principais efeitos do tratamento com o agonista PPAR-alfa e do inibidor da DPP-4.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências direta e reversa de primers RT-qPCR – Fígado – grupo HFRU	67
Quadro 2 – Sequências direta e reversa de primers RT-qPCR – Intestino – grupo HFRU	68
Quadro 3 – Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal – grupo HFRU	69
Quadro 4 – Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal – grupo HF	90
Quadro 5 – Sequência direta e reversa de primers utilizados no RT-qPCR – Fígado – grupo HF	91
Quadro 6 – Sequência direta e reversa de primers utilizados no RT-qPCR – Intestino – grupo HF	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AG	Ácido graxo
AGI	Ácido Graxo livre
AKT	Proteína quinase B
ALT/TGP	Alanina amino transferase
AST/TGO	Aspartato amino transferase
C	<i>Standard chow</i> (dieta controle)
CEH	Células estrelada hepáticas
CEI	Células epiteliais intestinais
COL	Colesterol
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
CTI	Células-tronco intestinais
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DBD	DNA binding domain
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DHGNA	Doença Hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase-4
EHNA	Esteato hepatite não alcoólica
FAS	Sintase de ácido graxo (do inglês <i>fatty acid synthase</i>)
FAT/CD36	Translocase de ácidos graxos
FL	Fosfolipídeos
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GLUT	Transportador de Glicose
GLUT2	Transportador de glicose do tipo 2
HF	dieta hiperlipídica (do inglês <i>high fat</i>)
HFCS	Xarope de milho rico em frutose (do inglês <i>high fructose com syrup</i>)
HFRU	dieta rica em frutose (do inglês <i>high fructose</i>)

IL	Interleucina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LBP	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos
LC-CoA	Acil-CoA de cadeia longa
LDN	Lipogênese <i>de novo</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MME	Membrana mitocondrial externa
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NLRP3	Receptores semelhantes a NOD (NLR) (do inglês Pyrin domain-containing protein)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PGC1α	Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RI	Resistência à Insulina
RN	Receptores Nucleares
RNA _m	RNA mensageiro
RXR	Receptor do ácido retinóico
SM	Síndrome Metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
SSB	Bebidas açucaradas (do inglês <i>sugar-sweetened beverages</i>)
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	Receptor do tipo <i>Toll-like</i>

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês low density lipoprotein)
Zo	Zônula de oclusão

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Modelos Experimentais	19
1.2	Frutose e lipídeos: consumo e impacto na saúde	20
1.2.1	<u>Epidemiologia e relação da frutose e lipídeos com a síndrome metabólica</u>	20
1.2.2	<u>Dietas ricas em Frutose</u>	21
1.2.2.1	Absorção e metabolismo da frutose	23
1.2.3	<u>Dietas ricas em Lipídeos</u>	25
1.2.3.1	Digestão, mobilização e transporte de lipídeos	27
1.2.3.2	Metabolismo hepático dos lipídeos	28
1.2.3.3	Oxidação de ácidos graxos	29
1.2.3.4	Alta ingestão de lipídeos e a obesidade	29
1.3	Morfologia e Barreira Intestinal	30
1.3.1	<u>Componentes extracelulares</u>	31
1.3.2	<u>Componentes celulares</u>	31
1.4	Microbiota Intestinal	34
1.4.1	<u>Alterações da barreira intestinal ocasionada pelo excesso no consumo de dietas ricas em frutose e lipídeos</u>	36
1.5	Fígado	37
1.5.1	<u>Comparação entre os fígados humanos e de camundongo</u>	37
1.5.2	<u>Função, composição celular e resposta imune hepática</u>	39
1.5.3	<u>Metabolismo energético hepático</u>	41
1.5.3.1	Metabolismo da glicose e triacilgliceróis (TAG)	41
1.5.3.2	Doença Hepática Gordurosa não alcoólica (DHGNA)	44
1.6	Resistência à Insulina (RI)	45
1.7	Eixo entero-hepático	47
1.8	Tratamento da DHGNA	47
1.8.1	<u>Receptores Nucleares (RN)</u>	48
1.8.1.1	Mecanismo de ação dos RN	51
1.8.1.2	<u>PPARs (Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) e seu</u>	

	<u>mecanismo de ação</u>	52
1.8.1.3	<u>PPAR e seus ligantes</u>	54
1.8.1.4	<u>Agonista PPAR-α como agente terapêutico</u>	54
1.9	Incretinas	57
1.9.1	<u>Inibição da Dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)</u>	58
1.9.2	<u>Efeitos do GLP-1 na Obesidade e DHGNA</u>	60
2	OBJETIVOS	62
2.1	<u>Objetivo Geral</u>	62
2.2	<u>Objetivos Específicos</u>	62
3	MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1	Modelo Experimental 1: Dieta rica em Frutose - Modulação do eixo intestino-fígado em camundongos alimentados com frutose: um papel para PPAR-alfa e Linagliptina	63
3.1.1	<u>Materiais e Métodos</u>	63
3.1.2	<u>Resultados</u>	63
3.1.3	<u>Discussão</u>	64
3.2	Modelo Experimental 2: Dieta hiperlipídica - Ativação do receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma e inibição da dipeptidil peptidase-4 alvo da disbiose para tratar fígado gorduroso em camundongos obesos	87
3.2.1	<u>Materiais e Métodos</u>	87
3.2.2	<u>Resultados</u>	92
3.2.3	<u>Discussão</u>	100
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
	REFERENCIAS	107
	APÊNDICE - Aprovação do Comitê de Ética.....	119
	ANEXO - Comprovação do 1 ^o artigo científico.....	120

INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia e doenças cardiovasculares e hepáticas, assumem importância crescente na saúde pública mundial (1). Embora as DCNTs possam estar relacionadas com fatores genéticos, a dieta e o estado nutricional representam um fator importante e modificável para a saúde humana.

A mudança nos padrões dietéticos envolve alterações quantitativas e qualitativas na dieta. O consumo elevado de alimentos contendo gorduras saturadas e frutose aumentou consideravelmente nos últimos anos, especialmente em países desenvolvidos em decorrência do maior consumo de produtos industrializados acarretando a gênese e desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A DHGNA se caracteriza pelo acúmulo de gordura no tecido hepático (2).

Um conceito inovador propõe que o eixo entero-hepático desempenha papel fundamental na progressão da DHGNA, pois o excesso do consumo de gordura saturada ou de frutose altera a composição da microbiota (disbiose) e aumenta a permeabilidade da barreira intestinal. Dessa forma, ocorre translocação de bactérias e toxinas produzidas por elas do lúmen intestinal para o sangue, com consequências para o metabolismo (3).

Os lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina presente na parede externa das bactérias gram negativas, têm os seus níveis consideravelmente aumentados pela influência da qualidade da dieta. Altos níveis de LPS induzem inflamação de baixo grau, que compromete a integridade da mucosa por alterações nas proteínas estruturais das zônulas de oclusão e aumento da permeabilidade intestinal (4). Além disso, a migração dessa endotoxina via veia porta para o tecido hepático leva a um quadro de endotoxemia (5).

Além da endotoxemia, a dieta hiperlipídica ou com excesso de frutose promove comprometimento da homeostase energética hepática, reduzindo a beta-oxidação e favorecendo a lipogênese e resistência à insulina (RI) (6). O influxo do LPS e de DNA bacteriano para o fígado pela circulação portal aumenta a expressão dos receptores toll like 4 (TLR4), com consequente prejuízo à sinalização hepática da insulina (7).

Dessa forma, dietas ricas em frutose ou em gordura saturada aumentam a endotoxemia pós-prandial com efeitos cumulativos quando consumidas cronicamente, como a inflamação hepática que favorece a progressão da DHGNA para formas mais graves como a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e a cirrose (8).

Estudos em camundongos mostram aumento na contagem de macrófagos intestinais e maior expressão de TLR4 no fígado, estimulada pelo aumento de LPS plasmático após o consumo de dieta rica em frutose (3). A disbiose promovida pelo consumo crônico excessivo de frutose ou lipídeos é geralmente demonstrada por um aumento da razão Firmicutes / Bacteroidetes que, além de induzir o binômio inflamação e estresse oxidativo, desencadeia a esteatose hepática por mecanismos associados ao aumento da extração de energia alimentar e favorecimento da lipogênese (7).

Diante deste cenário, a utilização de fármacos que revertam a disbiose e contenham as alterações hepáticas advindas do excesso dietético de frutose ou gordura saturada são pertinentes dada a elevada prevalência de DHGNA na população com sobrepeso ou obesa e sua progressão deletéria à saúde. Nesse contexto, os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição que se encontram no entrelaçamento de várias vias metabólicas (9).

A ativação farmacológica da isoforma alfa (PPAR-alfa) promove redução da massa corporal, alívio da RI, formação de adipócitos beges (10), além de redução expressiva da DHGNA pelo aumento da beta-oxidação mitocondrial (6).

Um estudo recente indicou que a ativação de PPAR-alfa está relacionada a regulação positiva sobre o metabolismo hepático (11). No entanto, não há relatos na literatura se o tratamento com agonista do PPAR-alfa melhora a disbiose em animais alimentados com dietas ricas em frutose ou gordura saturada e nem se a melhora do metabolismo energético hepático promovido pela ativação do PPAR-alfa tem relação com uma possível redução da endotoxemia e preservação da integridade da barreira intestinal (12).

Já a Linagliptina, um inibidor seletivo da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) que suprime a rápida degradação do peptídeo endógeno semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), aumenta a secreção de insulina dependente de glicose. A linagliptina tem sido utilizada em combinação com dieta e exercício físico na terapia do DM2, isoladamente ou em combinação com outros agentes hipoglicêmicos orais (13).

Até o momento, não existem relatos na literatura sobre a associação desses dois tratamentos (agonista PPAR-alfa e linagliptina) sobre o eixo entero-hepático. Portanto, a hipótese desse estudo é que a ativação do PPAR-alfa e a inibição da DPP-4 (isoladas ou associadas) revertam a disbiose e endotoxemia promovida pelo excesso dietético de frutose ou gordura saturada em camundongos C57BL/6 machos, com mitigação da esteatose

hepática por estímulos anti-inflamatórios e anti-lipogênicos oriundos da modulação do eixo entero-hepático.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Modelos Experimentais

A experimentação utilizando modelos animais nas pesquisas científicas tornou-se imprescindível para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Por volta de 1865, Claude Bernard, em seus estudos de fisiologia, descreveu os princípios da utilização de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” buscou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina. A partir de experimentos físicos e químicos, ele demonstrou que as alterações observadas nos animais eram semelhantes às doenças em humanos (14).

As descobertas realizadas com as pesquisas científicas auxiliam na descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras patologias que acometem os seres vivos. Como exemplo de contribuições provenientes da experimentação animal, temos a descoberta da insulina e antibióticos que contribuíram para o tratamento de diversas doenças, o desenvolvimento de técnicas de transplante de órgãos, a descoberta de fármacos que atenuam ou suprimem a evolução de determinadas doenças, assim como o desenvolvimento de vacinas para grandes pandemias como a atual epidemia do Covid-19, entre outros. Além da utilização de animais, as pesquisas científicas contam com o recurso alternativo dos estudos *in vitro* como a cultura de células.

Do ponto de vista científico, a escolha do modelo animal “ideal” deve levar em consideração o fenótipo e que a patogênese da condição do animal se assemelhe à doença humana em estudo (15). Animais de diversas espécies têm sido utilizados ao longo de séculos para o desenvolvimento científico. Dentre as espécies analisadas, o camundongo é o que mais atende os critérios científicos, sendo assim, é o mais utilizado nas pesquisas científicas. Somente no século XIX o camundongo passou a ser utilizado como instrumento para as pesquisas científicas (16).

O camundongo pertence a classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Existem controvérsias sobre espécies e subespécies criadas em laboratório, porém, está é a classificação mais aceita devido à presença de

cruzamentos. No caso de camundongos de linhagem C57BL/6, o genoma é originário de *Mus spretus*, e não de *Mus musculus* (17).

A escolha de camundongos de linhagem C57BL/6 para o desenvolvimento deste trabalho se deve ao fato de apresentarem um fenótipo semelhante ao observado em humanos quando alimentados com dieta hiperenergética (que mimetiza as dietas ocidentais). Esse modelo é conhecido como “obesidade induzida por dieta” (DIO – do inglês *diet-induced obesity*) e é utilizado em larga escala na literatura científica (5, 18).

Dentro do contexto da experimentação com animais, a escolha da dieta é um fator importante para a experimentação animal. Dietas ricas em carboidratos e/ou lipídeos são amplamente utilizadas para avaliação das alterações metabólicas em cepas de camundongos C57BL/6 (19, 20).

O excesso da ingestão de frutose e/ou lipídeos é capaz de alterar o metabolismo de carboidratos e lipídeos respectivamente, levando ao desenvolvimento da obesidade, DM2 (21), RI (22), hipertrigliceridemia (23), aumento da pressão arterial e doenças cardiovasculares (24) inflamação (25), doenças hepáticas (26).

1.2 Frutose e lipídeos: consumo e impacto na saúde

1.2.1 Epidemiologia e relação da frutose e lipídeos com a síndrome metabólica

Nas últimas décadas, o mundo tem passado por mudanças nos padrões dietéticos que caracterizam a chamada transição nutricional que envolvem alterações quantitativas e qualitativas na dieta. As novas práticas alimentares incluem elevado conteúdo energético, com maior ingestão de gorduras saturadas (maior parte de origem animal) e açúcares de adição, seguido da redução no consumo de fibra dietética, frutas, hortaliças e cereais (1).

A crescente prevalência de sobrepeso e obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento vem sendo considerada uma pandemia global (24). Tal condição aumenta consideravelmente a gênese e o desenvolvimento de comorbidades e DCNTs como: DM2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, entre outros. Dentre os múltiplos fatores etiológicos que predispõem as doenças crônicas, destacam-se os fatores genéticos, mudanças no comportamento alimentar e sedentarismo (27). Esse conjunto de desordens, quando associadas em um indivíduo, pode ser denominada de Síndrome

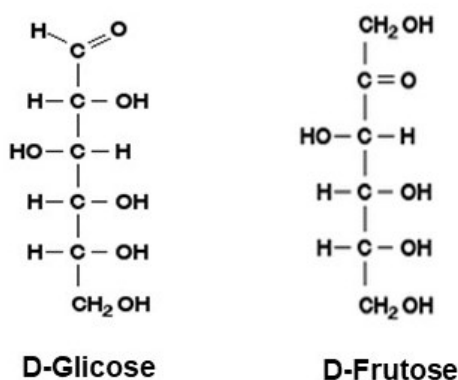
Metabólica (SM). Estudos recentes têm demonstrado que frutose e lipídeos têm contribuído para o aumento da incidência de sobrepeso e obesidade em todo o mundo (28).

Segundo o VIGITEL BRASIL¹ 2020, as DCNTs são um dos maiores problemas de saúde do Brasil. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que as DCNTs foram responsáveis por 73,6% das mortes ocorridas globalmente em 2019 (World Health Organization - WHO, 2018a, 2018b). Para OMS, um conjunto de fatores de risco é responsável pelas mortes por DCNTs e por uma fração da carga de doenças devida a essas enfermidades. Dentre esses fatores destacam-se o tabagismo, o consumo alimentar inadequado, o sedentarismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas (29).

1.2.2 Dietas ricas em Frutose

A frutose é um carboidrato² do tipo monossacarídeo, que apresenta sua estrutura molecular na forma de hexose ($C_6H_{12}O_6$), muito semelhante à glicose, diferindo apenas pela posição do grupo carbonila (Figura 1). Está presente em muitos alimentos, como frutas, vegetais, leguminosas, mel, constituinte da sacarose (β -D-Fructofuranosil α -D-glicopiranosida) e de outros polímeros, como a inulina (30).

Figura 1 – Estrutura molecular da glicose e frutose



Legenda: Representação esquemática da estrutura molecular da glicose e frutose (projeção de Fisher).
 Fonte: Harper, 2007.

¹ O VIGITEL realizou um inquérito telefônico para estimar a frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal no ano de 2020. Os dados publicados no VIGITEL são de responsabilidade do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde.

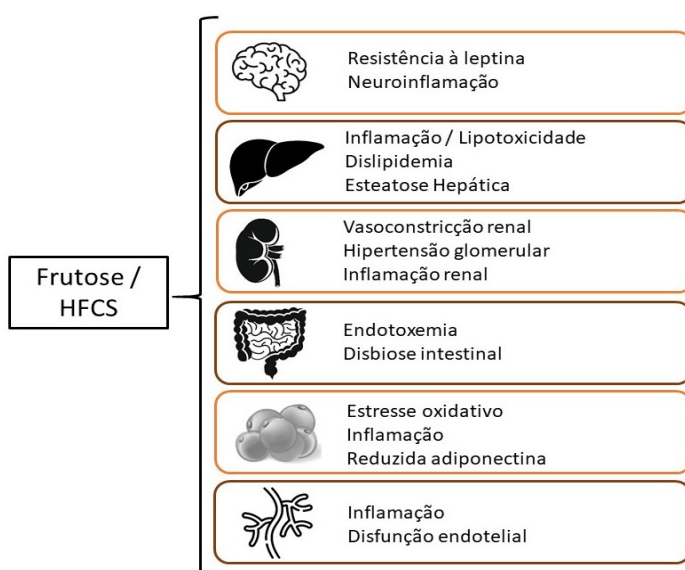
² Carboidrato – São substâncias que liberam determinados compostos por hidrólise. Podem ser divididos em três classes principais de acordo com o número de ligações glicosídicas: monossacarídeo, oligossacarídeos e polissacarídeos.

O consumo de frutose, o mais doce de todos os carboidratos, aumentou consideravelmente nos últimos anos. A frutose e a glicose formam o dissacarídeo sacarose. A sacarose já foi utilizada como o principal adoçante pela indústria alimentícia, porém, o fato de a frutose ser 1,5 – 1,7 vezes mais doce que a sacarose, a sua utilização aumentou consideravelmente em comparação com a sacarose nos últimos anos (31, 32). Além disso, a frutose possui baixo custo devido ao desenvolvimento no processo de extração de xarope de milho rico em frutose (HFCS - do inglês *high fructose corn syrup*).

Sendo assim, a frutose tem sido amplamente utilizada pela indústria alimentícia na produção de diversos produtos como as bebidas açucaradas (*Sugar-sweetened beverages – SSBs*), doces, pães, temperos prontos e embutidos. As SSBs são uma importante fonte de HFCS em todo o mundo e incluem refrigerantes, bebidas com sabor de frutas e bebidas esportivas. Em média, os SSBs contribuem com aproximadamente 7% das calorias diárias de boa parte da população (31, 33).

O consumo aumentado de alimentos que provenientes da incorporação da frutose, principalmente em bebidas como refrigerantes e sucos adoçados, trouxeram diversos efeitos deletérios para a saúde. Portanto, suscita o interesse científico para as consequências do consumo excessivo da frutose em órgãos-alvo (Figura 2). Há evidências de que a frutose seja mais deletéria do que a glicose em termos cardiovasculares como na hipertensão arterial (4).

Figura 2 – Efeitos do excesso da ingestão frutose ou HFCS em órgãos-alvo



Legenda: Principais efeitos do excesso da ingestão da frutose ou do HFCS em órgãos-alvo como o cérebro, fígado, rins, intestino, tecido adiposo e endotélio.

Fonte: Adaptado Johnson *et al.*, 2009.

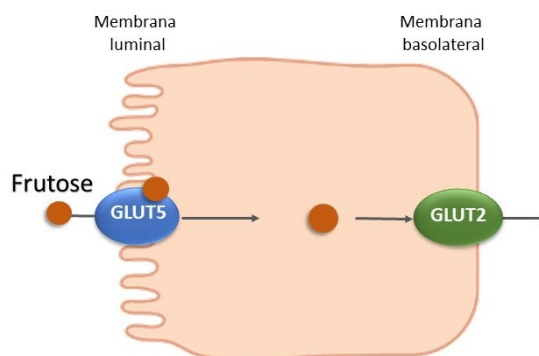
1.2.2.1 Absorção e metabolismo da frutose

A capacidade de absorção de frutose entre os seres humanos varia em torno de 15g em indivíduos adultos e, é, independente de energia. Entretanto, a capacidade de absorção da frutose pode ser aumentada em 29%, caso seja ingerida em associação com a glicose, ou sob a forma de sacarose (Caussy *et al.*, 2018; Panasevich *et al.*, 2018).

A frutose é um monossacarídeo, e, não requer clivagem enzimática para ser digerida. No período pós-prandial, a frutose é absorvida e, posteriormente, captada via transporte facilitado mediada pelo transportador GLUT5 (transportador de glicose 5) presente no epitélio intestinal (Figura 3). O GLUT5 possui alta afinidade pela frutose e encontra-se na membrana apical da região terminal do duodeno e jejuno (34).

Dentro do enterócito, parte da frutose é convertida em lactato, e em seguida é difundida através da membrana basolateral dos enterócitos com auxílio do GLUT2 (Figura 3). Dessa forma, atinge a corrente sanguínea pela veia porta, sendo transportada até os hepatócitos, onde é primariamente metabolizada (35).

Figura 3 – Ilustração do transporte de frutose através do epitélio intestinal



Legenda: A imagem ilustra o transporte da frutose e da glicose através do epitélio intestinal do enterócito. A frutose entra pela membrana luminal com o auxílio do transportador GLUT5. Após absorção, a frutose sai pela membrana basolateral com o auxílio dos transportadores GLUT2.

Fonte: Modificado de Brooks, Jones, Butler, 2010.

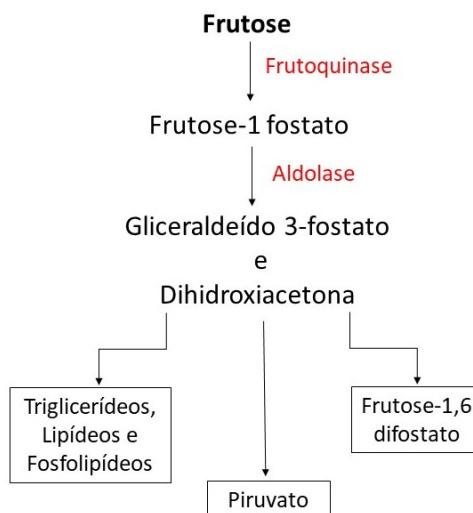
No hepatócito, a frutose é captada pelo seu receptor GLUT2, sem gasto de energia e estímulo de insulina (Figura 3). Nos hepatócitos, a frutose é fosforilada no carbono 1, mediada pelas enzimas frutoquinase ou cetoquinase, ou no carbono 6, mediada pela enzima hexoquinase, gerando a frutose-1 fosfato. A frutose-1 fosfato é clivada em duas trioses,

gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona (sendo uma a forma isomérica da outra), em uma reação mediada pela enzima aldolase B. Essas duas trioses poderão seguir três caminhos distintos:

- 1) via glicolítica, que tem como produto o piruvato e a adenosina trifosfato (ATP) para o ciclo de krebs;
- 2) reduzido até glicerol, que será utilizado na síntese de triacilgliceróis, fosfolipídeos e outros lipídeos; ou condensado até formar frutose 1,6 difosfato e, depois formar glicose ou glicogênio (ou seja, parte da frutose pode ser convertida em ácidos graxos livres no interior dos hepatócitos pelo processo de lipogênese *de novo* (LDN, do inglês *de novo lipogenesis*);
- 3) podem formar frutose 1,6-difosfato e a partir daí, formar glicose (50%) e glicogênio através da gliconeogênese (Figura 4) (36, 37). A frutose 1P ainda ativa proteínas quinase e, consequentemente, ativam proteínas da família de proteínas quinase ativada por mitógenos (MAPK) induzindo a fosforilação em serina do receptor de insulina (IRS-1), levando à resistência à insulina hepática.

A alta ingestão da frutose produz TAG por meio de produtos intermediários, culminando em sobrecarga no metabolismo lipídico hepático. Como consequência, ocorre inibição da oxidação de lipídeos, favorecendo a reesterificação dos ácidos graxos com o glicerol para formar TAG. O mecanismo pelo qual a frutose está associada com o aumento do TAG relaciona-se com o aumento da LDN. A contínua produção de acetil-CoA formada pelo metabolismo da frutose, gera produtos que contribuem para a síntese de TAG. A acetil-CoA é convertida a citrato, que é um substrato para LDN. O citrato é convertido em malonil-CoA, por uma reação mediada pela malonil-CoA carboxilase. A presença dessa enzima inibe a ação da carnitina palmitoil transferase (CPT-1), reduzindo a entrada de AGs na mitocôndria. Como consequência, ocorre uma limitação da beta-oxidação mitocondrial (31).

Figura 4 – Esquema resumido da via de oxidação da frutose nos hepatócitos



Legenda: O esquema mostra de forma resumida os produtos provenientes da degradação da frutose: formação de piruvato pela via glicolítica; formação de glicerol a partir de gliceraldeído 3-fostato que será direcionado para a síntese dos triacilgliceróis e fosfolipídeos; e formação de frutose 1,6 difostato que é direcionado para formação de glicogênio. A imagem ilustra o transporte da frutose e da glicose através do epitélio intestinal do enterócito. A frutose entra pela membrana luminal com o auxílio do transportador GLUT5. Após absorção, a frutose sai pela membrana basolateral com o auxílio dos transportadores GLUT2.

Fonte: A autora, 2022.

O excesso de frutose ainda ativa a proteína de ligação ao elemento regulador do estero1 (SREBP-1). O aumento de SREBP-1 estimula a transcrição de genes envolvidos na síntese dos AGI, como o acetil-CoA carboxilase (converte acetil-CoA em Malonil-CoA) e FAS (ácido graxo sintase). Esse mecanismo sobreexcede a capacidade metabólica mitocondrial, aumentando a lipogênese e reduzindo a beta-oxidação mitocondrial, o que predispõem o desenvolvimento da dislipidemia e esteatose hepática (31).

1.2.3 Dietas ricas em Lipídeos

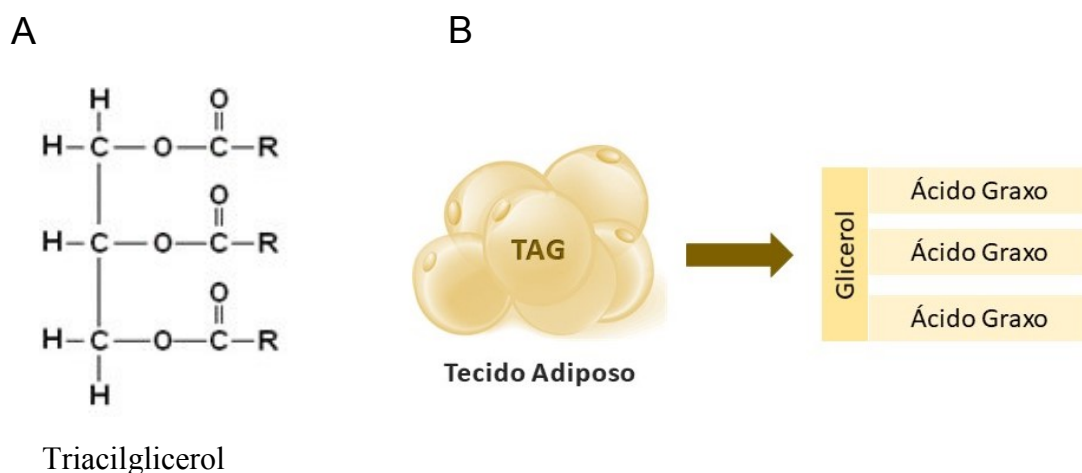
Os lipídeos são moléculas orgânicas insolúveis em água. São formadas a partir de ácidos graxos e glicerol (Figura 5) armazenados nos adipócitos via captação de ácidos graxos ou através da lipogênese. Existem inúmeros tipos de lipídeos tanto de origem animal quanto vegetal. Eles são classificados de acordo com a sua estrutura em: lipídeos simples, lipídeos compostos e lipídeos derivados. Os triacilgliceróis são lipídeos simples e

representam a forma mais abundante de lipídeos encontrados nos alimentos, bem como no organismo humano. Existem inúmeros tipos de lipídeos complexos, no entanto, os de maior importância na dieta ocidental são o colesterol (COL), os ésteres de colesterol (Col-E) e os fosfolipídeos (FL) (38).

Os lipídeos desempenham funções importantes no organismo humano, como: constituição da membrana plasmática, isolamento térmico e físico, transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis, proteção aos órgãos, precursor de hormônios e fornecimento de energia sob a forma de ATP para as funções metabólicas (39). São classificados de acordo com a cadeia carbônica dos ácidos graxos em: curta – 2 a 4 átomos de carbono; média – 6 a 10 átomos de carbono e longa – mais de 12 átomos de carbono (40).

Representam a maior fonte energética (9 kcal/g) da alimentação, e estão sob a forma de TAG e COL (39, 41). Os TAG são armazenados principalmente no tecido adiposo (TA) como reserva energética, e a mobilização dessa energia ocorre quando necessário, como por exemplo em períodos de privação de alimentação (Figura 5A-B) (11).

Figura 5 – Esquema geral da constituição dos TAG



Legenda: Os TAG apresentam em sua estrutura AGs ligados a três moléculas de glicerol. Estrutura química do TAG (A); representação esquemática do TAG armazenado no TA (B).

Fonte: A autora, 2022.

1.2.3.1 Digestão, mobilização e transporte de lipídeos

A quebra de lipídeos é denominada lipólise, e inicia-se no intestino delgado, com o auxílio dos sais biliares que emulsificam as gorduras formando micelas. As lipases hidrolisam os TAG, liberando ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos livres (AGL) e COL formam micelas mistas com os sais biliares que se aproximam do sítio de absorção lipídica, onde atravessam a camada de água e é absorvido (Esposito *et al.*, 2014).

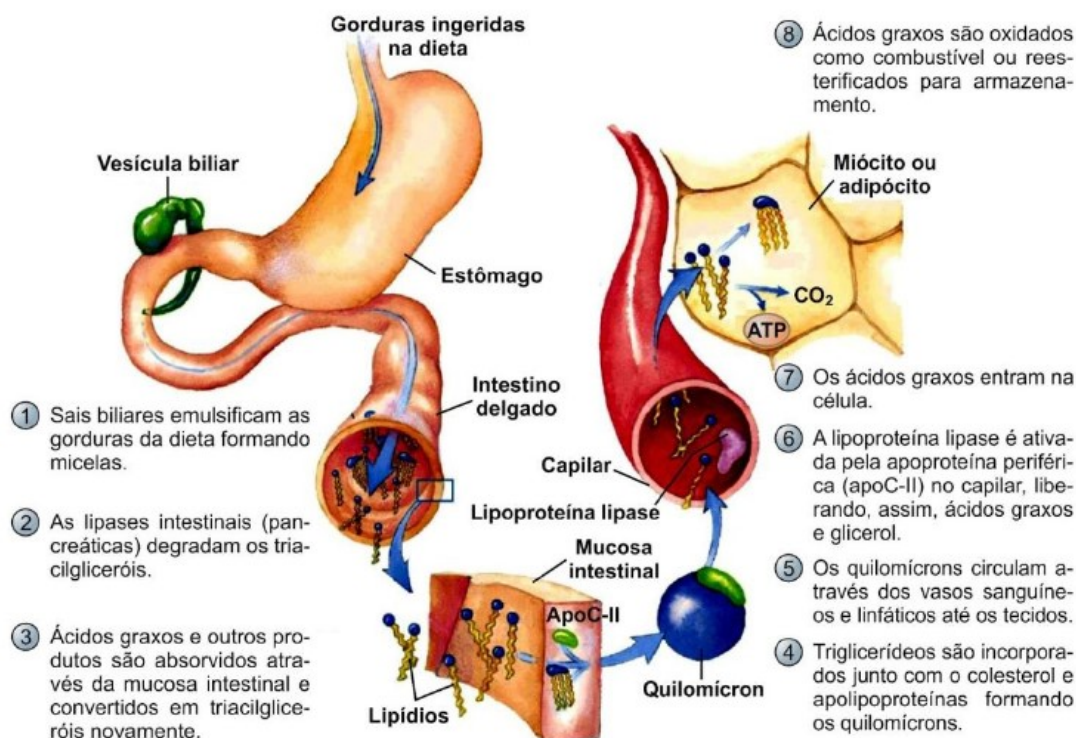
Dentro das células intestinais, a área de superfície da interface é aumentada pelos movimentos peristálticos do intestino, combinados à ação emulsificante dos ácidos biliares (ou sais biliares). Os ácidos graxos formam complexos com a proteína intestinal de ácidos graxos, que aumenta a solubilidade efetiva dos lipídeos e protege a célula dos efeitos dessas substâncias (Figura 6) (Di Paola *et al.*, 2018).

O processo de emulsificação dos lipídeos ocorre no duodeno. A colecistoquinina, um hormônio peptídico, é produzido em resposta à presença de lipídeos, atuando sobre a vesícula biliar e estimulando a secreção da bile, e ainda, sobre as células exócrinas do pâncreas, estimulando a secreção de enzimas. A secretina, um hormônio peptídico, tem a função de auxiliar na neutralização do pH do conteúdo intestinal, por estimular o pâncreas a secretar uma solução rica em bicarbonato. Sendo assim, os lipídeos são degradados por enzimas pancreáticas que estão sob controle hormonal. As lipases agem na interface lipídeo-água por ativação interfacial (42).

O glicerol atravessa a mucosa intestinal, sendo convertido em TAGs. TAGs e COL são incorporados às proteínas transportadoras, as apolipoproteínas, formando os quilomícrons, que são carregados pela corrente sanguínea até chegar no fígado, principal órgão que metaboliza os lipídeos. A esterificação³ de cadeias acil dos ácidos graxos juntamente com glicerol-3-fosfato é realizada para a formação de novos TAG. Este processo ocorre através de uma reação enzimática por enzimas denominadas aciltransferases (Birchenough *et al.*, 2015; Burgueno e Abreu, 2020).

³ Ácidos Graxos com menos de 10 carboidratos não são esterificados no interior do intestino, sendo absorvidos diretamente para corrente sanguínea via veia porta.

Figura 6 – Esquema representativo da digestão de lipídeos



Legenda: Esquema representativo da digestão de lipídeos ao longo do trato intestinal.

Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2017.

1.2.3.2 Metabolismo hepático dos lipídeos

Após chegarem no tecido hepático, os ácidos graxos são metabolizados no interior da mitocôndria. A molécula de ácido graxo não consegue permear a membrana mitocondrial, portanto, é necessário que este seja convertido a acil-CoA. Dentro da membrana mitocondrial externa (MME), o acil-CoA se ligará à carnitina formando o complexo acil – carnitina graxo. Na formação deste complexo ocorre a liberação de uma coenzima A. O acil – carnitina graxo, então, entra na matriz mitocondrial com o auxílio do transportador denominado carnitina. Na matriz mitocondrial a carnitina será substituída pela coenzima A e teremos novamente um acil-CoA que poderá, então, ser oxidado pelo processo chamado de β -oxidação que ocorre na matriz mitocondrial (43).

1.2.3.3 Oxidação de ácidos graxos

A β -oxidação compreende um processo catabólico pelo qual os ácidos graxos são transferidos para as mitocôndrias e são decompostos para gerar precursores para a geração de ATP. É um processo no qual fragmentos de dois carbonos são sucessivamente removidos da extremidade carboxila da acilCoA, produzindo acetil coa (44).

O Acil-CoA entra na MME acoplado à CPT1 e chega na matriz mitocondrial acoplado à CPT2. Na matriz mitocondrial, os AGs sofrem remoção oxidativa de unidades de carbono na forma de acetil-CoA, começando da extremidade carboxila da cadeia carbônica (45).

A β -oxidação é concluída quando todo o acil-CoA é oxidado totalmente e convertido em acetil-CoA. O objetivo da β -oxidação é reduzir a cadeia de acil-CoA graxo de cadeia longa em 2 carbonos. A regulação da via é realizada pela enzima CPT1, que regula a entrada de ácidos graxos na mitocôndria. Essa enzima é inibida pelo Malonil-CoA, um intermediário que tem sua concentração aumentada na presença de excesso de carboidratos disponíveis, que se configuram como precursor na biossíntese de ácidos graxos (46).

1.2.3.4 Alta ingestão de lipídeos e a obesidade

A obesidade tornou-se uma epidemia mundial de caráter multifuncional. Os fatores epigenéticos e ambientais estão fortemente relacionados à obesidade, no entanto, os hábitos nutricionais associados ao estilo de vida sedentário, têm um impacto relevante para o desenvolvimento da obesidade. Está fortemente associada as doenças cardiovasculares associadas à hipertensão arterial, dislipidemia, DM2, entre outras (47).

O consumo elevado por um tempo prolongado de dieta hiperlipídica leva a um quadro de hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo visceral, o que é determinante para a gênese e desenvolvimento da obesidade. Vale ressaltar que uma dieta hiperlipídica (Figura 7) está relacionada com o aumento da massa corporal (MC) e comorbidades (48).

O TA é o principal reservatório energético do organismo. Portanto, quando o TA excede sua capacidade de armazenamento, o excesso de lipídeos é mobilizado para outros

órgãos como o fígado, tecido muscular e pâncreas. Como consequência, ocorre aumento da adiposidade, produção de citocinas pró-inflamatórias, RI, dislipidemia e, frequentemente, este quadro está relacionado com a doença cardiovascular e aterosclerose (49).

A obesidade está relacionada à desregulação do metabolismo lipídico, que pode resultar em níveis elevados de lipídeos na corrente sanguínea, deposição lipídica ectópica e doenças metabólicas associadas, como a DHGNA e aterosclerose (48).

Atualmente, admite-se que a obesidade desempenha um importante papel na microbiota e na integridade da barreira intestinal. O mecanismo pelo qual estão associados, se deve ao fato de ocorrer um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal (50).

Figura 7 – Esquema representativo de alimentos que podem favorecer a obesidade



Legenda: Esquema que ilustra alguns alimentos ricos em gorduras saturadas e frutose como os alimentos fast-food, bebidas adoçadas, entre outros provenientes da dieta favorecem a gênese e desenvolvimento da obesidade.

Fonte: A autora, 2022.

1.3 Morfologia e barreira intestinal

O intestino apresenta peculiaridades na sua morfologia que lhe conferem características distintas em cada região, pois, além de atuar no processo de absorção de nutrientes, desempenha a importante função de barreira contra a entrada sistêmica de agentes nocivos, sejam eles microrganismos ou antígenos provenientes da alimentação

(51). Os elementos que formam a barreira do epitélio intestinal são classificados em componentes extracelulares e celulares, de acordo com a sua localização e funcionalidade.

1.3.1 Componentes extracelulares

Compreendem o pH gástrico, as secreções pancreáticas e biliares de enzimas digestivas (lipases, proteases, amilases e nucleases). Tais elementos conferem um mecanismo de defesa ao trato gastrointestinal, auxiliando no processo de digestão e fornecendo uma proteção catalítica e tóxica sobre os microrganismos e antígenos. Simultaneamente, na mucosa intestinal estão presentes as mucinas. Possuem propriedades hidrofóbicas e surfactantes, conferindo uma barreira física no epitélio intestinal contra traumas de partículas dentro do lúmen, assim como, fornecem proteção contra microrganismos, como bactérias e vírus, impedindo sua adesão à mucosa e ao epitélio intestinal (51).

1.3.2 Componentes celulares

Os componentes celulares estão dispostos sobre o epitélio intestinal que é formado por uma monocamada de células colunares justapostas que revestem o lúmen intestinal. O epitélio tem a função de atuar como uma barreira para impedir a passagem de antígenos, além de ser seletivo à translocação de nutrientes provenientes da dieta, eletrólitos e água do lúmen intestinal para a circulação (52).

Compreendem vilosidades e criptas que se dispõem ao longo de todo epitélio. As vilosidades são projeções microscópicas que se estendem no lúmen intestinal e são revestidas por uma camada de epitélio colunar que contém células diferenciadas. As vilosidades permitem aumentar a área de contato com os alimentos, facilitando a absorção de água e nutrientes. As criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino, responsáveis pela proliferação desse tecido. Nas criptas residem as células-tronco intestinais (CTI), que apresentam duas propriedades funcionais: auto-renovação e multipotência. As CTIs produzem um tipo celular denominado, células progenitoras ou

transitórias. À medida que, as células progenitoras migram em direção à região apical do intestino, elas diferenciam-se em células absorptivas ou colunares: enterócitos, ou em células secretórias: células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas (53).

As células absorptivas apresentam borda digitiforme, caracterizada por uma densa matriz de vilosidades em sua superfície apical. As células caliciformes apresentam uma contínua produção e acúmulo de vesículas de secreção glicoproteica, composta principalmente de mucina, na região apical. Estão localizadas entre as células absorptivas (enterócitos). A sua característica de produzir muco, confere a função de lubrificar e proteger o epitélio intestinal (53).

As mucinas formam uma barreira física no epitélio intestinal, ajudando a conter bactérias comensais no lúmen do intestino, impedindo a sua adesão nas células epiteliais. As células de Paneth diferenciam-se dos demais tipos celulares. Estão presentes dispersas na parte inferior da cripta, e, secretam proteínas antibacterianas que impedem a passagem de microrganismos para a mucosa intestinal, atuando como reguladora da densidade microbiana e protetora de células-tronco próximas. As células enteroendócrinas, são as menos abundantes e secretam hormônios intestinais, como os peptídeos e catecolaminas (53).

Existem duas vias pelas quais íons e moléculas, incluindo os nutrientes, podem atravessar a monocamada epitelial intestinal, são elas: a via transcelular e a via paracelular (Figura 8A) (52). A integridade da via paracelular depende da regulação das junções oclusivas, também conhecida como *tight junctions*⁴. Elas exercem função de barreira semipermeável entre o domínio apical e basolateral, mantendo a polaridade celular e bloqueando a livre difusão de proteínas, lipídeos e produtos patogênicos (54).

Em nível molecular, as junções oclusivas são constituídas por três grupos de proteínas integrais de membrana: claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional (Figura 8B). As junções formam um complexo formado por proteínas integrais que interagem indiretamente com o anel perijuncional do citoesqueleto da actina por meio de proteínas citoplasmáticas como as zônula de oclusão (ZO-1, ZO-2 e ZO-3), cingulina e antígeno 7H6 (55). As proteínas integrais formam uma vedação na região mais apical da

⁴ As *tight junctions* (ou junções oclusivas) são estruturas dinâmicas que regulam a passagem paracelular de íons, solutos e água, cuja permeabilidade pode ser alterada em resposta a estímulos como nutrientes, sinalização humoral ou neuronal ou mediadores inflamatórios, o que lhe atribui importante função no epitélio gastrointestinal, seja em condições fisiológicas ou patológicas.

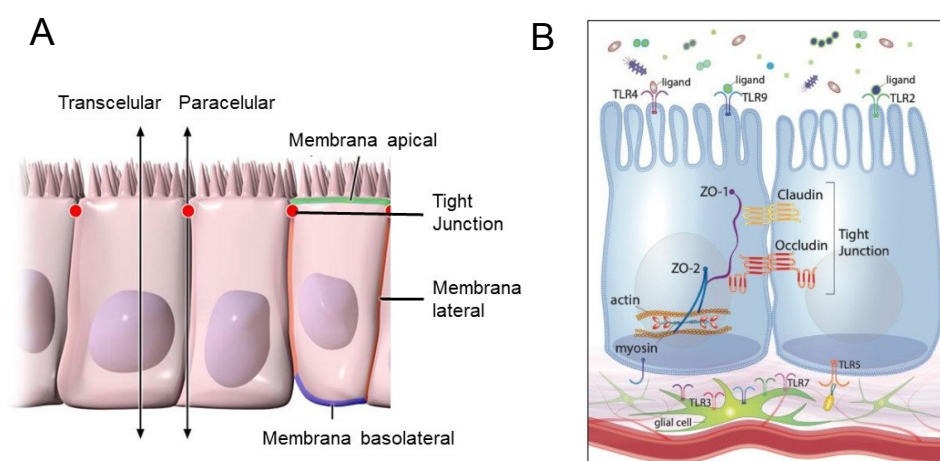
membrana lateral das células conferindo uma obliteração parcial do espaço intercelular nessa região da membrana plasmática (52).

As claudinas são fosfoproteínas consideradas componentes chaves para a função das junções oclusivas (56). A interação das alças extracelulares de ocludina com as células adjacentes cria uma barreira para macromoléculas, por isso é considerada fundamental para manter a permeabilidade intestinal. As claudinas executam funções diferentes em cada segmento e podem ser divididas em dois tipos:

- 2 envolvidas na formação de barreira – conferem maior ou menor permeabilidade paracelular – claudina -1, -3, -4, -8;
- 3 desempenham um papel na formação de poros ou canal – claudina -2, -7, -12 (57).

No intestino delgado, há maior expressão de claudinas relacionadas à formação de poros e ao transporte paracelular de íons, como por exemplo claudina -2. No entanto, no cólon, é detectado uma maior expressão de claudinas formadoras de barreira, como claudina-1. De acordo com alguns estudos, as claudinas -2, -3 e -7 são detectadas em todos os segmentos do epitélio intestinal (57).

Figura 8 – Esquema representativo da permeabilidade intestinal



Legenda: O esquema representativo mostra o epitelial intestinal. Delimitações da célula intestinal: membrana apical, lateral e basolateral; presença de tight junction e as vias de transporte de nutrientes: transcelular e paracelular (A); Estrutura junções oclusivas - ZO, Claudina, Ocludina (B).

Fonte: Disponível em <https://doi.org/10.3390/ijms22136729>.

1.4 Microbiota Intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é o sítio orgânico mais povoado por microrganismos comensais e simbióticos, como bactérias, fungos, archaea, vírus e protozoários (58-60). O termo microbiota foi designado para caracterizar a população de microrganismos que habitam o TGI, enquanto o termo microbioma refere-se ao material genético da microbiota de um determinado local do corpo humano (61).

O TGI possui aproximadamente 10¹³-10¹⁴ microrganismos. O intestino humano é um ecossistema densamente povoado por bactérias (Siezen e Kleerebezem, 2011) e estima-se que o conjunto de genomas bacterianos possui aproximadamente 3 milhões de genes, o que representa aproximadamente 150 vezes superior aos genes do hospedeiro (Qin J, 2010). Atualmente, é possível identificar a diversidade filogenética através da análise do DNA ribossômico 16S (rDNA) para 90% dos tipos bacterianos presentes na microbiota intestinal (62).

As bactérias comensais exercem o papel de proteção, impedindo a proliferação de bactérias patogênicas que geralmente são causadas pelo desequilíbrio da microbiota. A colonização microbiana do intestino inicia-se no período neonatal e é fundamental para o desenvolvimento das vias metabólicas e imunológicas do recém-nascido. Após o nascimento a microbiota intestinal é muito instável, tendo o seu processo de amadurecimento concluído aproximadamente aos três anos de idade (56).

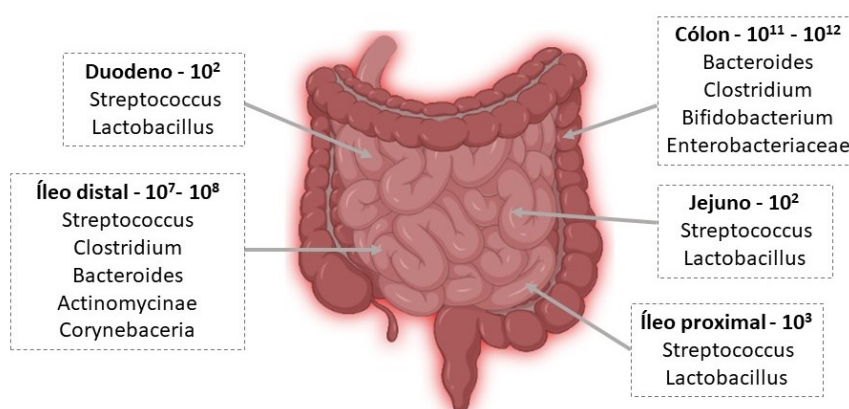
Somente na idade adulta a microbiota se diversifica e estabiliza, e passa a exercer uma grande influência na fisiologia e no desenvolvimento do sistema imunológico do seu hospedeiro. Alterações durante este processo de colonização mostraram aumentar a suscetibilidade à doença durante a vida humana (56). Na flora microbiota intestinal de humanos são encontrados predominantemente os filos Firmicutes (64%) e Bacteroidetes (23%), e, em menor proporção os filos Proteobacteria e Actinobacteria. Embora estes organismos estejam presentes na maioria dos indivíduos nesta proporção, há sempre variações existentes de acordo com cada espécie (62, 63).

O filo Bacteroidetes compreende bactérias Gram-negativas que inclui os gêneros Bacteroides e Prevotella. O filo Firmicutes é dividido em duas classes principais de bactérias Gram-positivas, Bacilli e Clostridia, incluindo os gêneros Clostridium, Enterococcus, Lactobacillus e Ruminococcus (Woting e Blaut, 2016). Estas bactérias representam mais de 90% da população microbiana em camundongos e humanos, sendo

que Proteobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria e Cyanobacteria são os filos mais representados nas demais bactérias (12) (12).

A quantidade e a diversidade de bactérias presentes no TGI demonstram variação ao longo do TGI. Deste modo, o número de células bacterianas presente no intestino dos mamíferos mostra um contínuo que vai desde as 10^2 a 10^3 bactérias por grama de estômago e duodeno até 10^4 a 10^7 de bactérias por grama de jejuno e íleo e culmina com 10^9 a 10^{12} de células por grama de cólon (Figura 9).

Figura 9 – Perfil de distribuição bacteriana ao longo do intestino



Legenda: Composição microbiana do intestino humano.
Fonte: Adaptado de Costela *et. al.*, 2009

Pela proximidade com o estômago, o intestino delgado (duodeno) apresenta um quantitativo relativamente baixo de bactérias em função da presença de ácidos gástrico e biliares, suco pancreático e intestinal (60). A microbiologia do íleo terminal representa uma zona de transição entre o jejuno, onde predominam espécies aeróbias, e a população de elevada densidade de anaeróbios que se encontra no cólon. Na região do íleo terminal estão presentes predominantemente microrganismos gram-negativos e anaeróbios. Ao passo que, na região do cólon, a concentração e diversidade da microbiota eleva-se consideravelmente. Estas são constituídas na grande maioria por bactérias anaeróbias, como os pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium*, com as bactérias anaeróbias numa relação para as aeróbias de 100 a 1000:1 (56, 60).

1.4.1 Alterações da barreira intestinal ocasionada pelo excesso no consumo de dietas ricas em frutose e lipídeos

Numerosos estudos apontam que a composição da dieta se configura como um gatilho para a desregulação da barreira intestinal, assim como a composição da microbiota do seu hospedeiro (60). As variações na composição da microbiota fecal podem ser observadas em indivíduos com condições fisiológicas associadas à dislipidemia e deposição lipídica ectópica, como aterosclerose e esteatose hepática (63).

A função da barreira intestinal está intimamente relacionada com a homeostase das células epiteliais intestinais (CEI), camada de muco e das células imunes. As CEI expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que são proteínas codificadas que reconhecem e se ligam a ligantes microbianos específicos (56).

Estudos demonstram que dietas ricas em frutose e lipídeos levam à redução de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), favorecendo a redução da diversidade filogenética das bactérias simbióticas, bem como mudança na composição e função da microbiota intestinal (1).

Concomitantemente, os receptores do tipo Toll-like (TLR5), que são pertencentes à subfamília dos PRRs, como exemplo o TLR4, reconhecem padrões de moléculas associados a patógenos (PAMPs) que são expressos por bactérias gram-negativas. Os LPS, também conhecida como endotoxina bacteriana, são estruturas presentes na membrana externa das bactérias gram-negativas. Os LPS consistem em PAMPs que ativam uma resposta imune inata (60).

Níveis aumentados de LPS induzem inflamação de baixo grau, que compromete a integridade da mucosa por alterações nas proteínas estruturais das junções oclusivas e aumento da permeabilidade intestinal (5). Níveis aumentados de LPS na corrente sanguínea desencadeiam um quadro de endotoxemia metabólica. A endotoxemia é uma condição ligada a perturbações metabólicas como dislipidemia, RI, DHGNA e doenças cardiovasculares. A translocação dessas endotoxinas contribui para gerar uma resposta metabólica deficiente, assim como, promove um estado inflamatório crônico através da ativação do TLR4, que é expresso em células imunes, como os macrófagos e em outros

⁵ Os TLRs são receptores que desempenham um papel fundamental no sistema imunológico. São expressos nas membranas de células imunes e não imunes, incluindo as células epiteliais, e reconhecem moléculas que são amplamente compartilhadas por microrganismos.

tipos celulares, incluindo os hepatócitos e adipócitos, dificultando a absorção de nutrientes (64).

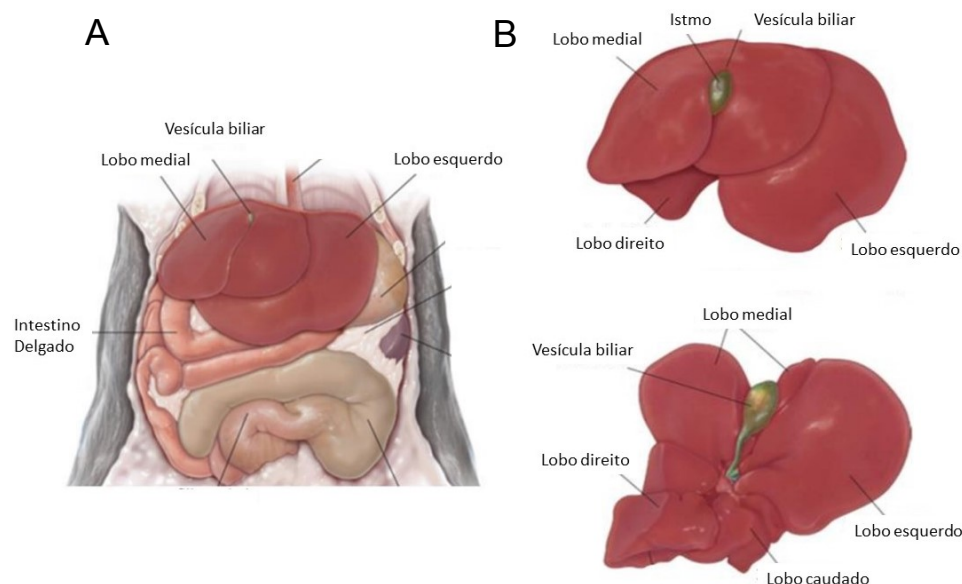
A sinalização TLR na mucosa intestinal também pode induzir a produção de citocinas inflamatórias, que levam à ativação de respostas inflamatórias envolvidas na progressão da DHGNA. Por exemplo, a ativação do inflamassoma NOD-, LRR- e pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) pelo LPS via TLR4 está envolvida no desenvolvimento da DHGNA. O aumento da permeabilidade intestinal também está ligado à DHGNA em humanos. Os pacientes com DHGNA têm mostrado aumento da permeabilidade intestinal em comparação com controles saudáveis e a permeabilidade intestinal está correlacionada à gravidade da esteatose (63).

1.5 Fígado

1.5.1 Comparação entre os fígados humano e de camundongo

O fígado humano ocupa o quadrante superior do abdômen e encontra-se fixado por alguns ligamentos, enquanto o fígado do camundongo abrange todo o espaço subdiafragmático e aparentemente não apresenta ligamentos (Figura 10A). Embora os padrões dos lobos sejam específicos de cada espécie, as subunidades lobulares são altamente conservadas em estrutura e função. Apresentam quatro lobos: esquerdo, direito, medial e caudado (Figura 10B). As adaptações à exposição a dietas ricas em lipídeos ou carboidratos são semelhantes e usualmente verificadas pela análise histológica (65).

Figura 10 – Ilustração macroscópica do fígado de camundongo



Legenda: Ilustração macroscópica da cavidade abdominal do camundongo indicando a localização do fígado (A); os quatro lobos presentes no fígado de camundongos: direito, esquerdo, medial e caudado (B).
Fonte: Adaptado e Rogers, 2012.

Sob a análise microscópica, o fígado humano apresenta uma organização hexagonal de lóbulos clássicos, cordões de hepatócitos bem definidos e alinhados, enquanto no fígado de camundongo esta organização não é tão linear. Além disso, o fígado dos camundongos exibe menos tecido conjuntivo do que o de humanos (66).

O sangue arterial e venoso entra no lóbulo a partir de “tríades” portais (arteríolas, vênulas, ductos biliares e linfáticos). Nutrientes e macromoléculas são trocados entre hepatócitos e plasma através de sinusóides revestidos por endotélio fenestrado, enquanto as demais células residentes, incluindo células estreladas hepáticas e células de Kupffer mantêm a imunidade. A função fisiológica é semelhante em ambas as espécies, embora existam algumas diferenças morfológicas (65).

As diferenças existentes entre as duas espécies devem ser observadas e consideradas para a utilização de camundongos como modelos de pesquisa. Entretanto, observa-se muitas semelhanças na estrutura geral e funções hepáticas entre o humano e o camundongo. Fato este que reforça a viabilidade da utilização do modelo animal em trabalhos experimentais, sendo uma característica importante para os estudos científicos (66).

1.5.2 Função, composição celular e resposta imune hepática

O fígado é um órgão metabolicamente ativo, tendo em vista a sua multiplicidade funcional. Portanto, os hepatócitos são células que apresentam um caráter multifuncional: apresenta numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático bem evidenciado, onde ocorre a síntese de diversas proteínas plasmáticas, e demais organelas citoplasmáticas com sua importância funcional para o funcionamento das atividades metabólicas desenvolvido no tecido hepático. Dentre as principais atividades vitais e essenciais à manutenção da homeostasia corporal, destaca-se:

- a) Síntese e armazenamento de proteínas;
- b) Secreção biliar;
- c) Formação de fatores de coagulação;
- d) Função metabólica, catabólica, excretora e secretora;
- e) Excreção de substâncias tóxicas.

Além dos hepatócitos, o tecido hepático é constituído por demais células que são essenciais para a manutenção das condições fisiológicas e fisiopatológicas desse órgão, conhecidas como células não parenquimatosas. São elas: células de Kupffer, células biliares, células estreladas hepáticas (ou células de Ito) e linfócitos intra-hepáticos (Figura 11) (67).

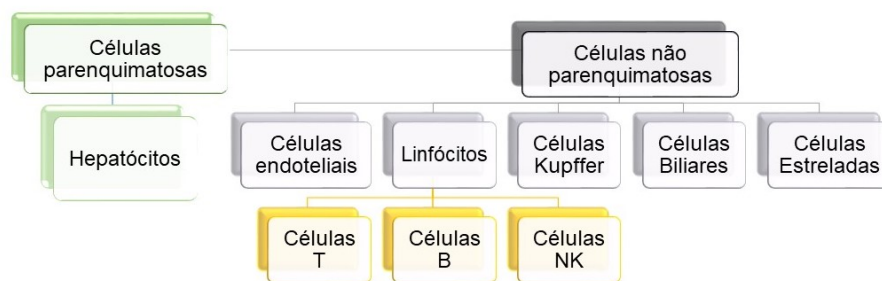
As células não parenquimatosas representam aproximadamente 50% das células do fígado e revestem as artérias e as veias central e porta, sua morfologia difere consideravelmente e formam um endotélio fenestrado. As não parenquimatosas expressam moléculas que promovem a captação de antígenos, e moléculas apresentadoras de antígenos, incluindo MHC classe I e II e as moléculas coestimuladoras CD40, CD80 e CD86.

- a) Células de Kupffer (ou macrófagos) – representam cerca de 20% das células não parenquimatosas do fígado. Residem no espaço vascular sinusoidal, predominantemente na área periportal. Tem a função de fagocitar hepatócitos apoptóticos;
- b) Células estreladas hepáticas (CEHs) ou células de Ito – estão localizadas no espaço de Disse e sua principal função é o armazenamento de vitamina A sob a forma de

ésteres de retinol. No fígado saudável, as CEHs mostram um fenótipo quiescente. Existem muitas evidências de que a ativação das CEHs desempenha um papel crítico na fibrose hepática;

- c) Linfócitos – encontrados por todo o parênquima, incluem linfócitos do sistema imunológico adaptativo (células T) e células do sistema inato produzidas pelo Timo (células NKT e NK – *natural Killer*).

Figura 11 – Esquema das células presentes no tecido hepático



Legenda: O esquema mostra as principais células presentes no tecido hepático.
Fonte: A autora, 2022.

As células imunes são ativadas por diversos estímulos que incluem produtos bacterianos como o LPS. As citocinas derivadas de células de kupffer desempenham um papel fundamental na modulação da diferenciação e proliferação de outras células. Em resposta a concentrações fisiológicas de LPS, as células de kupffer produzem TNF- α e IL-10, que regulam negativamente a captação de antígeno mediada por receptor e a expressão de MHC⁶ classe II em células não parenquimatosas e células dendríticas, e diminuem a ativação de células T (68).

As células natural killer (NK) hepáticas modulam a lesão hepática equilibrando a produção local de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias após a ativação por meio de seus receptores ativadores e inibitórios. Acredita-se que células NTK polarizam as respostas imunes adaptativas locais e sistêmicas a um perfil tipo I (IFN- γ e TNF- α) e um

⁶ MHC (do inglês Major Histocompatibility Complex) complexo principal de histocompatibilidade – é a região presente na superfície dos linfócitos que atua no reconhecimento e na apresentação de antígenos. Possui papel importante no sistema imune.

perfil tipo II (IL-4, IL-10, IL-13). Admite-se que as células NTK estejam envolvidas nas infecções hepáticas. Estudos com camundongos deficientes de NTK são mais suscetíveis a certas infecções virais e bacterianas (68).

1.5.3 Metabolismo energético hepático

O fígado é um órgão que apresenta um papel central na regulação da homeostase do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. O metabolismo energético hepático compreende o conjunto de reações metabólicas que produzem a energia necessária para a realização das funções vitais através da degradação ou ligação das moléculas (catabolismo ou anabolismo). Para que essas reações ocorram, são necessários substratos energéticos, que são provenientes da alimentação. As principais fontes de energia utilizadas nessas reações são os carboidratos, os lipídeos e as proteínas. A regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos ocorre no fígado e órgãos como o tecido adiposo e músculo, para manter a homeostase corporal, em condições de jejum e pós-prandial (69).

1.5.3.1 Metabolismo da glicose e triacilgliceróis (TAG)

Em condições fisiológicas, a glicose proveniente da dieta é utilizada para a manutenção das condições metabólicas de corpo. Quando os níveis de glicose e lipídeos excedem as necessidades energéticas, a capacidade hepática de absorção, síntese, exportação e oxidação de AGI no fígado fica comprometida (70).

O excesso de glicose é captado por um processo de difusão facilitada, através do transportador GLUT2, um mecanismo independente da regulação da insulina. Essa glicose captada é estocada na forma de glicogênio, que funciona como reserva de glicose em períodos entre as refeições, por exemplo. Esse processo é chamado de glicogênese. Se os níveis de glicose estiverem baixos, o glicogênio é convertido em glicose – glicogenólise (Schreurs *et al.*, 2010).

O excesso de glicose é convertido em ácidos graxos no fígado, que são utilizados na síntese da principal fonte de estoque energético do organismo, os TAGs. Os ácidos

graxos provenientes da degradação dos TAGs são liberados na forma de AGI para serem utilizados mediante estímulos hormonais (Bernsmeier e Albano, 2017). Estes AGI chegam até o fígado através de três vias:

- a) fontes alimentares;
- b) Hidrólise de TAG em glicerol e AGI (lipólise), que ocorre no interior do tecido adiposo; e
- c) lipogênese *de novo* (LDN).

A LDN é caracterizada como uma via de conversão de fontes glicídicas para a síntese de ácidos graxos (Ameer *et al.*, 2014). A LDN é um processo modulado por fatores de transcrição ativados por insulina, o principal regulador da expressão da proteína de ligação ao elemento regulador dos esteroides 1c (SREBP-1c) (71). A SREBP-1c é um membro da família SREBP que controla a regulação transcricional de genes lipogênicos (Kim *et al.*, 2009). A sua ativação leva à conversão do piruvato em AGI no fígado e a um aumento da expressão de genes que ativam a síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, TAG e FL (Figura 12) (72). Estudos demonstram que uma ingestão dietética aumentada de lipídeos, o processo da LDN provoca um estado de lipotoxicidade, predispõe à RI e ao desenvolvimento de alterações hepáticas (9, 73).

Em condições normais, ao entrarem nos hepatócitos, os AGI provenientes da degradação dos TAG, podem seguir os seguintes caminhos:

- ✓ Beta-oxidação pelas mitocôndrias para gerar energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP);
- ✓ Convertidos em TAG acoplados às lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) e transportados e armazenados no tecido adiposo.

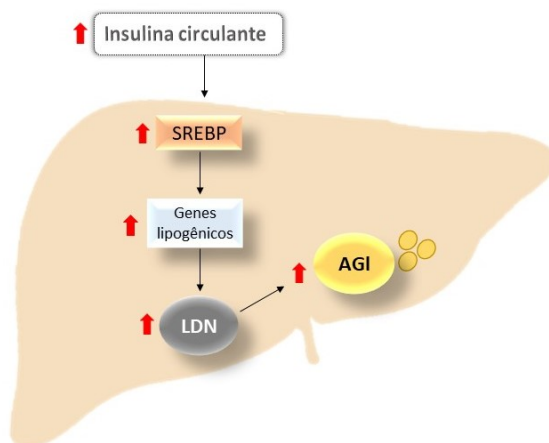
Quando ocorre alguma alteração dessa via, os AGI são armazenados no tecido hepático (74, 75). A beta-oxidação de AGs é uma reação que ocorre na matriz mitocondrial, e, tem como produto o Acetil-CoA. Esse nome é dado porque a oxidação ocorre no carbono beta do ácido graxo. O AG é inicialmente oxidado na membrana externa da mitocôndria pela enzima acil-CoA sintetase a uma forma ativa conhecida como acil-CoA. Porém, a membrana interna da mitocôndria é impermeável a acil-CoA. Então, esses grupos acila são transportados para mitocôndria através da sua associação com uma

molécula de carnitina. A molécula de acil-CoA de cadeia longa (LC-CoA) acoplado a CPT-1a entra na MME, onde é beta-oxidada (72, 76).

Na presença de concentrações elevadas de glicose e AGI, a enzima CPT-1a excede a sua capacidade funcional e, é inibida. Logo, ocorre aumento de Malonil-CoA, um intermediário na síntese de ácidos graxos e o principal modulador negativo da beta-oxidação. O Malonil-CoA é capaz de inibir a CPT1. Consequentemente, ocorre aumento da FAS, enzima limitante na biossíntese de ácidos graxos e catalisadora do último passo desta via. Quando este processo é inibido, ocorre aumento na concentração de LC-CoA no citoplasma, o que reduz a expressão de genes que podem retardar a beta-oxidação hepática (77).

Em síntese, podemos dizer que dietas com excesso de carboidratos e lipídeos, levam a desregulação do metabolismo de glicose e TAG, causando acúmulo de AGI hepático, o que se configura como gatilho para o acúmulo intra-hepático AG caracterizando um quadro de esteatose hepática.

Figura 12 – Esquema simplificado da lipogênese *de novo* hepática



Legenda: O esquema mostra de forma simplificada o mecanismo pelo qual o excesso de frutose e lipídeos. O excesso de insulina na corrente sanguínea, promovem o aumento de SREBP-1c, que regula genes lipogênicos. Como consequência, ocorre aumento da lipogênese *de novo* resultando no aumento da síntese de AGI acúmulo ectópico no tecido hepático resultando em esteatose hepática.

Fonte: A autora, 2021.

1.5.3.2 Doença Hepática Gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A DHGNA, do inglês “*Non-alcoholic fatty liver disease*” (NAFLD), é uma condição clínica de etiologia multifatorial, que se caracteriza pelo aumento da deposição de esteatose⁷ no fígado. A DHGNA tem características histopatológicas semelhantes às encontradas na hepatite alcoólica. O seu espectro constitui a presença de esteatose acompanhada de um estado inflamatório. Denomina-se DHGNA quando um indivíduo apresenta ausência de um histórico significativo do uso de álcool ou outra doença hepática conhecida (78).

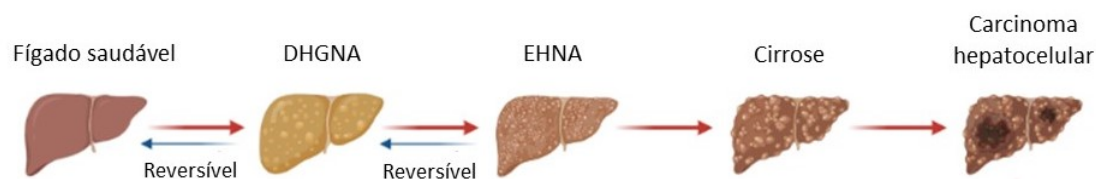
A prevalência é de aproximadamente 25% na população adulta, e é a causa mais comum das doenças crônicas do fígado no mundo (79). Está fortemente associada à obesidade (50-70% em pacientes), DM2, RI, dislipidemia, sedentarismo e hábitos alimentares inadequados, sendo considerada um importante problema de saúde pública, em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (78).

A esteatose hepática é assintomática e, embora não existam marcadores bioquímicos ou moleculares com sensibilidade específica para assegurar o diagnóstico da DHGNA, a alteração das enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) detectadas no exame laboratorial, e/ou evidências em exame de imagem nos permitem identificar o início de uma possível lesão hepática. Outro indicador importante para o diagnóstico da DHGNA é quando a deposição de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos, na forma de micro e/ou macrovesículas excede 5% do peso total do órgão ou quando a avaliação microscópica dos hepatócitos é igual ou superior a 5% de gordura (80).

A importância do diagnóstico precoce da esteatose hepática deve-se ao fato de que 28% dos pacientes evoluem para doenças hepáticas mais nocivas como a esteatohepatite. A esteatohepatite não alcoólica (EHNA), do inglês *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH), é considerada a forma clínica e histológica mais grave relevante da DHGNA por apresentar maior potencial de evoluir para formas mais graves da doença, como cirrose e carcinoma hepático, com alto risco da necessidade de transplante hepático (Figura 13) (78).

⁷ Esteatose hepática – segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia, caracteriza-se pelo acúmulo de lipídeos nos hepatócitos. Ocasionalmente pela síntese hepática e esterificação de AGI em triacilgliceróis aumentados acompanhado de redução do transporte dos AGI.

Figura 13 – Esquema da progressão da DHGNA



Legenda: A imagem mostra de forma a progressão da DHGNA no tecido hepático.

Fonte: A autora, 2022.

Atualmente, já se sabe que o excesso de AGI, colesterol e seus metabólitos, tem um papel importante na fisiopatologia da DHGNA por diversos mecanismos, e são capazes de induzir inflamação no tecido adiposo. O aumento de citocinas pró-inflamatórias levam a um comprometimento na sinalização de insulina e desenvolvimento da RI e agravo do DM2, além de ativar células de kupffer e estreladas, que induzem a deposição de colágeno e favorecem a gênese da fibrose hepática (81).

As citocinas estão envolvidas na comunicação intracelular. Estímulos como o acúmulo de lipídeos, induzem as células hepáticas a produzirem moléculas inflamatórias. As citocinas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da DHGNA através da estimulação da inflamação hepática (82), assim como, provoca danos na função mitocondrial e exacerbada o dano oxidativo hepatocelular (81).

1.6 Resistência à Insulina (RI)

A insulina é um hormônio polipeptídico secretada pelas células beta das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose sanguínea pós-prandial. Tem ação metabólica no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (83). São funções da insulina:

- a) Inibir a produção e liberação de glicose no fígado através do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise;
- b) Estimular o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio no fígado e músculo;

- c) Estimular a síntese de AG no fígado em períodos de excesso de carboidratos pelo aumento de SREBP-1;
- d) Na gliconeogênese, a insulina inibe a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle deste processo.

Metabolicamente, a insulina desempenha um papel central na captação da glicose para a manutenção da homeostase do fígado, aumento da síntese de AGs, redução da produção hepática de glicose (gliconeogênese e glicogenólise) e a lipólise (84).

Quando a insulina apresenta uma resposta metabólica inadequada, diminui os níveis circulantes de insulina nos tecidos como músculo, fígado e tecido adiposo, resultando um estado de hiperinsulinemia compensatória. Essa condição é definida como RI. A RI causa prejuízos na translocação de vesículas que contém GLUT8, diminuindo a capacidade dos tecidos de captar glicose para as células. Como consequência, a captação de glicose estimulada pela insulina nos tecidos citados é diminuída, levando a um estado hiperglicêmico (69).

Elevadas concentrações plasmáticas de glicose e AGs resultam no aumento da captação hepática de lipídeos, comprometendo a lipogênese e a β -oxidação mitocondrial, resultando em resistência periférica à insulina e hiperinsulinemia (69).

No fígado, a RI estimula a expressão de genes lipogênicos, enquanto reduz a lipólise nos adipócitos. Os mecanismos para o desenvolvimento da RI são caracterizados por alterações em certas etapas na sinalização da insulina, apresentando redução nas proteínas de substratos de receptor de insulina (IRS-1) e da serina/treonina proteína quinase 2 (Akt29), que influenciam diretamente na captação e translocação de glicose (GLUT2) por dependência de insulina.

A RI apresenta importante relevância na fisiopatologia da DHGNA. O excesso de AGL, induzido por dieta hiperlipídica, altera o metabolismo da glicose favorecendo o desenvolvimento da RI. Os AGs induzem a ativação e aumento da expressão e de TLR4,

⁸ GLUT – transportador de difusão facilitada. São membros de uma família de proteínas integrais de membrana transportadoras de glicose. Esses transportadores exercem importante função no controle das alterações na secreção de insulina estimulada pela glicose.

⁹AKT – é uma das 3 serina/treonina proteína quinase pertencente à família das AKT quinase que regulam processos incluindo o metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese. É responsável pela regulação da captação de glicose mediando a translocação induzida pela insulina do transportador de glicose GLUT4 para a superfície celular. A AKT também regula o armazenamento de glicose na forma de glicogênio.

desencadeando a ativação de vias inflamatórias que vão influenciar na captação de glicose pela sinalização de insulina (7).

1.7 Eixo entero-hepático

A compreensão da patogênese da DHGNA relaciona-se com a interação metabólica que o fígado mantém com os diversos tecidos corporais. Fatores genéticos e ambientais são fatores que contribuem para a gênese e progressão da DHGNA. Como fator ambiental, podemos destacar a dieta que leva a alterações no metabolismo energético, assim como, provoca alterações na microbiota intestinal (63, 85).

O fígado e o intestino estão anatomicamente ligados pela veia porta. Alterações na composição da microbiota intestinal promovem a translocação de LPS para a corrente sanguínea por comprometimento da via paracelular dos enterócitos (alteração na expressão das proteínas das zônulas oclusivas). Dessa forma, a sinalização do LPS, a partir de sua interação com o TLR4 hepático, promove inflamação no fígado e atua como um dos fatores envolvidos na gênese da DHGNA e também na sua progressão para formas mais graves como a EHNA (60).

Sendo assim, as alterações no perfil da microbiota intestinal têm mostrado afetar o metabolismo energético hepático tanto em camundongos quanto em humanos (63). Portanto, é indicado a realização de estudos mais detalhados a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nas alterações do eixo entero-hepático, o que o torna um alvo terapêutico para a DHGNA.

1.8 Tratamento da DHGNA

Atualmente, as recomendações para tratar a DHGNA abrangem mudanças no estilo de vida, e não há tratamento farmacológico que tenha sido aprovado para tratar esta condição (86). Alguns medicamentos têm sido apontados como promissor para reduzir a massa corporal, e, conseqüentemente, reduzem a adiposidade e RI. Dessa forma, emergem como uma alternativa para atenuar a esteatose hepática (87, 88); objetivo do tratamento é

atenuar os efeitos deletérios ocasionados pela DHGNA e inibir o desenvolvimento fibrótico que pode eventualmente levar à cirrose (89). Dentro desse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos do agonista seletivo PPAR- α (utilizado na clínica para tratar dislipidemia) e do inibidor da DPP-4 (utilizado na clínica para tratamento do DM2) no eixo entero-hepático e possíveis efeitos benéficos na atenuação da esteatose hepática num modelo de DHGNA induzido por dieta hiperlipídica ou rica em frutose em camundongos C57BL/6.

1.8.1 Receptores Nucleares (RN)

Os RN constituem uma superfamília de fatores de transcrição ativados por ligantes, que atuam em processos fisiológicos através da regulação da expressão de genes-alvo. Os RN se ligam a seus elementos responsivos na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros. A escolha pelo tipo de ligação ocorre em função do grupo em questão. A superfamília de receptores nucleares é formada por três famílias ou classes (90). São eles:

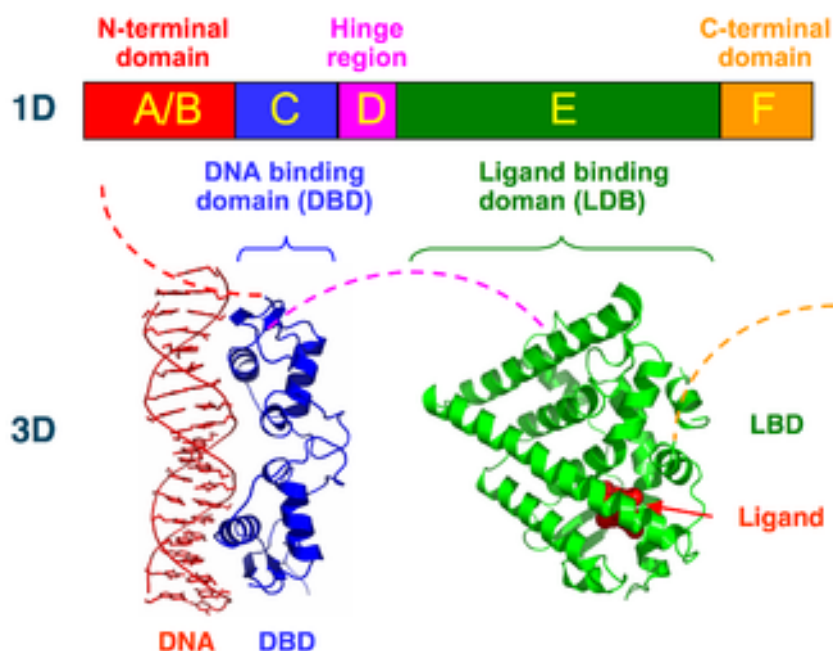
- a) Receptores de esteróides (receptores de progesterona (PR), estrogênio, glicocorticoide (GR), andrógeno (AR) e mineralocorticoide (MR)) – são os principais reguladores de processos metabólicos, reprodutivos e de desenvolvimento. Hormônios derivados do colesterol, como cortisol e estrogênio, regulam os receptores esteróides por meio de ligação direta. Os receptores esteróides reconhecem os elementos responsivos denominados elementos responsivos hormonais (HREs), que são repetições dos hexanucleotídeos de sequência AGGACA;
- b) Receptores hormonais: tireoideanos/retinóides (RAR); de vitamina D (VDR), ácido retinóico (ROR), farnesóides X (FXR); hormônios tireoideanos e ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) – esses receptores são regulados por uma variedade de moléculas de sinalização lipofílicas, incluindo hormônio tireoidiano, ácidos graxos, sais biliares e esteróides. Os receptores tireoideanos/retinóides reconhecem elementos responsivos contendo sequência AGGTCA. Este subgrupo reconhece estas sequências na forma de heterodímeros com o receptor de ácido X retinóico (RXR),

- c) Receptores órfãos: receptores retinóides X (RXR), fator 4 nuclear de hepatócitos (HNF4). O receptor RXR forma complexos heterodiméricos com muitos RN e é o único receptor do grupo com um ligante ativador conhecido, o ácido 9-cis retinóico;
- d) Receptor do fator nuclear de células germinativas (GCNF): essa proteína apresenta uma diferença crítica em seu ligand binding domain (LBD) e não contém a função ativadora HR (AF-H).

A ligação do receptor com seu ligante induz mudanças conformacionais dentro do receptor que, conseqüentemente, se liga a sequências específicas de DNA em todo o genoma. Uma vez ligada ao DNA, proteínas co-reguladoras, remodeladores de cromatina e a maquinaria transcricional geral são recrutados para o DNA para ativar ou reprimir a expressão do gene alvo (90). Em geral, todos os receptores nucleares apresentam uma estrutura de domínio modular comum. Cada subdomínio desempenham um papel específico na biologia do receptor, como representado na Figura 14. São eles:

- a) região N-terminal (A/B);
- b) domínio de ligação ao DNA (C ou DBD – *DNA binding domain*);
- c) região de ligação entre os domínios DBD e LBD (D), e
- d) região que contém o estimulador de ligação ao ligante (E/F ou LBD – *Ligand Binding Domain*).

Figura 14 – Composição estrutural dos receptores nucleares



Legenda: (A-1D) disposição linear dos domínios que compõem os receptores nucleares. (B-3D) disposição tridimensional dos domínios que compõem os receptores nucleares e a interação entre o receptor e seu elemento responsivo contido na fita de DNA.

Fonte: Disponível em https://pt.wikipedia.org/wiki/Receptor_nuclear

A região A/B é a mais variável em tamanho e composição da sequência de aminoácidos. Esta região apresenta atividade e promotor específico, sugerindo que ela seja responsável pela especificidade de ação entre as isoformas de receptores. A região C é um domínio curto, contendo normalmente menos que 100 aminoácidos. A estrutura dos DBDs de vários receptores nucleares, apresentam a capacidade de reconhecer sequências específicas de DNA, denominada elementos responsivos (91).

Entre o domínio central DBD e o domínio C-terminal, encontra-se um domínio curto e flexível, denominado *hinge* ou região de dobradiça. Levando-se em consideração que os receptores nucleares podem se ligar aos seus elementos responsivos como dímeros em repetições diretas, e mantendo sempre uma interface de dimerização no domínio C-terminal, foi proposto que a *hinge* serviria como o elo flexível entre os domínios LBD e DBD. Sabe-se que, mutações nesta região diminuem a interação entre o receptor tireoideano e alguns elementos responsivos (91).

Os elementos responsivos que são reconhecidos por dímeros são constituídos por dois estimuladores de reconhecimento dispostos de tal forma a permitir o adequado contato DNA – proteína. As diferentes formas através das quais o receptor pode se ligar a seu

elemento responsivo estão relacionadas às diferenças nos domínios de ligação ao DNA e no domínio de dimerização. A dimerização é um mecanismo que maximiza a afinidade, a especificidade e a diversidade da ligação do receptor ao DNA (90).

O domínio C-terminal também chamado do LBD é bastante estudado por ser um domínio de sinalização alostérica que não só se liga a ligantes, mas também interage com proteínas co-reguladoras tanto ativadoras como repressoras. São eles: os receptores de várias subfamílias, incluindo os receptores de: estrógeno, andrógeno, glicocorticoide, mineralocorticoide, ácido retinóico, ácido X retinóico, o PPAR e o receptor de hormônio tireoidiano, entre outros. É o responsável pela interação com o ligante, e do processo de dimerização dos receptores. Estes co-reguladores ligam-se ao LBD do receptor em diferentes contextos (90).

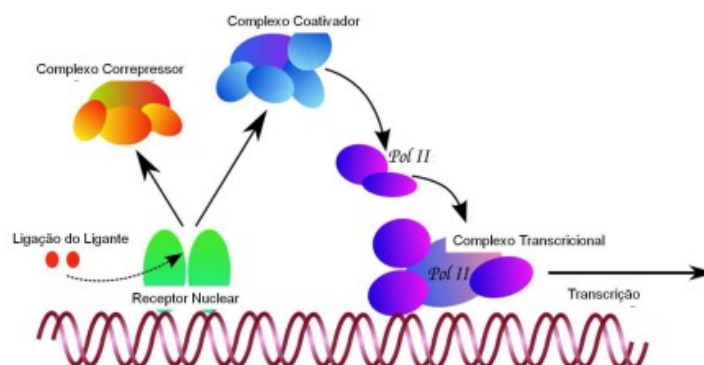
1.8.1.1 Mecanismo de ação dos RN

Os RNs modulam a transcrição através de mecanismos distintos que derivam na ativação ou repressão da transcrição gênica específica. Para ativar expressão gênica, os RNs interagem com seus elementos de resposta de DNA (90). A interação com o ligante resulta em dimerização dos receptores nucleares, que recrutam proteínas coativadoras¹⁰ e são translocados para o núcleo celular onde se ligam aos seus respectivos elementos responsivos. Uma vez formando o complexo composto pelo receptor nuclear dimérico, proteínas coativadoras e elemento responsivo no núcleo celular, a transcrição celular é iniciada (92).

Os RNs ligados ao DNA recrutam proteínas coativadoras que por sua vez recrutam enzimas modificadoras de histonas (histonas acetilases) que facilitam a abertura da cromatina no DNA, facilitando a transcrição gênica. Para reprimir expressão gênica, os RNs recrutam proteínas co-repressoras (Figura 15). Essas proteínas recrutam outras histonas desacetiladas que reverterem a acetilação das histonas e restringem o acesso da cromatina. Dessa forma, a transcrição do DNA é bloqueada e não ocorre a expressão gênica (90).

¹⁰ Os coativadores são responsáveis pela modificação da estrutura de histonas e da cromatina, gerando uma estrutura de DNA aberta para a transcrição.

Figura 15 – Esquema representativo da regulação dos complexos coativadores e correpressores



Legenda: O esquema ilustra a regulação exercida pelos complexos coativadores e correpressores sobre os receptores nucleares. Uma vez estabelecida a ligação do ligante com o receptor nuclear, o complexo correpresor se desliga, dando lugar para o complexo coativador, iniciando uma cascata de eventos que culminam na transcrição dos genes alvos do receptor nuclear.

Fonte: Adaptado de Lee, Kim et al., 2012.

1.8.1.2 PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma) e seu mecanismo de ação

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes pertencentes à superfamília de receptores nucleares, sendo encontrados em diversas espécies animais. Possuem três isoformas já descritas na literatura consideradas significativas (93). São elas:

- a) PPAR- α (alfa ou NR1C1) – 468 resíduos de aminoácidos;
- b) PPAR- β/δ (beta/delta ou NR1C2) – 441 resíduos de aminoácidos;
- c) PPAR- γ (gama ou NR1C3) – 479 resíduos de aminoácidos.

Os PPARs foram identificados inicialmente em roedores na década de 90, e, desde então, suas propriedades fisiológicas vêm sendo pesquisadas. A designação do nome PPAR se deve ao fato da ativação do PPAR- α , primeiro receptor descoberto, promover a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores. Os peroxissomos são organelas responsáveis por reações de oxidação ligadas ao metabolismo energético e sua propagação resulta em hepatomegalia e carcinogênese em roedores, porém, esses efeitos não foram observados em humanos (93, 94).

Os PPARs são considerados sensores metabólicos, sensibilizados por carboidratos e lipídeos. São capazes de induzir a expressão gênica de modo a promover ações

adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando preferencialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina. Além das ações metabólicas, têm sido demonstrados importantes efeitos em diversos processos fisiológicos, tais como no desenvolvimento e diferenciação celular e em processos inflamatórios (95).

Eles são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos à proliferação peroxissomal (PPREs). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR alfa, beta/delta ou gama) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes alvo (Figura 16A) (96).

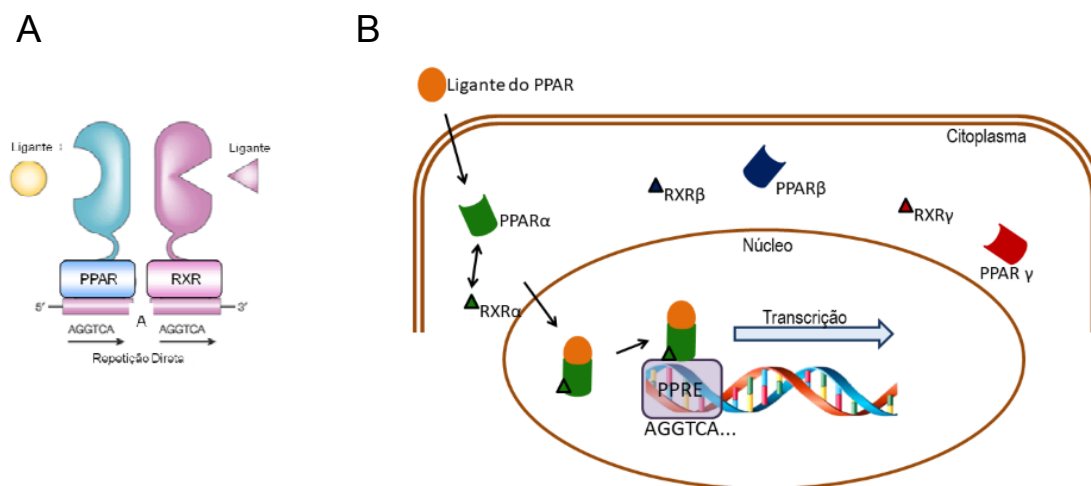
Os PPARs se expressam de forma distinta em diferentes tecidos. A isoforma do PPAR- α é expressa, preferencialmente, nos órgãos que apresentam significativo metabolismo de ácidos graxos, como: tecido adiposo marrom, fígado, rins, coração e músculo. A isoforma PPAR- β/δ é expressa na maioria dos tecidos, embora sua expressão seja relativamente mais baixa no fígado em comparação ao PPAR- α ou PPAR- γ . Este receptor está associado à pele, intestinos, placenta, tecido adiposo, cérebro e músculo esquelético. As duas isoformas do receptor PPAR- γ são encontradas no tecido adiposo marrom e branco, promovendo a diferenciação dos adipócitos e o estoque de lipídeos. Também está presente no intestino, células vasculares e células do sistema imune (9).

Os PPARs regulam a transcrição através de mecanismos distintos. A transcrição pode ser ativada de forma dependente de ligante, através da ligação ao DNA, denominada de transativação ligante dependente. Neste mecanismo, o recrutamento de complexos de coativadores modificam a cromatina e facilitam a associação da maquinaria transcricional ao promotor dos genes alvos (97).

A regulação transcricional realizada pelos PPARs se dá através da heterodimerização dos isótopos com o RXR e, como tal, podem regular a expressão gênica quer em ligação de PPAR quer em RXR. Os heterodímeros PPAR / RXR se ligam a PPREs (9). Os PPREs são formados no DNA alvo por repetições diretas com a sequência AGGTCA, espaçamento de um nucleotídeo entre as duas metades. A Figura 16B ilustra o mecanismo de ação dos PPARs. O PPAR e o RXR ligam-se aos meio-sítios 5' e 3' do elemento responsivo, respectivamente, sendo que a região 5' do PPRE contribui para a seletividade de ligação de cada isoforma pertencente à subfamília (98). Os PPAR estão relacionados ao controle de diversos genes, e, conseqüentemente, envolvidos em diversos

processos metabólicos, como resistência à insulina, aterosclerose, processos tumorais, entre outros.

Figura 16 – Esquema representativo do heterodímero formado entre os receptores PPAR e RXR e da de ativação dos PPARs



Legenda: O esquema ilustra o heterodímero formado entre os receptores PPAR e RXR (A); Os PPARs encontram-se inativos no citoplasma assim como o RXR. Após a ação de um ligante, PPAR e seu respectivo RXR se heterodimerizam ligando-se ao seu respectivo PPRE para iniciar a transcrição de seus genes alvo (B).

Abreviações: PPAR: receptor ativador de proliferação peroxissomal; RXR: receptor x retinóide; PPRE: elemento responsivo ao PPAR.

Fonte: Adaptado Lee et al., 2012.

1.8.1.3 PPAR e seus ligantes

Os PPARs apresentam a capacidade de alterar os padrões de lipídeos/ácidos graxos em atividade metabólica (98). A diversidade de funções desempenhadas pelos receptores da família de PPAR estão relacionadas à capacidade desses receptores de agregar diferentes tipos de ligantes no seu sítio de ligação. Sendo assim, as três isoformas apresentam a capacidade de ligar-se a muitos ligantes endógenos, relacionados ao metabolismo lipídico como ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, fosfolipídeos e produtos de seu metabolismo (90).

Os PPARs vêm mostrando um potencial terapêutico nas desordens metabólicas. Portanto, a busca por ligantes, seja sintético ou de origem natural, capazes de interagir com esta subfamília de receptores nucleares têm aumentado consideravelmente. A primeira classe de fármacos reconhecidos como ligantes de PPAR foram os fibratos (99).

O desenvolvimento dos PPARs ocorreu em função da observação de que certos ácidos eram capazes de promover hipocolesteremia em ratos e humanos. Nos anos 70 e 80, diversos fibratos, como gemfibrozil e fenofibrato, foram identificados com a capacidade de diminuir os níveis séricos de lipídeos. Somente nos anos 90, a segurança e mecanismo de ação associados aos fibratos foi concluída, quando foi aprovada a utilização dos fibratos como recurso terapêutico para dislipidemia, através da ativação do PPAR- α (91).

Na busca pela melhora da ação dos fibratos, foram identificadas as glitazonas, que ativa a isoforma γ . Diferente dos fibratos, que são capazes de normalizar níveis de lipídeos, as glitazonas apresentam ação hipoglicemiante, aumentando a sensibilidade à insulina nos órgãos alvos e reduzindo os níveis de ácidos graxos e glicose em pacientes com DM2. Além das glitazonas, as sulfoniluréias constituem outra classe de fármacos hipoglicemiantes, com ação em PPAR- γ , encontra-se disponível para uso clínico (100).

Diversos trabalhos demonstram que compostos sintéticos e/ou naturais são capazes de ativar um ou mais isoformas de PPAR. Dentro desse contexto, ainda são necessários estudos que corroborem com os achados já descritos na literatura sobre os benefícios da utilização do PPAR para o tratamento de dislipidemia, obesidade e doenças hepáticas.

1.8.1.4 Agonista PPAR- α como agente terapêutico

O PPAR- α foi o primeiro receptor descoberto, identificado inicialmente em sapos, e, posteriormente em ratos, coelhos e depois humanos. Em humanos, este receptor foi mapeado no cromossomo 22q12-13.1, e é expresso em tecidos metabolicamente ativos como fígado, rim, coração, músculo estriado esquelético e gordura marrom (101, 102).

O PPAR- α é um receptor que possui agonistas sintéticos e naturais. Dentre os agonistas naturais, podemos destacar os AGs saturados e insaturados como o ácido palmítico, oleico, linoleico, araquidônico e eicosapentaenoico, e os leucotrienos que são importantes mediadores inflamatórios (103).

Em relação aos agonistas sintéticos, incluem a classe dos fibratos, que são medicamentos utilizados no tratamento das hiperlipidemias. A ativação dos PPAR- α com o uso dos fibratos está relacionada com redução da progressão da aterosclerose, o aumento de lipoproteínas de alta densidade, como o HDL (*high density lipoprotein*), e redução dos triacilgliceróis plasmáticos e da lipoproteína de baixa intensidade, LDL (*low density lipoprotein*) (104).

Apesar dos efeitos benéficos, o uso dos fibratos está associado ao aumento dos níveis de creatinina sérica, o que o torna limitante para pacientes com doença renal crônica (Jun *et al.*, 2012). Além disso, sua administração a longo prazo induz carcinogênese hepática em roedores (105), fenômeno não visto em humanos (106).

A utilização de agonistas dos receptores PPARs tem sido descrita na literatura por seus efeitos benéficos em reduzir a deposição lipídica no TAB, a massa corporal e aumentar a β -oxidação hepática contribuindo para minimizar a esteatose. O PPAR- α apresenta resultados significativos por estimular a transcrição de genes ligados à síntese de proteínas que participam deste processo, como o CPT-1 que é intensamente aumentado com a ativação deste receptor (107).

Outros agonistas sintéticos do PPAR- α foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e estão disponíveis para comercialização e são amplamente utilizados no tratamento de dislipidemias. São eles: Gemfibrozila, Clofibrato e Ciprofibrato. Já está descrito na literatura que o Bezafibrato é capaz de aliviar os efeitos da esteatose hepática em camundongos alimentados com uma dieta deficiente em metionina e colina, principalmente através da ativação de PPAR- α que eleva, por exemplo, os níveis de RNA mensageiro da CPT-1 (108, 109).

Igualmente, o Bezafibrato diminui o número de células de Ito no tecido hepático e diminui a concentração de RNA mensageiro de TNF- α , uma importante citocina inflamatória (110, 111). Sabe-se que a ativação de Células de Ito é um dos passos para o desenvolvimento da cirrose hepática, já que elas se diferenciam em miofibroblastos e iniciam a síntese de colágeno tipo I (112).

O PPAR- α tem demonstrado eficácia na redução de massa corporal, no alívio da RI, redução dos níveis plasmáticos de TAGs, formação de adipócitos bege (21), redução significativa da esteatose hepática (107), e reversão do *whitening* no TAM. Além disso, aumento de HDLc, modificações no tamanho e na densidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês “low density lipoprotein”) e atividade antiinflamatória são frequentemente atribuídas ao uso de agonistas PPAR-alfa (96).

Os AGs, ligantes endógenos para PPARs, expressam atividades agonistas em concentrações micromolares em comparação com agonistas sintéticos como a clássica Pioglitazona. O desenvolvimento de novos ligantes com ativação equilibrada das diferentes isoformas, agonismo parcial, menor potência, maior eficácia e segurança, é essencial para maior conhecimento das funções fisiológicas e fisiopatológicas moduladas pelas isoformas de PPAR, seus mecanismos e características farmacodinâmicas (113, 114).

1.9 Incretinas

As incretinas são hormônios secretados pelo trato gastrointestinal. As incretinas GIP (polipeptídeo insulínico dependente de glicose) e GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon) pertencem a uma superfamília do peptídeo glucagon. Indivíduos saudáveis em jejum apresentam baixas concentrações plasmáticas das incretinas. A liberação de GIP e GLP-1 é iniciada após o estímulo da entrada de nutrientes no intestino, e tem o seu pico em aproximadamente 1 hora após a ingestão alimentar (115).

O GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos, clivado do seu peptídeo precursor, ProGIP e secretado a partir de células K localizadas principalmente no duodeno e jejuno proximal. O GLP-1 é um peptídeo de 30 a 31 aminoácidos, sintetizado e secretado por células L, encontradas principalmente no íleo e no cólon. Também é produzido no sistema nervoso central (SNC), predominantemente no tronco encefálico, de onde é transportado por todo o cérebro para provocar ações metabólicas, cardiovasculares e neuroprotetoras (116).

O GLP-1 encontra-se no estado inativo em concentrações baixas de glicose. A secreção basal de GLP-1 pelas células intestinais é rapidamente aumentada após ingestão de nutrientes, sobretudo, por dietas ricas em carboidratos e lipídeos. Uma vez liberadas, as incretinas estimulam a secreção de insulina das células β no pâncreas no período pós-prandial, além de suprimir a liberação de glucagon de forma dependente da concentração de glicose, desacelerando o esvaziamento gástrico, e, conseqüentemente, melhorando a sensibilidade à insulina (117, 118).

As incretinas são responsáveis por 60-65% da secreção de insulina pós-prandial, o chamado efeito incretina. Em indivíduos saudáveis com tolerância oral normal à glicose, o GIP parece mediar o volume do efeito incretina. No entanto, possuem uma meia vida curta,

pois são rapidamente degradadas pela enzima endógena DPP-4 (119). Em indivíduos com DM2, o pâncreas não responde mais ao GIP e é pouco sensível ao GLP-1, com isso, o efeito das incretinas está diminuído ou ausente (115).

O DM2 está associado a uma redução da capacidade do intestino de secretar GLP-1. Dessa forma, a administração de medicamentos hipoglicemiantes com GLP-1 tem mostrado resultados positivos como droga hipoglicemiante por produzir o prolongamento do efeito insulínico (119). A terapêutica recomendada para tratamento do DM2 consiste na administração do GLP-1 em associação com outros hipoglicemiantes orais. Quando estes não são suficientes para atingir o equilíbrio metabólico preconizado para cada paciente, é indicado a utilização da insulina (115).

O GLP-1 apresenta homologia de 50% a 97% com GLP-1 humano (116). Atualmente, a linagliptina, um medicamento hipoglicemiante inibidor da DPP-4, é utilizado em humanos como monoterapia ou combinada com outras drogas para manter os níveis glicêmicos. Diferente das outras gliptinas, a linagliptina tem uma excreção predominante pelas fezes, fato esse que contribui para utilização em pacientes com insuficiência renal sem ajuste de dose (120).

Os receptores de GLP-1 estão presentes em diversos tecidos como: pâncreas, pulmões, coração, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, rins e SNC (115).

1.9.1 Inibição da Dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)

A DPP-4 é uma glicoproteína transmembrana que cliva e inativa um grande número de quimiocinas e hormônios peptídicos envolvidos na regulação do sistema imunológico, inferindo um papel para DPP-4 na patogênese da inflamação. Recentemente, essa enzima foi descrita como uma adipocina com ação autócrina e parácrina na RI (121, 122).

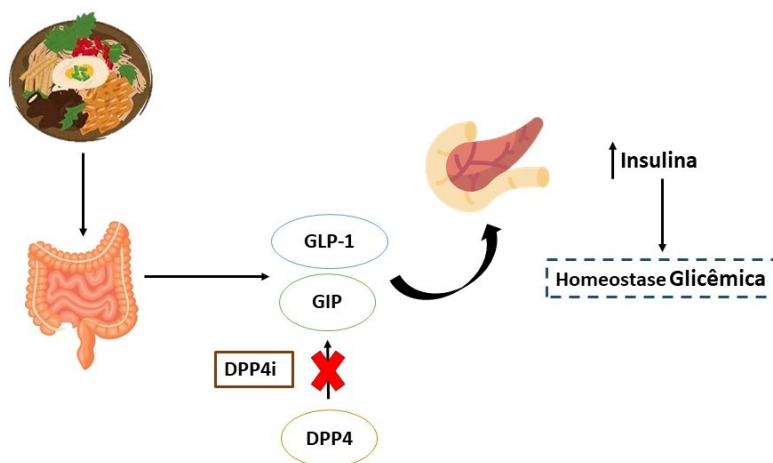
Fisiologicamente, o GLP-1 é rapidamente degradado pela DPP-4, resultando em meia-vida plasmática de aproximadamente 2 minutos. O inibidor da DPP-4 está envolvido na inativação da enzima que cliva os hormônios incretinas GLP-1 e GIP. Ele suprime a rápida degradação de GLP-1, tornando essas incretinas mais disponíveis, o que resulta em aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas e, conseqüentemente, ocorre redução dos níveis sanguíneos de glicose (Figura 17). Concomitantemente, ocorre inibição

da secreção de glucagon nas células alfa pancreáticas, resultando em redução da produção hepática de glicose, promovendo assim a homeostase no controle glicêmico (121).

O medicamento linagliptina é um inibidor da enzima DPP-4. A inibição da DPP-4 leva ao prolongamento do aumento dos níveis circulantes da incretina GLP-1, o que torna uma alternativa terapêutica para pacientes portadores de RI e DM2, visto que a sua utilização amplia tempo de sinalização pancreática, proporcionando uma maior liberação de insulina pós-prandial (118).

Os efeitos do GLP-1 sobre as células β geralmente são agudos, subagudos e crônicos. Na forma aguda, o GLP-1 amplia a secreção da insulina dependente da glicose, ao passo que os efeitos subagudos incluem a estimulação da transcrição da pró-insulina e a biossíntese da insulina. Em relação aos efeitos crônicos, podemos destacar a estimulação da proliferação de células β e neogênese a partir das células ductais precursoras, além da maior expressão de GLUT-2 (118).

Figura 17 – Esquema representativo da inibição da DPP-4 pelas incretinas intestinais



Legenda: Dipeptidil peptidase 4 (DPP-4); Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e Peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).

Fonte: A autora, 2022.

1.9.2 Efeitos pleiotrópicos do GLP-1 na Obesidade e DHGNA

Já existem relatos na literatura dos efeitos pleiotrópicos do GLP-1. Sabe-se que o aumento da disponibilidade de GLP-1, mediado pela inibição de DPP-4, é responsável não apenas pela regulação dos níveis de glicose, mas também desempenha um papel benéfico no metabolismo lipídico e sobre o TGI (120).

O quadro de diabetes pode estar associado a comorbidades como a obesidade, RI, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas (118). A DHGNA, é um fator de risco para a gênese e progressão da esteatohepatite não alcoólica e fibrose, e está presente em dois terços dos pacientes diabéticos, onde a prevalência desta condição é cinco vezes maior do que em pacientes não diabéticos (123). Em estudo com camundongos transgênicos para DPP-4 no fígado, acometidos de DHGNA, exibiram atividade plasmática elevada de DPP-4, o que está associado a níveis reduzidos de GLP-1 induzido pelo aumento glicêmico (115).

Em estudos com ratos alimentados com dieta hiperlipídica mostraram que a administração de GLP-1 foi associada a uma melhora na beta-oxidação de ácidos graxos e sensibilidade à insulina no fígado. Esse feito resultou em aumento na atividade de PKA, AKt e fosforilação de AMPK, resultando em aumento da atividade do PPAR- α (124). Os efeitos protetores do GLP-1 na esteatose hepática foram demonstrados em camundongos obesos induzidos por dieta. A sitagliptina, um inibidor de DPP-4, mostrou uma redução nos níveis de TAGs hepático e expressão de genes lipogênicos e gliconeogênese em camundongos (125).

Estudos experimentais com camundongos mostraram redução da RI, mitigação da esteatose hepática e polarização de macrófagos para o fenótipo M2, favorecendo a secreção de adipocinas anti-inflamatórias e a adiponectina, além de ativar fatores de transcrição envolvidos no metabolismo oxidativo de lipídeos, como os PPARs após tratamento com linagliptina (14, 126). Além dos efeitos benéficos sobre o tecido hepático, o inibidor da DPP-4 linagliptina também apresenta uma resposta positiva relacionada com a obesidade. O aumento dos níveis de GLP-1 induz o escurecimento do TAB de camundongos (13).

Outro estudo mostrou que altas doses de linagliptina é capaz de induzir a termogênese adaptativa e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Macrófagos no estado de ativação M2 estão diretamente relacionados ao aumento da biogênese mitocondrial devido

à inibição do NF- κ B e a consequente indução do PGC1- α (127). Vale ressaltar que a biogênese mitocondrial é um fator chave para indução de adipócitos beiges (128).

A obesidade e as doenças hepáticas desencadeiam uma inflamação de baixo grau que ativa o sistema imune inato com subsequente recrutamento de células imunes, como os macrófagos e células T, para os tecidos metabólicos. A ativação de macrófagos é fundamental no processo inflamatório induzido por obesidade (129). Sendo assim, é possível admitir que a inibição da DPP-4 tenha efeitos benéficos em relação a função nos seus órgãos alvo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da ativação do agonista PPAR-alfa e do inibidor da DPP-4 (isolados ou em associação) sobre o eixo entero-hepático, inflamação e metabolismo energético hepático de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos do agonista PPAR-alfa e/ou inibidor da DPP-4, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose, sobre os seguintes parâmetros:
- b) Massa corporal, ingestão alimentar, tolerância oral à glicose e níveis plasmáticos de LPS;
- c) Remodelamento estrutural hepático e densidade de volume de esteatose hepática;
- d) Ultraestrutura intestinal, com ênfase na integridade da barreira intestinal a partir da observação do complexo juncional;
- e) Composição filogenética da microbiota intestinal e possível ligação com a gênese e progressão da DHGNA;
- f) Expressão gênica de fatores relacionados à inflamação, beta-oxidação e lipogênese hepática;
- g) Expressão gênica de fatores ligados à inflamação dos enterócitos e integridade da barreira intestinal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Modelo Experimental 1 - Dieta rica em Frutose - Modulação do eixo entero-hepático em camundongos alimentados com frutose: um papel para o PPAR-alfa e a linagliptina

3.1.1 Materiais e métodos

3.1.1.1 Animais e Dieta: Camundongos machos adultos C57BL/6 foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade ($60 \pm 10\%$), com livre acesso a água e dieta, em gaiolas livres de patógenos. O ambiente foi submetido a ciclos claro-escuro de 12/12h e renovação de ar (15min/h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do “*National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número 041/2018).

3.1.1.2 Protocolo Experimental: Cinquenta camundongos de três meses de idade foram usados neste estudo. Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos nutricionalmente diferentes durante doze semanas:

a) Grupo controle (C) – animais que receberam dieta padrão para roedores durante todo o período experimental ($n = 10$);

b) Grupo rico em frutose (HFRU) – animais que receberam dieta rica em frutose para roedores (50% da energia proveniente de frutose) ($n = 40$);

Após doze semanas, os animais do grupo HFRU foram subdivididos de acordo com o tratamento, compondo os grupos:

c) HFRU – continuou recebendo a dieta HFRU ($n = 10$);

d) HFRUA – tratado com o agonista PPAR-alfa (WY14-643, Sigma-Aldrich, 3,5 mg/kg de massa corporal) incorporado à dieta HFRU ($n = 10$);

e) HFRUT – tratado com Trayenta (Linagliptina, Boehringer Ingelheim, 15 mg/kg de massa corporal) incorporado à dieta HFRU (n = 10);

f) HFRUC – foi tratado com a combinação do agonista PPAR-alfa e Trayenta (mesmas doses dos grupos em monoterapia) incorporados à dieta HFRU (n = 10).

O protocolo experimental foi realizado por 17 semanas. As dietas experimentais foram produzidas pela PragSoluções (<http://www.pragsolucoes.com.br/>, Jaú, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN 93M) (130). As análises de tolerância oral à glicose, ELISA e RT-PCR foram realizados em seis animais por grupo, enquanto a estereologia foi realizada em cinco animais por grupo.

3.1.1.3 Consumo Alimentar e Energético, Consumo Hídrico e Massa Corporal (MC): O consumo alimentar foi medido diariamente subtraindo-se a quantidade de dieta oferecida para cada grupo no dia anterior pelo restante verificado no dia seguinte. A ingestão energética foi calculada como o produto do consumo alimentar pela energia oferecida por 1g de cada dieta (em kJ). A ingestão hídrica foi medida e registrada duas vezes por semana através da diferença entre a quantidade ofertada (200mL de água) para o restante do dia anterior, verificada em uma proveta. Durante todo o período experimental, a MC foi avaliada semanalmente.

3.1.1.4 Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG): Uma semana antes do sacrifício, foi realizado o TOTG, no qual a glicemia foi medida com um glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) após jejum de 6 horas (tempo 0) e gavagem orogástrica de solução de glicose (2g/kg de massa corporal), nos tempos 15, 30, 60 e 120 min.

3.1.1.5 Sacrifício: Os camundongos foram submetidos a jejum de 6 h e, em seguida, submetidos à anestesia profunda com cetamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). O fígado e o intestino foram cuidadosamente dissecados, pesados e seguiram os protocolos das diferentes técnicas. As porções do intestino foram coletadas de acordo com a indicação do Apêndice 1. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, e o plasma foi obtido após centrifugação para realização de ELISA para GLP-1 (Kit multi-espécies GLP-1 ELISA Cat. #EZGLP1T-36K, Millipore, Missouri, EUA) e LPS (multi-espécies Kit LPS ELISA Cat. #SEB526Ge-96T, Cloud-Clone Corp., Katy, EUA). Os coeficientes de variação (CV%) inter-ensaio e intra-ensaio caíram dentro do intervalo recomendado para

GLP1: CV% inter-ensaio, 5,05% (recomendação do fabricante <12%), CV% intra-ensaio, 1,46% (recomendação do fabricante 1-2%); e para LPS: CV% inter-ensaio, 11,30% (recomendação do fabricante <12%), CV% intra-ensaio 2,03% (recomendação do fabricante <10%).

3.1.1.6 Estereologia hepática: Fragmentos de fígado de todos os lobos hepáticos foram fixados em formalina tamponada Millonig (pH 7,2 - 7,4), e posteriormente desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seccionados (5 µm de espessura) e corados com hematoxilina e eosina. Foram obtidas fotomicrografias digitais de tecido hepático (microscópio Leica DMRBE, Wetzlar, Alemanha, câmera digital Infinity Lumenera, Ottawa, ON, Canadá). Foram analisados cinco animais por grupo e dez imagens aleatórias não consecutivas por animal. A densidade de volume da esteatose hepática (V_v [est]) foi estimada por contagem de pontos: V_v [est, fígado] = P_p [est, fígado] / PT (P_p é o número de pontos que atingem as inclusões lipídicas, PT é o total de pontos de teste), uma técnica tão reprodutível e confiável quanto a dosagem do triacilglicerol hepático para estimar o grau de esteatose hepática (15). As imagens foram analisadas com STEPanizer (www.stepanizer.com) usando uma área teste com 36 pontos (16).

3.1.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM): Fragmentos de ceco (1 mm³, pelo menos três animais por grupo) foram fixados em glutaraldeído 2,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por duas horas em temperatura ambiente. As amostras foram então fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e incorporados em resina epóxi (48h a 60/70 °C). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram cortados em um ultramicrotomo (Leica UltraCut ultramicrotomo, Leica, Wetzlar, Alemanha). As seções foram transferidas para grades de 200 mesh, contrastadas com 5% de acetato de uranila por 30 min e 2% de citrato de chumbo por 3 min, depois examinadas usando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL/JEM-1200 EX (Instituto Nacional de Bioquímica, Ciência e Tecnologia, Tecnologia de Bioimagem - CENABIO – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil).

3.1.1.8 Imunofluorescência hepática (REELINA, ALFA-AML, PLIN-2): Os cortes do fígado foram desparafinizados e hidratados e, em seguida, foi realizada a recuperação antigênica utilizando tampão citrato, pH 6,0 a 60 °C por 20 min, bloqueio com cloreto de amônio, glicina 2%, seguido de incubação por duas horas com os seguintes anticorpos primários (diluídos em 1% PBS/BSA na concentração de 1:100): anti-alfa-actina de músculo liso (alfa-AML, ab7817, monoclonal, desenvolvido em camundongo, Abcam); anti-REELINA (ab78540, monoclonal, desenvolvido em rato, Abcam); anti-perilipina 2 (PLIN2, CSB-PA920084, monoclonal, desenvolvido em coelho, Cusabio). Posteriormente, as amostras foram tratadas com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa-488 ou Alexa-546 (anti-IgG de camundongo, Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por uma hora, depois lavado em PBS, seguido de coloração dos núcleos com DAPI. As lâminas foram montadas com SlowFade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). As imagens foram captadas usando um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Nikon Confocal Laser Scanning Microscope, modelo C2, Nikon Instruments, Inc., Tóquio, Japão).

3.1.1.9 RT-PCR

Fígado: O RNA total foi extraído de cerca de 50 mg de tecido hepático usando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados, seguido de centrifugação (1200 g por 10 min a 4 °C), e a porção de extrato de RNA foi reservada. A esta porção foi adicionado 500 µL de isopropanol, que reagiu por 10 min para o RNA precipitar e depois foi centrifugado (1200 g por 10 min a 4°C). O isopropanol foi removido, o *pellet* formado foi ressuspensão com 500 µL de etanol 75% e depois centrifugado (1200 g por 5 min a 4°C). O etanol foi removido e o *pellet* ressuspensão em 20 µL de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas a banho seco (50°C por 5 min) e quantificadas em equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Para transcrição de RNA em DNA complementar (cDNA), 1,0 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). A síntese de cDNA de primeira fita foi realizada usando primers Oligo (dT) para RNAm de transcriptase reversa e Superscript III (ambos da Invitrogen). A RT-PCR foi realizada usando um termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e o mix SYBRGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A beta-actina foi usada para corrigir a expressão dos genes alvo, e as sequências dos primers são encontradas no Quadro 1. Todos

os símbolos dos genes estão em *itálico* (a primeira letra maiúscula) e os símbolos de proteínas em maiúsculas (131).

Quadro 1 – Sequências direta e reversa de primers RT-qPCR – Fígado

Gene	<i>Primers</i>	
	5'-3'	3'-5'
<i>Ppar-alfa</i>	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
<i>Ppar-gamma</i>	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
<i>Cpt-1a</i>	GCAGAGCACGGCAAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
<i>Fas</i>	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
<i>Srebp-1c</i>	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Beta-actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

Abreviações: Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR), PPAR-alfa (PPAR- α), PPAR-gama (PPAR- γ), carnitina palmitoil transferase I A (CPT-1a), sintase de ácido graxo (FAS), proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c), receptor toll-like 4 (TLR4).

Intestino: O RNA total foi extraído de cerca de 70 mg de tecido intestinal usando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de centrifugação (12.000 g por 15 min a 4°C), e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada, e 500 μ L de isopropanol foram adicionados durante 15 min para o RNA precipitar, e depois centrifugado (12.000 g por dez min a 4°C). O isopropanol foi removido, o pellet formado foi ressuspensão com 500 μ L de etanol 70% (gelado) e depois centrifugado (10.000 g por 5 min a 4 °C). O etanol foi removido e o pellet ressuspensão em 50 μ L de água deionizada (MilliQ). A partir deste ponto, o protocolo foi idêntico ao descrito anteriormente para RT-PCR hepático. O gene *Gapdh* foi usado para corrigir a expressão do gene alvo e as sequências de primers são detalhadas na Quadro 2.

Quadro 2 – Sequências direta e reversa de primers RT-qPCR – Intestino

Gene	<i>Sequência de Primers</i>	
	5'- 3'	3'-5'
<i>Dpp-4</i>	TGGTACACGGATGAAGACCA	GAA ATGGCTCATGTGGGA AT
<i>Zo-1</i>	AGGACACCAAAGCATGTGAG	GGCATTCTGCTGGTTACA
<i>Tlr4</i>	TCTGGGTAGCGATGAACATTT	AGAGTCAGGTGATGGATGTCG
<i>Mucin</i>	GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA	ATGCCCACCTCCTCAAAGAC
<i>Gapdh</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

Abreviações: Dipeptidil peptidase-4 (Dpp-4); Zonula occludens-1 (Zo-1); receptor 4 do tipo Toll (Tlr4); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh); Mucin (Mucina).

3.1.1.10 Amplificação de 16S rDNA PCR: As fezes presentes no ceco de camundongos foram utilizadas para extração de DNA microbiano utilizando o kit comercial (mini kit de fezes QIAamp Fast DNA, Qiagen, Düsseldorf, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação, pureza e concentração de DNA foram analisadas usando Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e eletroforese horizontal (gel de agarose a 1%). Ensaio de PCR quantitativo em tempo real foram usados para a quantificação relativa de filos específicos de microrganismos (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*) na microbiota fecal de intestinos de camundongos através da detecção de genes 16S rRNA. Para realizar a quantificação relativa, a abundância dos diferentes filos foi normalizada pelo $\Delta\Delta C_t$ da quantidade total de bactérias presentes na amostra (17). Os indicadores utilizados estão descritos na Quadro 3.

Quadro 3 – Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal

Filo ou Classe	Iniciadores
<i>Eubacteria (All Bacteria)</i>	F[5'-ACTCCTACGGGAGGCAGAGT-3'] R[5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3']
<i>Bacteroidetes</i>	F[5'-CRAACAGGATTAGATACCCT-3'] R[5'-GGTAAGGTTCTCGCGTAT-3']
<i>Firmicutes</i>	F[5'-TGAAACTYAAAGGAATTGACG-3'] R[5'-ACCATGCACCACCTGTC-3']
<i>Actinobacteria</i>	F[5'-TACGGCCGCAAGGCTA-3'] R[5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3']
<i>Class-γ-Proteobacteria</i>	F[5'-TCGTCAGCTCGTGTGTGA -3'] R[5'-CGTAAGGGCCATGATG-3']

3.1.1.11 Análise dos dados: Os dados foram expressos em média e desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos nas primeiras 12 semanas utilizaram o teste t de Student e correção de Welch. Após o tratamento, os dados foram analisados pelo teste de Brown-Forsythe e correção de Welch one-way ANOVA com o teste post-hoc de Dunnett T3. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo (GraphPad Prism versão 8.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.1.2 Resultados

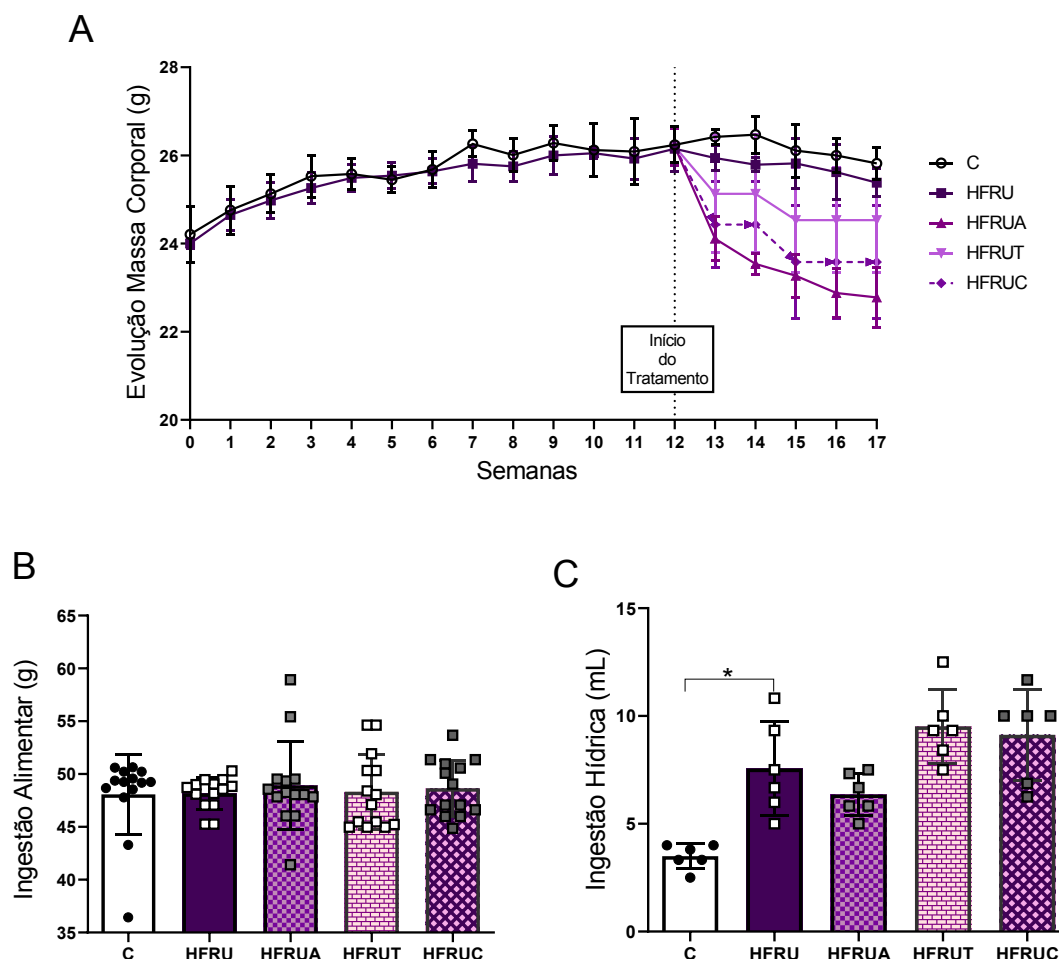
3.1.2.1 Ingestão de Alimentos e Energia, Ingestão Hídrica e Massa Corporal (MC)

Os animais dos grupos C e HFRU não apresentaram diferença em relação à MC no início do experimento (semana zero). No entanto, após o início do tratamento (13ª semana), os grupos tratados tiveram uma redução na MC em comparação com suas

contrapartes (-7 % para HFRUA vs. HFRU; -3 % para HFRUT vs. HFRU; e -6 % para HFRUC vs. HFRU), o que durou até o final do experimento. Estes resultados estão descritos na Figura 18A.

Não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo diário em gramas, que se manteve durante todo o experimento, uma vez que as dietas C e HFRU são isoenergéticas (Figura 18B). Esses resultados descartam a necessidade de um grupo *pair-feeding* para isolar os efeitos do tratamento. O grupo HFRU apresentou maior ingestão de água quando comparado ao grupo C (+99%, Figura 18C). Os tratamentos não alteraram a ingestão hídrica, que se manteve igual ao grupo HFRU nos grupos HFRUA, HFRUT e HFRUC.

Figura 18 – Massa corporal (A), Ingestão alimentar (B) e hídrica (C)



Legenda: C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

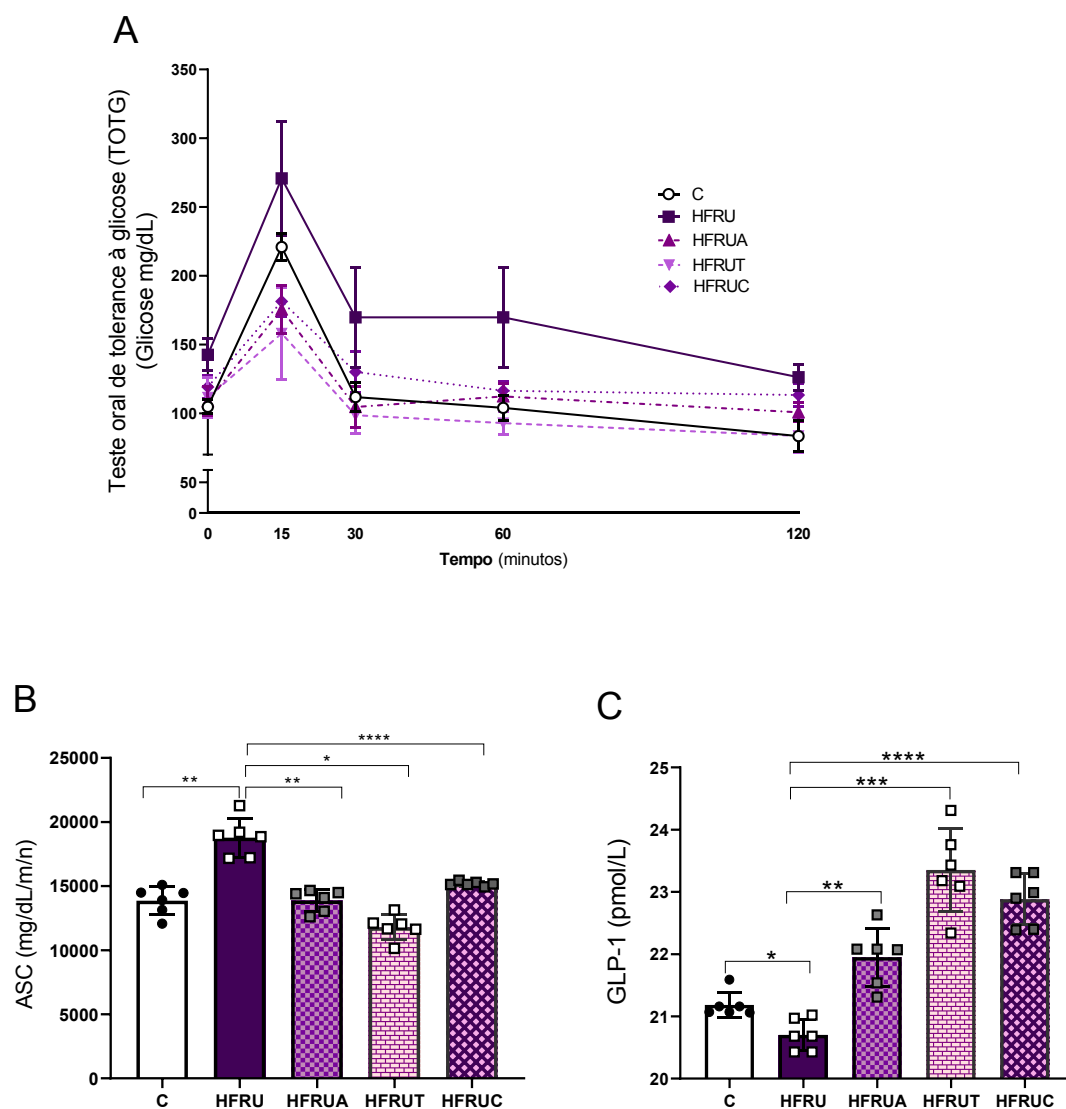
3.1.2.2 Resposta glicêmica

A Figura 19A mostra a curva do TOTG, na qual o grupo HFRU apresentou aumento significativo da glicemia de jejum (T0) em relação ao grupo C. Essa diferença foi mantida até o final do teste (T120). Os grupos C e tratados restabeleceram os níveis basais de glicose no sangue nos demais períodos de avaliação (T30, T60 e T120). Por outro lado, o grupo HFRU não conseguiu atingir os níveis basais de glicose, indicando um atraso na normalização da glicose após a sobrecarga oral de glicose.

Conforme mostrado na Figura 19B, a análise da área sob a curva (ASC) do TOTG mostrou que o grupo HFRU exibiu maior ASC do que o grupo C (+36%), indicando intolerância oral à glicose no grupo HFRU. Em contraste, os grupos tratados apresentaram ASC mais baixa do que o grupo HFRU (-26% para HFRUA vs. HFRU; -37% para HFRUT vs. HFRU; e -20% para HFRUC vs. HFRU).

As concentrações plasmáticas de GLP-1 foram reduzidas pela ingestão crônica de dieta HFRU quando comparadas ao grupo C (-2%, Figura 19C). Como esperado, o tratamento com linagliptina aumentou as concentrações de GLP-1 no grupo HFRUT e no grupo HFRUC em comparação com o grupo HFRU (+13% e +10%, Figura 19C). Além disso, a ativação de PPAR-alfa resultou em concentrações aumentadas de GLP-1 no grupo HFRUA em comparação com o grupo HFRUT (+6%, Figura 19C).

Figura 19 – Curva do TOTG (A), ASC (B) e GLP-1 (C)



Abreviações: C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

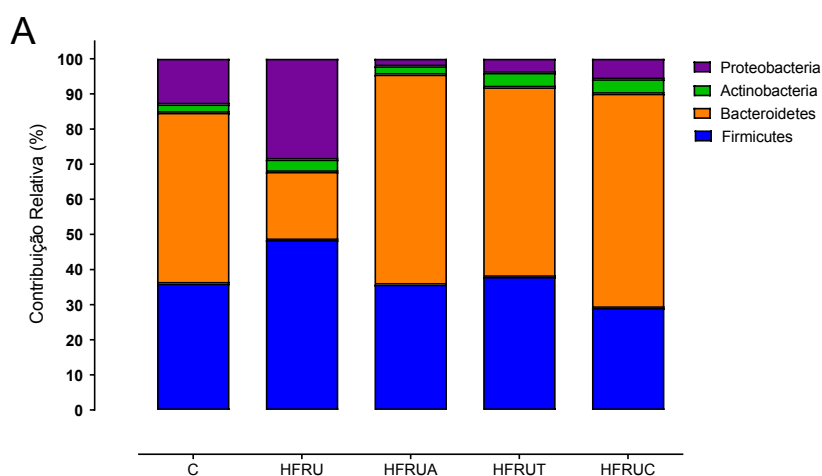
3.1.2.3 A ativação do PPAR-alfa e a inibição da DPP4 restauram a composição da microbiota e atenuam a endotoxemia em camundongos alimentados com dieta HFRU

A composição filogenética da microbiota (Figura 20A) foi avaliada pela amplificação dos genes 16S rRNA de bactérias do intestino cecal ao final do experimento. As características mais notáveis foram o aumento do filo *Proteobacteria* e *Firmicutes*

paralelamente a uma diminuição do filo *Bacteroidetes* no grupo HFRU em comparação ao grupo C. É importante ressaltar que todos os tratamentos restauraram os níveis do filo *Bacteroidetes*, assemelhando-se ao grupo C, e foram associados a uma diminuição significativa das espécies de *Proteobacteria*, sugerindo que este filo pode ter um papel decisivo nos efeitos benéficos observados pelos tratamentos propostos.

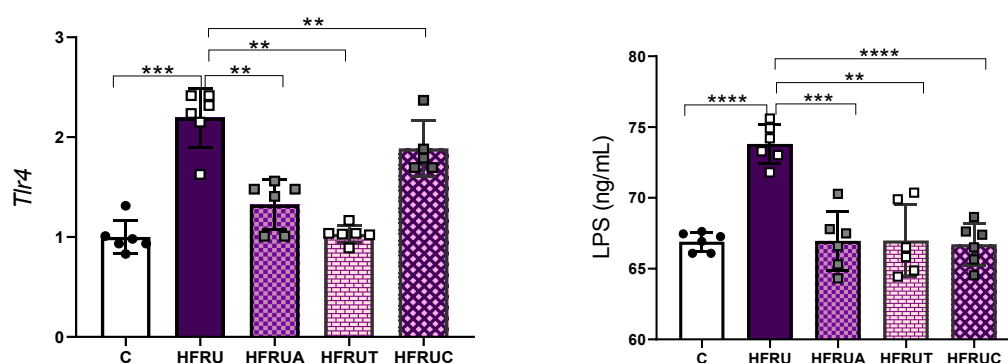
A composição alterada da microbiota no grupo HFRU causou níveis mais altos de LPS (+10%, Figura 20B), bem como maior expressão do gene *Tlr4* que o grupo C (+120%, Figura 20B). Em contraste, os grupos tratados apresentaram concentrações reduzidas de LPS no plasma (-9% para HFRUA vs. HFRU; -9% para HFRUT vs. HFRU; -10% para HFRUC vs. HFRU) e menor expressão do gene *Tlr4* que o grupo HFRU: HFRUA (- 40%), HFRUT (-50%) e HFRUC (-14%) (Figura 20C).

Figura 20 – 16S rRNA da microbiota intestinal (A), LPS (B) e expressão relativa de RNA mensageiro do *Tlr4* (C)



B

C

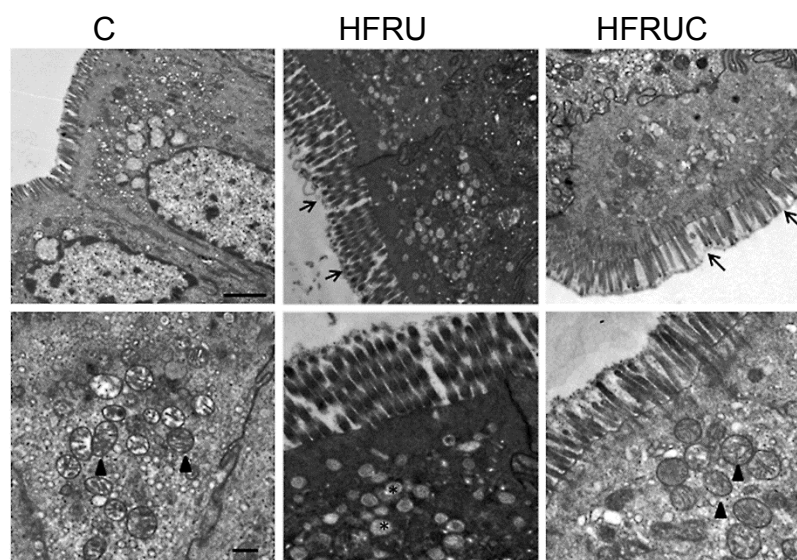


Legenda: C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

3.1.2.4 Os tratamentos resgataram danos ultraestruturais intestinais causados pelo excesso de frutose na dieta

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21) revelou que o grupo C apresentava microvilosidades na superfície apical da célula epitelial absortiva do intestino, implicando em grande área de absorção de nutrientes, além de camada de muco ativa, numerosas mitocôndrias (ponta de seta) e integridade das membranas nucleares e celulares. Ao contrário, o grupo HFRU apresentou inclusões lipídicas (asterisco) dentro das células epiteliais intestinais, quase ausência de mitocôndrias, camada de muco alterada (seta preta) e microvilosidades irregulares, algumas vezes apresentando fissão, denotando danos no funcionamento celular. Os grupos tratados apresentaram inclusões lipídicas menos aparentes, restauração do conteúdo e estrutura mitocondrial (ponta de seta), além de microvilosidades e camada de muco bem preservadas (seta preta).

Figura 21 – Microscopia eletrônica de transmissão do ceco



Legenda: As eletromicrografias do ceco correspondem ao final do período experimental de 17 semanas; painel superior (barra de escala = 2 μ m) mostra a ultraestrutura normal do ceco no grupo controle, e o painel inferior (vista detalhada, barra de escala = 700 nm) enfatiza a abundância de mitocôndrias no grupo controle e no grupo HFRUC (preto ponta de flecha). O grupo HFRUC ilustra os efeitos do tratamento, uma vez que apresentou resultados benéficos em todos os desfechos avaliados. C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR- α); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR- α e Trayenta).

3.1.2.5 Os tratamentos restauram a permeabilidade intestinal produzida pelo excesso de frutose na dieta

A expressão de RNAm de *Mucina2* mostrou redução no grupo HFRU em comparação com o grupo C (-50%, Figura 22A). Por outro lado, os grupos tratados HFRUA e HFRUC apresentaram expressão aumentada de RNAm de *Mucina 2* em comparação com o grupo HFRU (+210% para HFRUA vs. HFRU; +445% para HFRUC vs. HFRU, Figura 22A).

A *Zo-1* é considerada uma proteína das junções oclusivas e contribui para a função da barreira intestinal. Portanto, os resultados revelaram que os níveis de expressão de RNAm de *Zo-1* foram reduzidos no grupo HFRU comparado ao grupo C (-52%, Figura 22B). Por outro lado, após o tratamento, a expressão de *Zo-1* aumentou nos grupos HFRUA, HFRUT e HFRUC (+41%, +45% e +120%, $P < 0,0001$, Figura 22B).

De acordo com um estado pró-inflamatório desencadeado pela ingestão excessiva de frutose, o grupo HFRU exibiu maior expressão de RNAm da *Dpp4* que o grupo C (+83%, Figura 22C). Todos os tratamentos reduziram significativamente a expressão do gene *Dpp4* (-32% para HFRUA vs. HFRU; -50% para HFRUT vs. HFRU; e -58% para HFRUC vs. HFRU, Figura 22C).

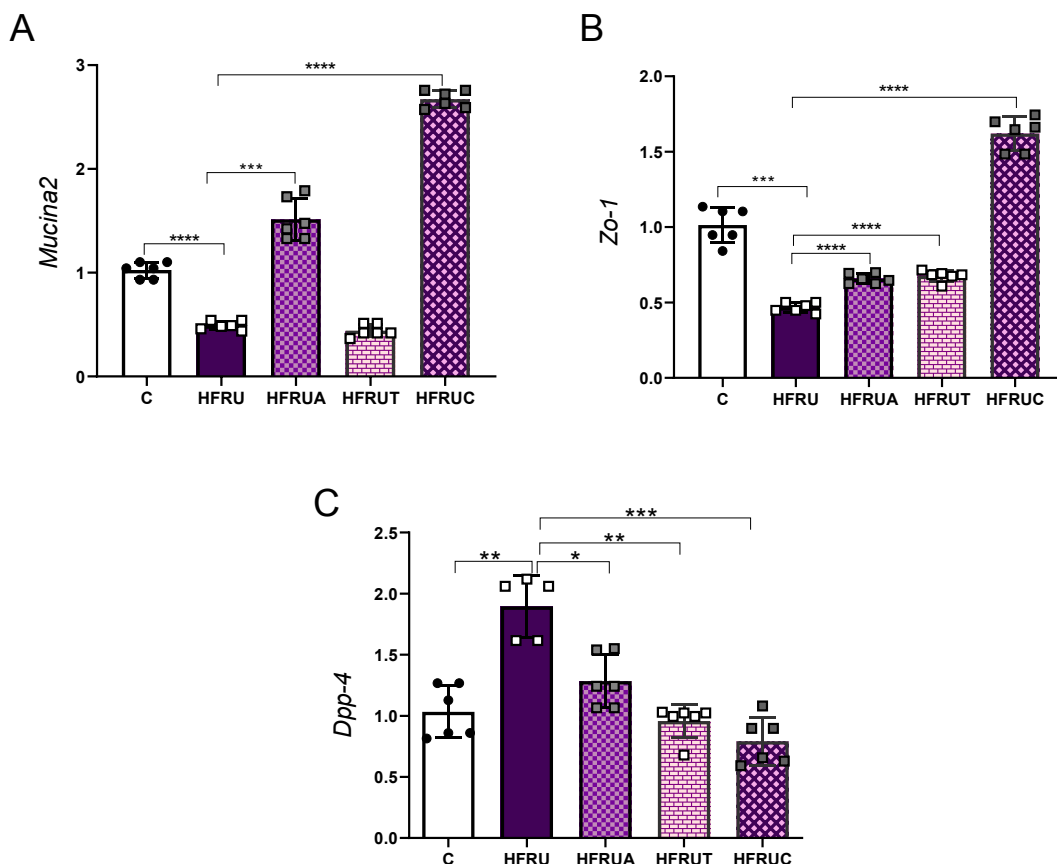
3.1.2.6 Os tratamentos restauram a permeabilidade intestinal produzida pelo excesso de frutose na dieta

A expressão de RNAm de *Mucina2* mostrou redução no grupo HFRU em comparação com o grupo C (-50%, Figura 22A). Por outro lado, os grupos tratados HFRUA e HFRUC apresentaram expressão aumentada de RNAm de *Mucina 2* em comparação com o grupo HFRU (+210% para HFRUA vs. HFRU; +445% para HFRUC vs. HFRU, Figura 22A).

A *Zo-1* é considerada uma proteína das junções oclusivas e contribui para a função da barreira intestinal. Portanto, os resultados revelaram que os níveis de expressão de RNAm de *Zo-1* foram reduzidos no grupo HFRU comparado ao grupo C (-52%, Figura 22B). Por outro lado, após o tratamento, a expressão de *Zo-1* aumentou nos grupos HFRUA, HFRUT e HFRUC (+41%, +45% e +120%, $P < 0,0001$, Figura 22B).

De acordo com um estado pró-inflamatório desencadeado pela ingestão excessiva de frutose, o grupo HFRU exibiu maior expressão de RNAm da *Dpp4* que o grupo C (+83%, Figura 22C). Todos os tratamentos reduziram significativamente a expressão do gene *Dpp4* (-32% para HFRUA vs. HFRU; -50% para HFRUT vs. HFRU; e -58% para HFRUC vs. HFRU, Figura 22C).

Figura 22 – Expressão relativa de RNAm da *Mucina 2* (A), *Zo-1* (B) e *Dpp-4* (C).



Legenda: C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

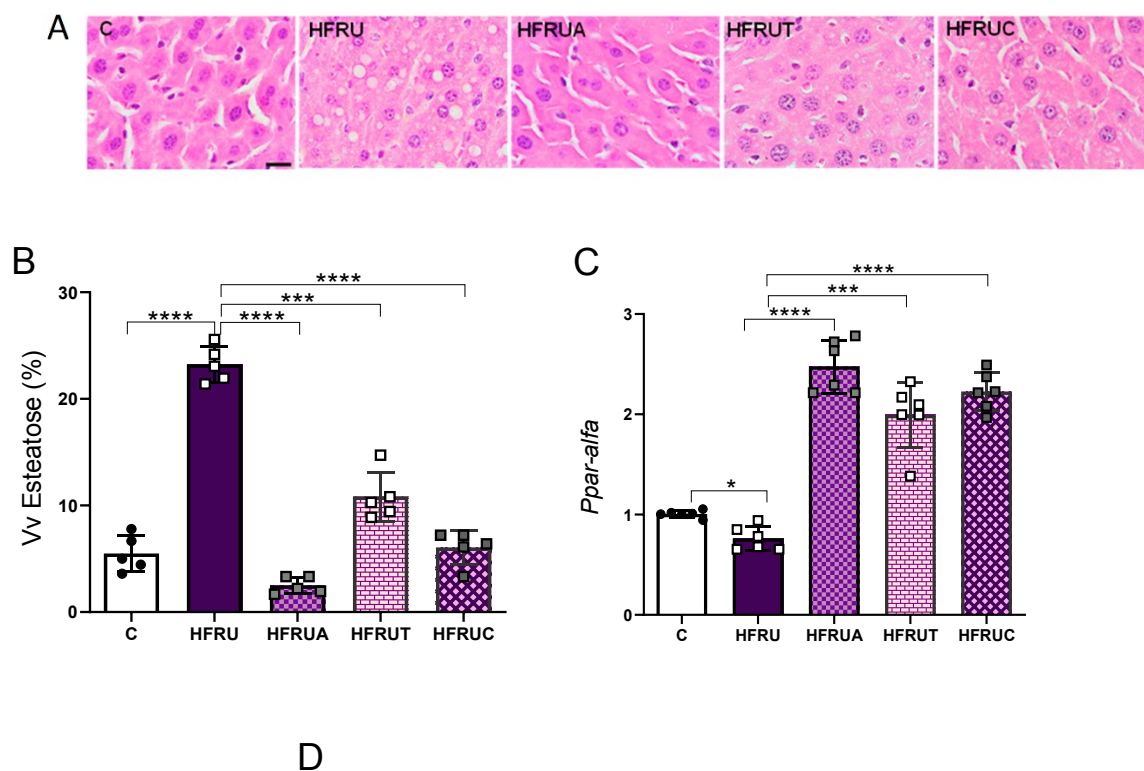
3.1.2.7 Agonista PPAR-alfa, inibição da DPP-4 e sua combinação atenuaram a esteatose hepática por indução de beta-oxidação

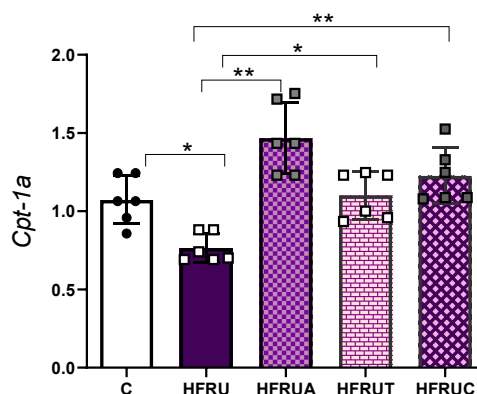
A dieta HFRU proporcionou deposição hepática expressiva de lipídeos, conforme mostrado na Figura 23A, que foi atenuada pelos diferentes tratamentos propostos neste estudo. O grupo HFRU apresentou aumento da esteatose micro e macrovesicular quando comparado ao grupo C (+320%, Figura 23B). No entanto, os diferentes tratamentos foram eficazes na redução da esteatose hepática em comparação com o grupo HFRU (-90% para

HFRUA vs. HFRU; -53% para HFRUT vs. HFRU; e -26% para HFRUC vs. HFRU, Figura 23B).

Ambos os genes relacionados à beta-oxidação tiveram menor expressão no grupo HFRU do que no grupo C: *Ppar-α* (-25%, Figura 23C) e seu transcrito *Cpt-1a*, (-30%, Figura 23D). Em contraste, os grupos tratados tiveram expressão aumentada do gene *Ppara* (+225% para HFRUA vs. HFRU; 162% para HFRUT vs. HFRU; e +193% para HFRUC vs. HFRU, Figura 7C) e *Cpt-1a* (+ 92% para HFRUA vs. HFRU; +44% para HFRUT vs. HFRU; e +60% para HFRUC vs. HFRU, Figura 23D) em comparação com suas contrapartes.

Figura 23 – Fotomicrografias representativas do tecido hepático (A); densidade de volume de esteatose hepática (B) e expressão relativa de RNA mensageiro do *Ppar-α* (C) e *Cpt-1a* (D)





Legenda: As fotomicrografias do tecido hepático correspondem ao final do período experimental de 17 semanas coradas com hematoxilina-eosina (HE); barra de calibração = 25µm (A).

C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

3.1.2.8 Os tratamentos reduziram a lipogênese hepática e combateram a inflamação

A lipogênese aumentou no grupo HFRU, que apresentou maior expressão *Pparγ* (+228%, Figura 24A), e seus transcritos *Srebp-1c* (+57%, Figura 24B) e *Fas* (+37%, Figura 24C) que o grupo C. Por outro lado, os tratamentos suprimiram os genes lipogênicos (Figura 24A-C): os genes *Pparγ*, *Srebp-1c* e *Fas* tiveram expressão reduzida no HFRUA (-69%; -37%; e -24%); HFRUT (-61%; -47%; e -91%); e HFRUC (-63%; -65%; e -82%).

De acordo com o aumento da lipogênese hepática, o alto consumo de frutose aumentou a expressão do gene *Tlr4* no fígado quando comparado ao grupo C (+382%, Figura 24D), sugerindo que o *Tlr4* pode contribuir para aumentar a esteatose hepática. Por outro lado, os grupos HFRUA, HFRUT e HFRUC mostraram uma redução na expressão de *Tlr4* comparados ao grupo HFRU (-14%; -33%; e -73%, Figura 24D).

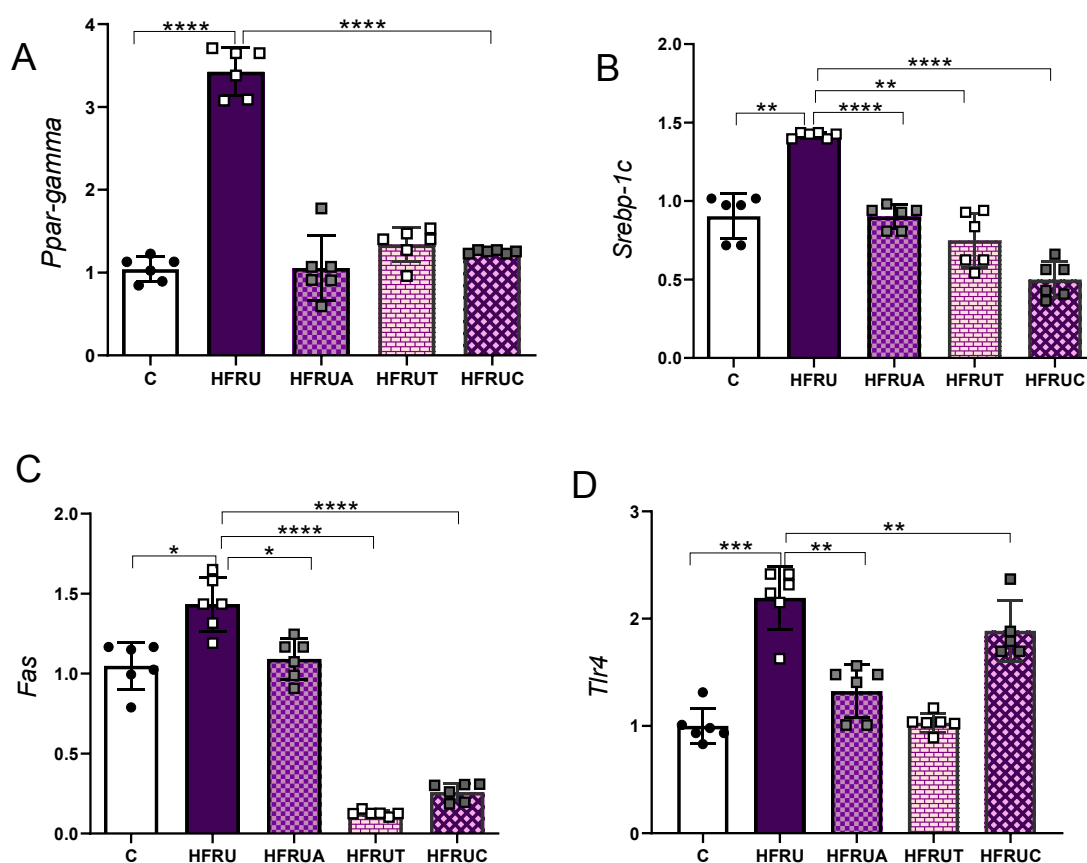
3.1.2.9 Imunofluorescência

Imunomarcações positivas para ALFA-AML e RELINA foram encontradas nos fígados do grupo HFRU (Figura 25), o que pode sugerir atividade de CEHs e a progressão

de DHGNA para EHNA. Os grupos tratados, no entanto, apresentaram imunorreações semelhantes ao grupo C, corroborando os resultados da microscopia de luz de parênquima hepático bem preservado após os tratamentos.

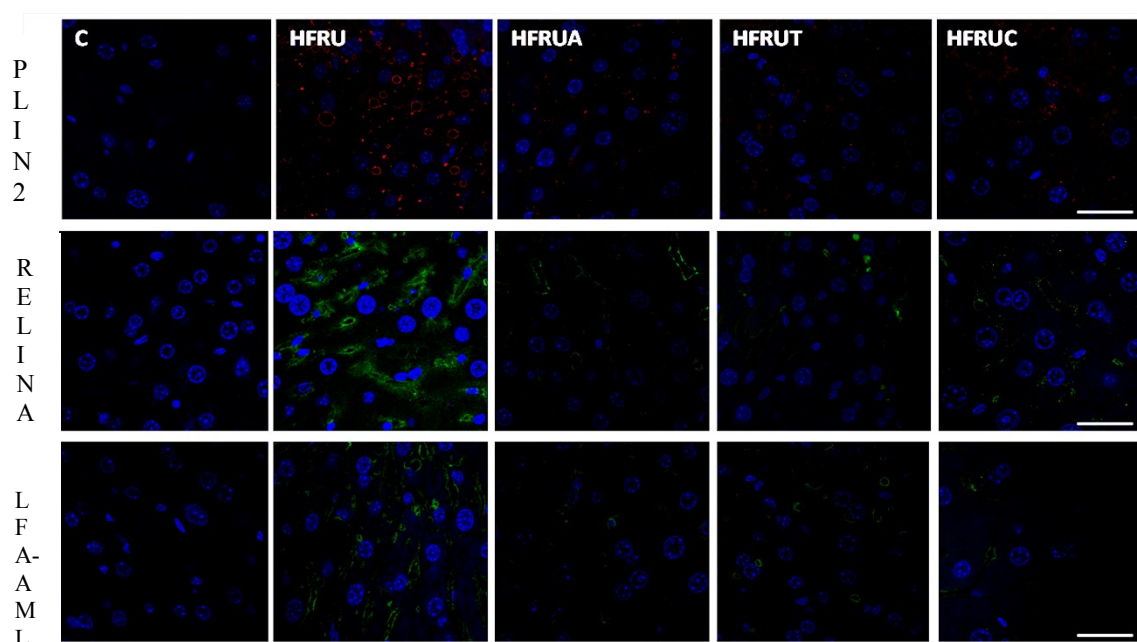
Os animais HFRU também apresentaram marcação positiva de PLIN2 (Figura 25), indicando a alta instabilidade de suas gotículas lipídicas. Novamente, os grupos tratados apresentaram padrão de imunomarcação compatível com o apresentado pelo grupo controle, corroborando a redução significativa do percentual de esteatose hepática, estimado pela técnica de contagem de pontos.

Figura 24 – Expressão relativa de RNA mensageiro do *Pparγ* (A), *Srebp-1c* (B), *Fas* (C) e *Tlr4* (D)



Legenda: C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta). Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Figura 25 – Imunofluorescência para PLIN-2, RELINA e ALFA-AML



Legenda: As fotomicrografias do tecido hepático correspondem ao final do período experimental de 17 semanas; barra de calibração = 50µm.

C (dieta controle), HFRU (dieta rica em frutose); HFRUA (dieta rica em frutose mais agonista de PPAR-alfa); HFRUT (dieta rica em frutose mais Trayenta); HFRUC (dieta rica em frutose mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta); Alfa-AML (alfa-actina de músculo liso), Relina (Relina), PLIN2 (Perilipina 2).

3.1.3 Discussão

Alterações do metabolismo glicídico e lipídico favorecem a ocorrência de doenças que representam sérios problemas de saúde em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Os dados deste artigo confirmam que uma dieta rica em frutose promove alterações no eixo entero-hepático (5, 18), favorecendo a patogênese e progressão da DHGNA. Nossas observações de disbiose, alta concentração plasmática de LPS e aumento da permeabilidade intestinal no grupo HFRU estão em conformidade com a expressão aumentada de *Tlr4* no fígado e progressão da DHGNA. Por outro lado, os grupos tratados com PPAR-alfa e linagliptina (isolados ou associados) apresentaram melhora no metabolismo da glicose, disbiose, redução dos níveis de LPS e recuperação da permeabilidade intestinal, levando ao controle da DHGNA mesmo em camundongos alimentados cronicamente com a dieta HFRU.

A ingestão crônica de dieta HFRU não causou excesso de peso, mas levou à intolerância oral à glicose. O agonista do PPAR-alfa levou à redução da massa corporal desde a primeira semana até o final do tratamento, mas a linagliptina não alterou a massa corporal neste modelo experimental. Ambos os tratamentos e sua associação resgataram a intolerância oral à glicose, que pode ser atribuída ao aumento dos níveis de GLP-1, uma incretina que impulsiona a secreção de insulina estimulada pela glicose nas ilhotas pancreáticas (20). O aumento da meia-vida e concentração do GLP-1 está relacionado à inibição da enzima DPP-4, o principal mecanismo de ação da linagliptina (117). No entanto, o agonista do PPAR-alfa WY14643 também aumentou os níveis de GLP-1 dos animais alimentados com a dieta HFRU, sugerindo que uma possível inibição da DPP-4 pode ser obtida através dos efeitos anti-inflamatórios do PPAR-alfa (22, 23).

A disbiose causada pelo consumo crônico de frutose é geralmente caracterizada por um aumento na relação *Firmicutes/Bacteroidetes* (24), como mostrado em nossos resultados. Esses dois filos constituem mais de 90% das categorias filogenéticas já conhecidas e caracterizadas no intestino de modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (25, 26). O desequilíbrio em sua proporção pode induzir inflamação, aumentar o estresse oxidativo e favorecer a lipogênese, desencadeando a esteatose hepática por meio de mecanismos associados a alterações nos metabólitos intestinais (24). O grupo HFRU apresentou um aumento nos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, paralelamente a uma diminuição nos *Bacteroidetes*. Por outro lado, os tratamentos resgataram a proporção de *Bacteroidetes* e reduziram marcadamente os filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, concordando com observações em camundongos e indivíduos obesos após cirurgia bariátrica (27, 30). Este fato sugere que a modulação de *Proteobacteria* pode ter um papel nos desfechos aqui observados.

As proteobactérias pertencem a um filo composto por bactérias gram-negativas (132). Curiosamente, os principais produtos bacterianos envolvidos na patogênese da DHGNA são o LPS, que está comumente presente na membrana celular de bactérias gram-negativas e se liga ao TLR4 (32). O grupo HFRU apresentou as maiores concentrações de LPS e expressão de *Tlr4*, o que pode estar associado à presença mais frequente de Proteobactérias. Esse cenário induziu a translocação de citocinas, contribuindo criticamente para a inflamação e resistência à insulina, alterando o metabolismo lipídico hepático (4), configurando-se como um potente indutor de esteatose hepática.

Um estudo anterior confirmou uma ligação entre o filo *Proteobacteria* e a fibrose hepática, com base no fato de que camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica e

transplantados com flora Gram-negativa mostraram maior dano hepático em comparação ao controle (33). Nossos resultados no grupo HFRU concordam com outros estudos que mostraram *Proteobacteria* como o principal filo que contribui para fibrose hepática e dano hepático (133, 134). Em contraste, a ativação de PPAR-alfa, a inibição da DPP-4 e sua associação reduziram drasticamente o filo *Proteobacteria*. Essas observações sugerem que os tratamentos propostos neste experimento podem ter propriedades antifibróticas através da modulação de *Proteobacteria*.

A frutose prejudica a integridade da barreira intestinal, tornando-a mais suscetível ao influxo de toxinas (35). O grupo HFRU apresentou aumento da expressão plasmática de LPS e *Tlr4* hepático, sugerindo endotoxemia. O aumento da translocação de endotoxinas e dos níveis plasmáticos contribuem para a inflamação e degradação da barreira da mucosa intestinal (36, 37). Altos níveis de endotoxemia estão relacionados ao aumento da permeabilidade intestinal e diminuição da expressão de proteínas de junções oclusivas, como ZO-1, que é expressa na membrana apical e tem um papel na regulação da via paracelular (38).

É importante ressaltar que o grupo HFRU apresentou redução da expressão de *Zo-1* juntamente com altos níveis plasmáticos de LPS, mas ambas as condições foram revertidas pelos tratamentos propostos, com o aumento da expressão de *Zo-1* potencializado quando os tratamentos foram associados (grupo HFRUC). Essas observações sugerem que o agonista de PPAR-alfa e o inibidor da DPP-4 podem atuar como moduladores essenciais da microbiota.

Não há relato prévio na literatura associando a administração oral de linagliptina com o perfil da microbiota intestinal. A linagliptina é o único inibidor de DPP-4 com excreção fecal predominante em humanos e roedores quando administrado por via oral (39, 40). Este fato pode implicar num contato direto da microbiota do intestino delgado com a linagliptina inalterada (39), além do aumento dos níveis de GLP1, que foi previamente associado ao aumento da presença de *Bacteroidetes* após administração de sitagliptina+metformina em ratos Zucker (41).

Em relação ao PPAR-alfa, evidências anteriores mostram que esse fator de transcrição tem um papel central na supressão da inflamação intestinal através da regulação de IL-22 e peptídeos antimicrobianos, além de contribuir para a homeostase do hospedeiro e manutenção da imunidade da barreira intestinal (11). A deleção do PPAR-alfa em camundongos levou a uma maior suscetibilidade à inflamação intestinal (135). Em contraste, a ativação do PPAR-alfa é crucial para induzir linfócitos Th2, ligados a efeitos anti-

inflamatórios nas placas de Peyer de camundongos (136). Esses efeitos anti-inflamatórios podem influenciar a modulação da microbiota.

Quanto à ultraestrutura do intestino grosso, as células caliciformes secretam glicoproteínas mucinas, cuja função primária é proteger e lubrificar a mucosa intestinal (42, 137). Nesse sentido, a ingestão crônica de frutose levou à alteração da camada de muco e comprometimento da ultraestrutura das microvilosidades, além de inclusões lipídicas e raras mitocôndrias dentro dos enterócitos. Ambos os tratamentos e sua associação resultaram na recuperação da ultraestrutura dos colonócitos, destacando que os tratamentos podem impactar a ultraestrutura da célula e não apenas sua função.

Em relação à quantidade de *Mucina 2*, a ativação de PPAR-alfa parece aumentar sua expressão gênica de forma mais significativa do que a inibição de DPP-4. É importante ressaltar que a combinação de ambos os tratamentos teve efeitos aditivos neste parâmetro, pois o grupo HFRUC apresentou a maior expressão de *Mucina 2*. A dinâmica das criptas também é prejudicada pelo aumento da expressão de TLR4 no epitélio intestinal (138). enquanto ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram disfunção da barreira intestinal juntamente com aumento do estresse oxidativo e inflamação intestinal mediada por TLR4 (43). Aqui, todos os tratamentos normalizaram a expressão intestinal de *Tlr4* no intestino, correlacionando-se com a ultraestrutura bem preservada, criptas e camada de muco.

O grupo HFRU apresentou disbiose, danos intestinais moleculares e ultraestruturais, endotoxemia e alta expressão hepática de *Tlr4*, retratando um quadro em que a disbiose contribui para a patogênese da DHGNA, a teoria dos múltiplos *hits* (44). Dietas ricas em frutose geralmente induzem resistência sistêmica à insulina e hiperinsulinemia de jejum, promovendo assim a ativação mediada por insulina de *Srebp-1c* e lipogênese *de novo* hepática (118). O tipo de lipídio que predomina no fígado influencia sua expressão de PPAR-alfa e suscetibilidade à esteatose (46). Assim, fígados esteatóticos são caracterizados pela depleção de ácidos graxos poliinsaturados n-3 e PPAR-alfa concomitante ao aumento da expressão dos genes lipogênicos e inflamatórios *Srebp-1c* e *Nf-kb* (48).

A ativação do PPAR-alfa provou ser uma abordagem promissora para combater a esteatose hepática, desencadeando uma melhora na entrada mitocondrial de ácidos graxos para beta-oxidação e supressão da lipogênese (107). Além disso, a restauração da expressão de PPAR-alfa pela administração de ativadores naturais suprimiu a lipogênese e combateu a inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (48). No presente

estudo, mostramos potentes efeitos anti-inflamatórios após o tratamento com PPAR-alfa porque camundongos HFRUA mostraram redução da expressão hepática de *Tlr4* juntamente com concentrações menores de LPS no plasma.

Pode-se argumentar que a inibição da DPP-4 exerce efeitos anti-inflamatórios ao suprimir o TLR4 em macrófagos de humanos e camundongos (139), além de reduzir as espécies reativas de oxigênio (10), melhorando a sinalização da insulina e função vascular através do óxido nítrico (118). A linagliptina também foi associada a polarização de macrófagos com uma resposta anti-inflamatória M2 eficaz e escurecimento do tecido adiposo branco subcutâneo, induzindo termogênese e reduzindo a massa corporal, ambos relacionados à mitigação da esteatose hepática (13, 14).

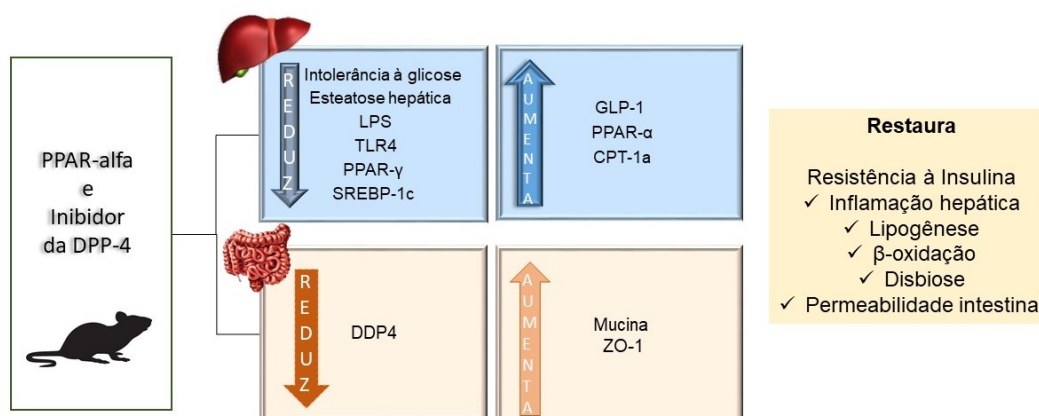
O grupo que recebeu a combinação de tratamentos pôde se beneficiar de uma interação entre a ativação do PPAR-alfa e a inibição da DPP-4, pois foi demonstrado que o PPAR-alfa é necessário para a regulação positiva do receptor de GLP-1 em ilhotas pancreáticas em camundongos tratados com metformina (140). Aqui, ambos os grupos tratados com o agonista de PPAR-alfa (HFRUA e HFRUC) mostraram níveis aumentados de GLP-1 e inibição de DPP-4, sugerindo uma interseção entre as vias de PPAR e incretinas.

A composição da microbiota intestinal e a endotoxemia também podem contribuir para a patogênese da fibrose hepática. Distúrbios crônicos da homeostase hepática geralmente envolvem danos e inflamação do fígado, levando à ativação de CEHs, um marcador para a progressão da DHGNA para EHNA (32). As CEHs são células mesenquimais armazenadoras de gordura localizadas adjacentes ao espaço de Disse. Após uma lesão hepática, as células tornam-se ativas e adquirem morfologia miofibroblástica, caracterizada por proliferação exacerbada e secreção da matriz extracelular. A vitamina A armazenada é perdida e há um aumento na expressão da ALFA-AML (112); Friedman, 2008). Este último é um marcador essencial da atividade das CEHs. A imunomarcagem positiva para REELINA também foi associada à progressão de DHGNA para EHNA (141), implicando que os animais alimentados com HFRU tinham um tipo mais nocivo de doença hepática.

Quanto ao modelo de dieta rica em frutose, a administração de GW501516 (um agonista de PPAR-beta) melhorou a inflamação, manteve as CEHs no estágio quiescente, suprimiu a lipogênese e resgatou a resistência à insulina pela modulação do sistema renina-angiotensina (142). Recentemente, o uso de linagliptina isolada ou associada à empagliflozina teve efeito antifibrótico em modelo de EHNA em camundongos C57BL/6 (143).

Os presentes resultados confirmaram a presença de esteatose hepática em camundongos induzida pela ingestão crônica de dieta HFRU. Esse fenômeno pode estar relacionado à liberação excessiva de LPS induzida pela microbiota intestinal alterada, contribuindo para a gênese da DHGNA. Os grupos tratados, entretanto, tiveram melhora significativa da esteatose hepática, disbiose, recuperação da ultraestrutura intestinal com redução da endotoxemia, o que refletiu no melhor metabolismo energético dos hepatócitos. A Figura 26 ilustra os principais achados deste estudo.

Figura 26 – Esquema representativo dos principais achados dos efeitos do tratamento com PPAR-alfa e inibidor da DPP-4



Legenda: O esquema mostra de forma detalhada os principais achados desse trabalho. A associação da ativação do PPAR-alfa com o inibidor da DPP-4 foi eficaz para contornar a resistência à insulina e a inflamação hepática provocada pelo excesso de frutose na dieta administrada aos camundongos. Consequentemente, houve redução da lipogênese e aumento da beta-oxidação mitocondrial, bem como reversão da disbiose intestinal, demonstrada pela normalização da relação dos filos *Firmicutes/Bacteroidetes* seguida da redução do filo *Proteobacteria*. O tratamento combinado também reestabeleceu a permeabilidade intestinal, evidenciado pelo aumento da expressão gênica das proteínas juncionais.

Fonte: A autora, 2021.

3.2 Modelo Experimental 2: Dieta hiperlipídicas - A ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa e a inibição da dipeptidil peptidase-4 têm como alvo a disbiose para tratar fígado gorduroso em camundongos obesos

3.2.1 Materiais e métodos

3.2.1.1 Animais e Dieta: Camundongos machos adultos C57BL/6 foram alojados em grupo (n = 5 por gaiola) e mantidos sob temperatura controlada (21 ± 2 °C) e umidade ($60 \pm 10\%$) com acesso livre a água e ração em um rack ventilado contendo gaiolas para camundongos (NexGen mouse 500, Allentown, PA, EUA). O ambiente compreendeu um período claro-escuro de 12/12 h e ciclos de renovação de ar (15 min/h). Os procedimentos seguiram as recomendações do *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (publicação NIH nº 85-23, revisada em 1996) e foram aprovados pelo nosso Comitê de Ética local (Institute of Biology, CEUA número 041/2018).

3.2.1.2 Protocolo Experimental: Cinquenta camundongos machos adultos C57BL/6 (3 meses de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados neste estudo. Inicialmente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos nutricionalmente diferentes:

1. Grupo controle (C) – animais que receberam dieta controle (14% de energia como proteína, 10% como gordura e 76% como carboidratos; energia total 15 kJ/g, n = 10);
2. Grupo hiperlipídico (HF) – animais que receberam dieta hiperlipídica (14% de energia como proteína, 50% como gordura e 36% como carboidrato; energia total 21 kJ/g, n = 40). Após doze semanas, o grupo C e dez animais aleatórios do grupo HF continuaram o mesmo esquema alimentar por mais cinco semanas, enquanto os demais animais do grupo HF foram subdivididos aleatoriamente, de acordo com o tratamento, nos seguintes grupos:
3. HFA – recebeu o agonista PPAR-alfa (WY14643, Sigma–Aldrich, 3,5 mg/kg de massa corporal) incorporado à dieta HF (n = 10) por cinco semanas;
4. HFT – recebeu o inibidor da DPP-4 (linagliptina, Boehringer Ingelheim, 15 mg/kg de massa corporal) incorporado à dieta HF (n = 10) por cinco semanas;

5. HFC – recebeu a combinação de um agonista de PPAR-alfa com um inibidor de DPP-4 (nas mesmas doses utilizadas nos grupos que receberam monoterapia) incorporados à dieta HF (n = 10) por cinco semanas.

Todo o protocolo experimental durou 17 semanas (12 semanas de indução da obesidade + cinco semanas de tratamento). As doses de WY-14643 e linagliptina foram baseadas em experimentos anteriores conduzidos por nosso grupo (21, 144). A PragSoluções (www.pragsolucoes.com.br, Jaú, São Paulo, Brasil) produziu as dietas experimentais de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN 93M) (130). Todos os grupos foram tratados seguindo a ordem em que os grupos foram descritos.

3.2.1.3 Ingestão alimentar/energética e massa corporal (MC): A ingestão alimentar foi mensurada diariamente subtraindo-se o restante da dieta verificada no dia seguinte da quantidade de dieta ofertada no dia anterior. A ingestão energética compreendeu o produto do consumo alimentar e a energia contida em 1g de cada dieta (em kJ). As massas corporais dos animais foram avaliadas em balança digital uma vez por semana (BL-3200H, precisão de 0,01 g).

3.2.1.5 Análise Metabólica: Uma semana antes do sacrifício, os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Em jejum de 6 horas (tempo 0) e após 15, 30, 60 e 120 minutos da gavagem orogástrica de solução de glicose (2 g/kg de massa corporal), foram obtidas amostras de sangue da veia caudal. Um glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) foi usado para medir os níveis de glicose no sangue em diferentes momentos. A área sob a curva (ASC) indicou a tolerância oral à glicose (GraphPad Prism, versão 8.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.2.1.6 Sacrifício e ELISA: Os camundongos ficaram em jejum por 6 h. Sob anestesia intraperitoneal com cetamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), amostras de sangue obtidas por punção cardíaca foram separadas por centrifugação (712 xg) para obtenção de amostras de plasma para realização de análises bioquímicas. O fígado, intestino grosso (ceco) e intestino delgado (jejuno e íleo) foram cuidadosamente dissecados, pesados e analisados seguindo os protocolos das diferentes técnicas. As porções do intestino foram coletadas de acordo com a indicação do Apêndice 1. Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para medir o GLP1 (Kit multiespécies GLP1 ELISA Cat. #EZGLP1T-36K, Millipore, Missouri, EUA) e o LPS no plasma (Kit multiespécies LPS ELISA Cat. #SEB526Ge-96T,

Cloud- Clone Corp., Katy, EUA). Um espectrofotômetro semiautomático e um kit comercial (K117, Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil) foram usados para medir o triacilglicerol hepático (TAG) conforme descrito anteriormente (15).

3.2.1.7 Histologia: Fragmentos de fígado e ceco fixados em formalina tamponada com Millonig (pH 7,2-7,4) foram posteriormente desidratados, diafanizados, incluídos em Paraplast Plus (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e seccionados (5 µm de espessura) com um micrótomo. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina (fígado) ou Alcian Blue (Sigma Chemical Company - pH 2,5) mais Periodic Acid-Schiff (PAS, intestino - Sigma Chemical Company) foram fotografadas usando um microscópio Leica DMRBE (Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital Infinity Lumenera (Ottawa, ON, Canadá). As imagens foram analisadas de forma cega com STEPanizer (www.stepanizer.com), conforme descrito abaixo:

3.2.1.8 Estereologia hepática: Foram analisados cinco animais por grupo e dez imagens por animal. A densidade de volume da esteatose hepática (V_v [fígado, est]) foi estimada pela técnica de contagem de pontos, seguindo a fórmula: V_v [fígado, est] = P_p [fígado, est]/ P_T (P_p é o número de pontos que atingiu as inclusões lipídicas e P_T é o total de pontos de teste). As imagens foram analisadas com STEPanizer usando um sistema de teste de 36 pontos (16).

3.2.1.9 Estereologia intestinal: O número de células caliciformes por área (Q_A [células caliciformes]) foi estimado usando STEPanizer. Todas as células caliciformes dentro da área de teste foram contadas, exceto aquelas que tocavam as linhas proibidas. O resultado foi dividido pela área teste medida em mm^2 .

3.2.1.10 Amplificação de 16S rDNA PCR: As fezes encontradas no ceco de camundongo foram usadas para extrair DNA microbiano usando o *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Düsseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade, pureza e concentração de DNA foram determinadas usando Qubit (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e eletroforese horizontal (gel de agarose a 1%). Ensaio de PCR quantitativos em tempo real foram usados para a quantificação relativa de filos específicos de microrganismos (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*) na microbiota fecal do intestino de camundongos pela detecção de genes 16S rRNA. Para quantificação relativa, as abundâncias de diferentes filos foram normalizadas pelo método

$\Delta\Delta C_t$ em relação à quantidade bacteriana total nas amostras (17). Os indicadores utilizados estão descritos na Tabela 4.

Quadro 4– Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal

Filo o Classe	Iniciadores
<i>Eubacteria (All Bacteria)</i>	F[5'-ACTCCTACGGGAGGCAGAGT-3'] R[5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3']
<i>Bacteroidetes</i>	F[5'-CRAACAGGATTAGATACCCT-3'] R[5'-GGTAAGGTTCTCTCGCGTAT-3']
<i>Firmicutes</i>	F[5'-TGAAACTYAAAGGAATTGACG-3'] R[5'-ACCATGCACCACCTGTC-3']
<i>Actinobacteria</i>	F[5'-TACGGCCGCAAGGCTA-3'] R[5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3']
<i>Class-γ-Proteobacteria</i>	F[5'-TCGTCAGCTCGTGTGTGTA -3'] R[5'-CGTAAGGGCCATGATG-3']

3.2.1.11 Reação em cadeia de transcriptase reversa-polimerase em tempo real (RT-qPCR): O RNA total foi extraído de 50 mg do fígado e 70 mg do intestino delgado (jejuno e íleo) usando o reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, a adição de 200 μ L de clorofórmio foi seguida por centrifugação (1200 g por 10 min a 4 °C para amostras de fígado e 12.000 g por 15 min a 4 °C para amostras de intestino). A porção de extrato de RNA foi separada e 500 μ L de isopropanol foi adicionado e deixado em repouso por 10 min (amostras de fígado) ou 15 min (amostras de intestino) para precipitar o RNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1200 g por 10 min a 4°C para amostras de fígado e 12.000 g por 10 min a 4°C para amostras de intestino). O isopropanol foi removido e o pellet formado foi ressuspensão em 500 μ L de etanol 75% para amostras de fígado ou etanol 70% (gelado) para amostras de intestino e depois centrifugado (1200 g por 5 min a 4°C para amostras de fígado e 10.000 g por 5 min a 4°C para amostras de intestino). O etanol foi removido e o pellet foi ressuspensão em 20 μ L (fígado)/50 μ L (intestino) de água deionizada (Milli-Q).

As amostras foram submetidas a banho seco (50°C por 5 min) e quantificadas por meio de equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Para transcrição de RNA em DNA complementar (cDNA), 1,0 µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). A síntese de cDNA de primeira fita foi realizada usando primers Oligo (dT) para mRNA de transcriptase reversa e Superscript III (ambos da Invitrogen). A qPCR foi realizada usando um termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e SYBR Green mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A *Beta-actina* foi usada para corrigir a expressão dos genes-alvo em amostras de fígado e o *Gapdh* foi usado para amostras de intestino. As sequências de primers usadas são mostradas nas Tabelas 5 (fígado) e 6 (intestino). Todos os símbolos de genes estão em *itálico* (a primeira letra maiúscula), e os símbolos de proteínas estão em *itálico* em maiúsculas (131).

Quadro 5 – Sequência direta e reversa de primers utilizados no RT-qPCR – Fígado

Gene	<i>Sequência de Primers</i>	
	5'-3'	3'-5'
<i>Lbp</i>	GGTGGCTGCTGAATCTCTTC	TCTGCTGTGACTGGCAGAGT
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Nlrp3</i>	ATGCTGCTTCGACATCTCCT	GTTTCTGGAGGTTGCAGAGC
<i>Cd206</i>	CAAGGAAGGTTGGCATTGT	CCTTTCAGTCCTTTGCAAGC
<i>IL-10</i>	GCCTTATCGGAAATGATCCA	TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC
<i>IL-13</i>	CTGGATTCCCTGACCAACAT	GGTTACAGAGGCCATGCAAT
Beta-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA

Legenda: Proteína de ligação a lipopolissacarídeos (*Lbp*), Toll-Like receptor 4 (*Tlr4*), nucleotídeos de ligação e receptores de oligomerização de domínio (contendo proteína 3) (*Nlrp3*), Cluster de diferenciação 206 (*Cd206*), Interleucina 10 (*IL-10*), Interleucina 13 (*IL-13*).

Quadro 6 – Sequência direta e reversa de primers utilizados no RT-qPCR – Intestino

<i>Sequência de Primers</i>		
Gene	5'-3'	3'-5'
<i>Mucina2</i>	GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA	ATGCCCACCTCCTCAAAGAC
<i>Ocludina</i>	CCTTCTGCTTCATCGCTTCC	AGCGCTGACTATGATCACGA
<i>Zo-1</i>	TCAGAGCCCTCCGATCATTC	GCTTTGGGTGGATGATCGTC
<i>Tlr4</i>	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
<i>Gapdh</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

Legenda: Mucina 2 (*Mucina2*); Ocludina (*Ocludina*); Zonula occludens-1 (*Zo-1*); receptor Toll-Like 4 (*Tlr4*); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*).

3.2.1.12 Análise dos dados: O cálculo do tamanho da amostra considerou que, em análises metabólicas e de biologia molecular, se um fator aumenta ou diminui em cinco repetições, a probabilidade de ocorrência é $P = (1/2)^5 = 0,05$. Portanto, um mínimo de 5 repetições foi adotado para as análises (Cruz-Orive e Weibel, 1990). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (DP). Durante as primeiras 12 semanas, a análise estatística compreendeu o teste t de Student e a correção de Welch. Na fase de tratamento, os dados foram analisados usando Brown-Forsythe e Welch one-way ANOVA com o teste post hoc Dunnett T3 (145). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo (GraphPad Prism versão 8.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 O tratamento reduziu a massa corporal (MC) sem alterar a ingestão energética

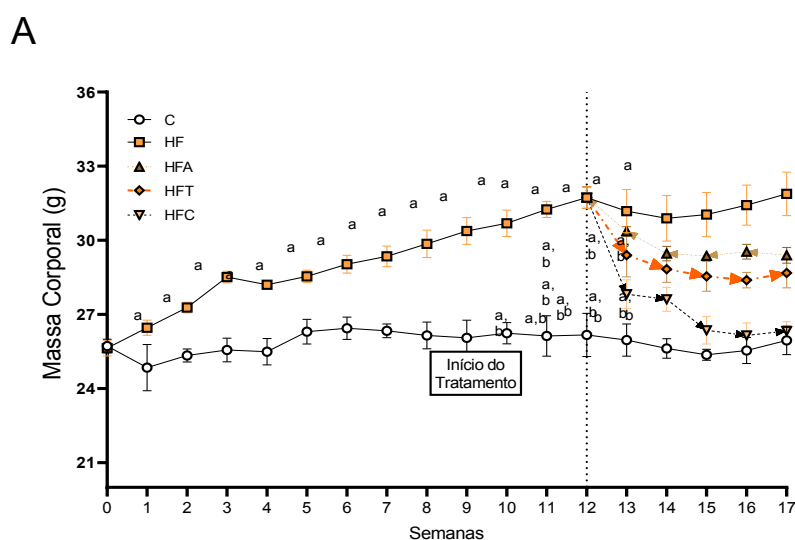
Os animais dos grupos C e HF tinham MC iguais no início do experimento. Todos os animais toleraram bem as dietas e tratamentos. O protocolo foi mantido conforme informado anteriormente. Na 13ª semana, o grupo HF estava acima do peso em relação ao grupo C (+30%), e essa característica persistiu até o final do experimento. A Figura 27A mostra esses resultados. Embora a ingestão alimentar (g) não tenha diferido entre os grupos (Figura 27B), a ingestão de energia nos grupos alimentados com HF foi maior do que no grupo C (Figura

27C). Todos os tratamentos propostos resgataram a tolerância à glicose e aumentaram as concentrações de GLP1

A Figura 28A mostra a curva do TOTG, na qual o grupo HF apresentou aumento significativo da glicemia de jejum (T0) em relação ao grupo C. Essa diferença permaneceu até o final do teste (T120). O grupo C e os grupos tratados apresentaram níveis basais de glicose no sangue resgatados nos outros momentos de avaliação (T30, T60 e T120). Por outro lado, o grupo HF não atingiu os níveis basais de glicose, indicando um atraso após a sobrecarga de glicose e implicando em intolerância oral à glicose, como confirmado pela maior ASC para TOTG no grupo HF do que no grupo C (+23%, Figura 28B). Em contraste, todos os grupos tratados apresentaram ASCs mais baixas do que o grupo HF, indicando alívio da intolerância oral à glicose (Figura 28B).

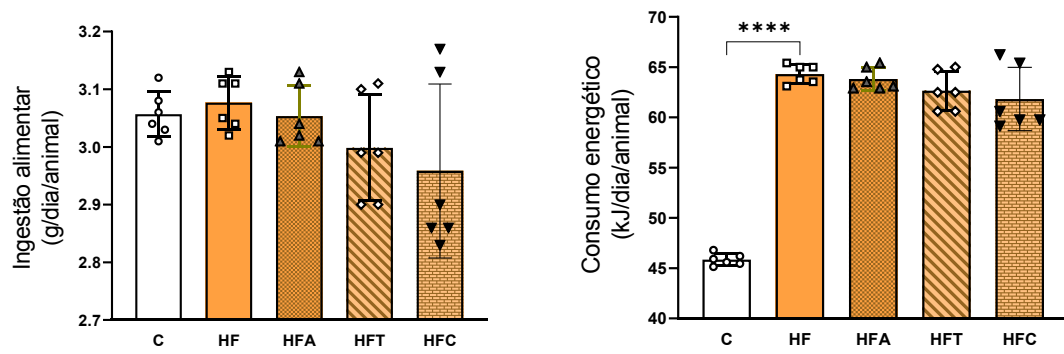
As concentrações plasmáticas de GLP1 diminuíram no grupo HF em comparação com o grupo C (Figura 28C). Como esperado, o tratamento com linagliptina aumentou as concentrações de GLP1 no grupo HFT (+13%), o que também ocorreu no grupo HFC e após o tratamento único com o agonista de PPAR-alfa no grupo HFA em comparação com o grupo HF (Figura 28C).

Figura 27 – Massa Corporal (A), Ingestão alimentar (B) e Consumo energético (C)



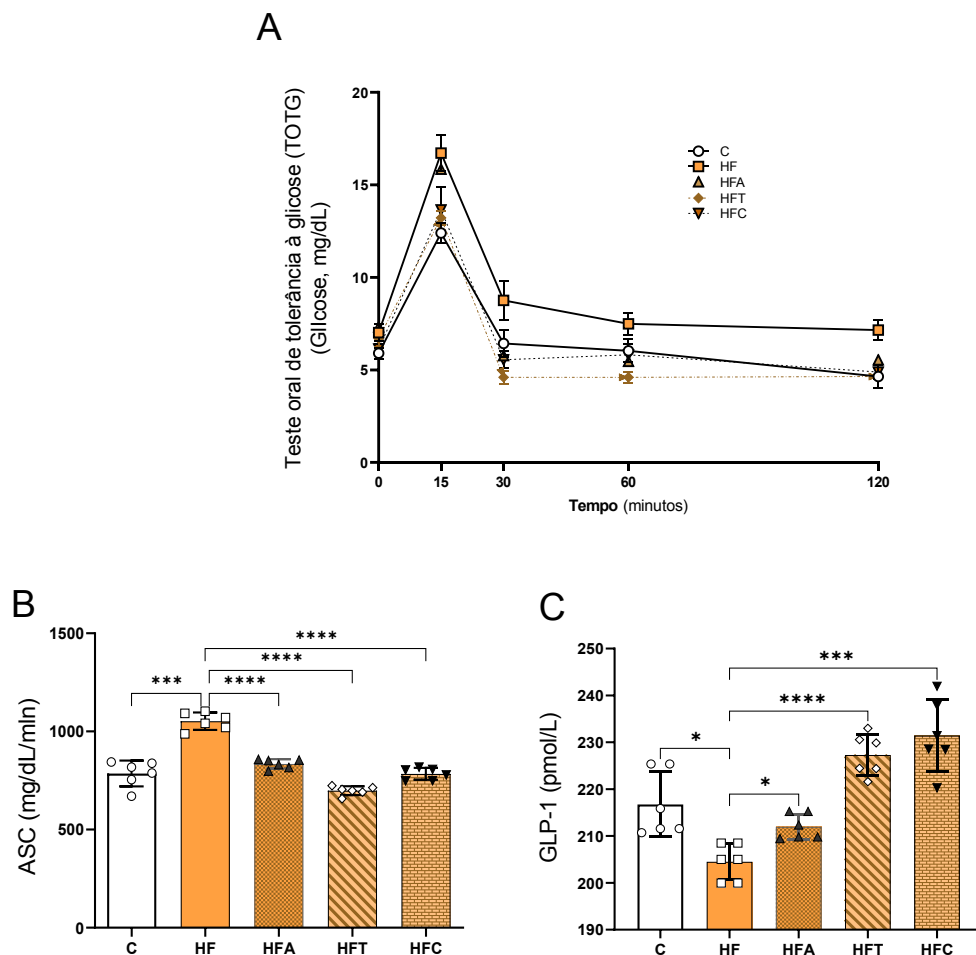
B

C



Legenda: Os valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão da média, $n=6$ por grupo. Diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$. Abreviações: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de PPAR- α); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta); HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR- α e Trayenta).

Figura 28 – Curva do TOTG (A), ASC (B) e GLP-1 (C)



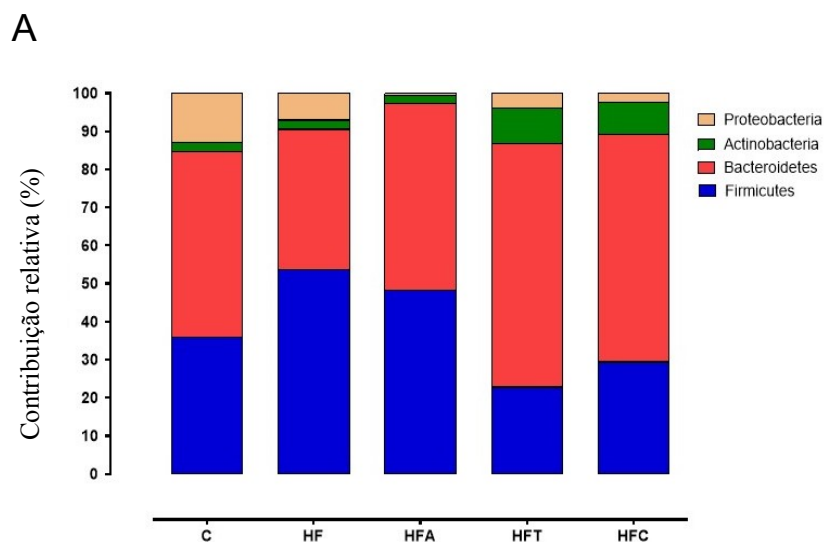
Legenda: Os valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão da média, $n=6$ por grupo. Diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$. Abreviações: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de

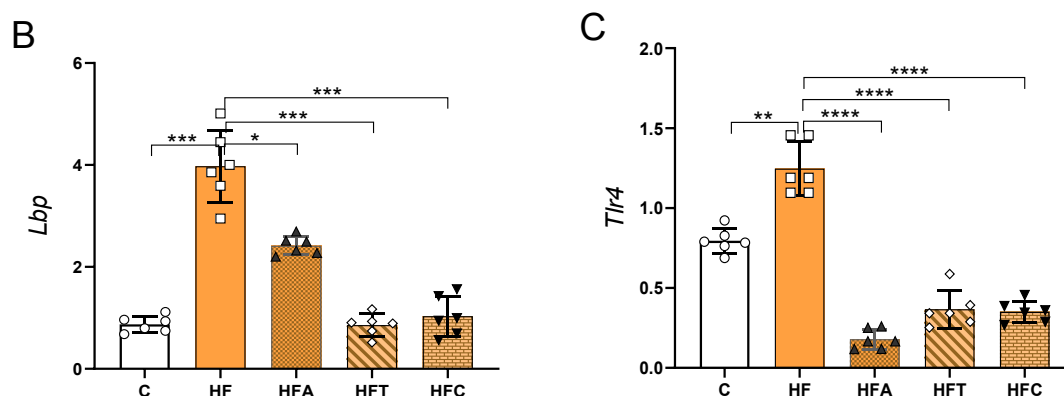
PPAR-alfa); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta); HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta).

3.2.2.2 Os tratamentos recuperaram a composição da microbiota e reverteram a endotoxemia em camundongos alimentados com HF

Os genes de rRNA 16S amplificados de bactérias do intestino cecal foram medidos no final do experimento para avaliar a composição da microbiota. O grupo HF apresentou aumento do filo *Firmicutes* juntamente com diminuição dos filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* em relação ao grupo C, conforme mostrado na Figura 29A. No entanto, todos os tratamentos reverteram essas alterações filogenéticas nos grupos tratados. Os tratamentos restauraram a quantidade de *Bacteroidetes* para se assemelhar ao grupo C e provocaram diminuição significativa de *Proteobacteria*, que pode desempenhar um papel decisivo nos efeitos benéficos observados devido aos tratamentos propostos. Mudanças na composição da microbiota no grupo HF desencadearam concentrações aumentadas da expressão do RNAm hepático dos genes *Lbp* (+313%, Figura 29B) e *Tlr4* (+58%, Figura 29C) no grupo HF em relação ao grupo C, enquanto os grupos tratados apresentaram expressão significativamente reduzida.

Figura 29 – Genes de rRNA 16S da microbiota intestinal e expressão relativa de RNA mensageiro de *Lbp* e *Tlr4*





Legenda: Os valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão da média, $n=6$ por grupo. Diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$. Abreviações: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de PPAR-alfa); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta); HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta).

3.2.2.3 O inibidor de DPP-4 e o agonista de PPAR-alfa melhoraram a estrutura e a proteção da barreira intestinal

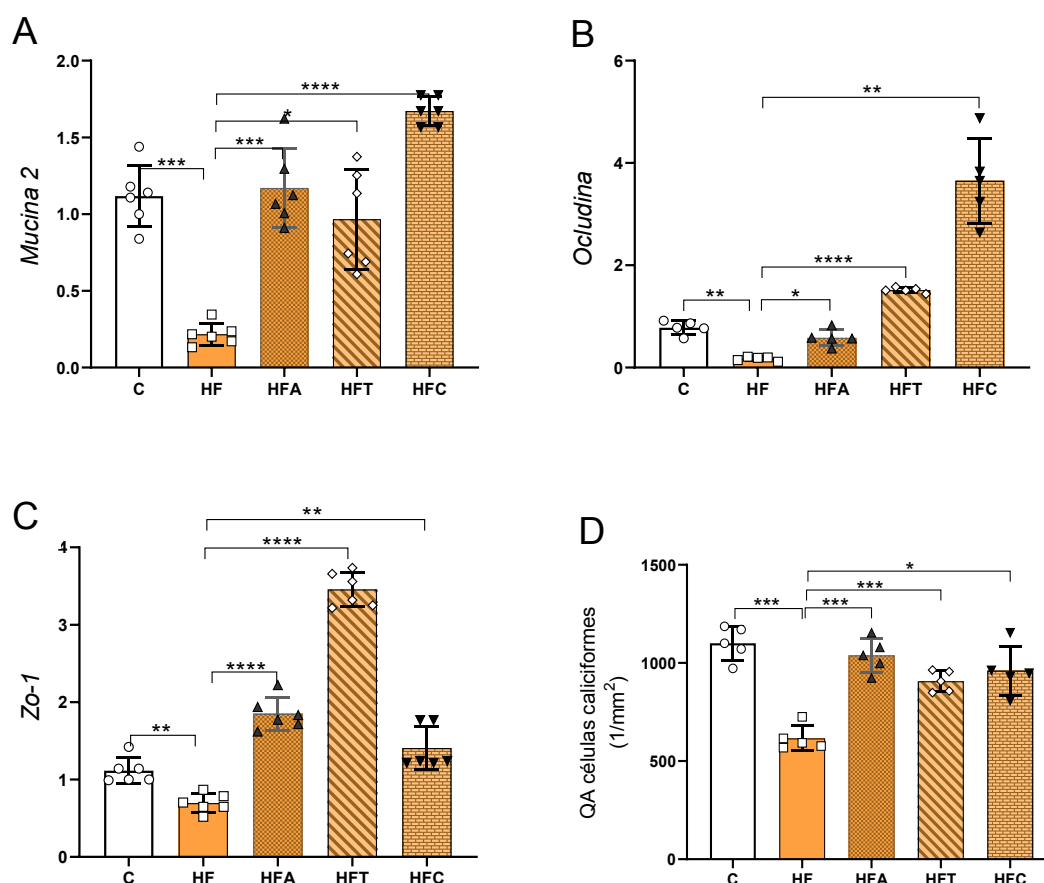
O grupo HF apresentou uma diminuição de 80% na expressão intestinal do gene *Mucina2* em comparação com o grupo C. Por outro lado, os grupos HFA, HFT e HFC mostraram aumentos significativos na expressão de *Mucina2* (+439% para HFA vs. HF, +345% para HFT vs. HF e +670% para HFC vs. HF; Figura 30A).

De acordo com o resultado anterior, o grupo HF também apresentou redução da expressão intestinal de *Ocludina* (-78%, Figura 30B) e *Zo-1* (-38%, Figura 30C) em relação ao grupo C. Por outro lado, o grupo HFA apresentou aumento de 238% na expressão de *Ocludina*, enquanto os grupos HFT e HFC tiveram aumento maior que 500% na expressão desse gene (Figura 30B). Em relação à expressão do gene *Zo-1*, todos os grupos tratados tiveram um aumento significativo (+166% para HFA vs. HF, +397% para HFT vs. HF, e +102% para HFC vs. HF; Figura 30C).

A alta ingestão de gordura saturada alterou o padrão histoquímico das células da mucosa intestinal, conforme revelado pela reação com Alcian Blue e PAS. A Figura 30E mostra a diminuição do muco no grupo HF, enquanto os tratamentos provocaram aumento na produção de muco na região apical das criptas, seguido por aumento da presença de

células caliciformes (células produtoras de muco). A estereologia intestinal confirmou essas observações com os resultados do QA [células caliciformes], que mostrou redução no grupo HF em relação ao grupo C (-44%), enquanto o HFA (+68%), HFT (+47%) e os grupos HFC (+56%) mostraram um aumento no número de células caliciformes por área de tecido (Figura 30D).

Figura 30 – Expressão relativa de RNA mensageiro da *Mucina2* (A), *Ocludina* (B) e *Zo-1* (C); QA [células caliciformes] (D), Intestino grosso corado com Alcian blue (E)



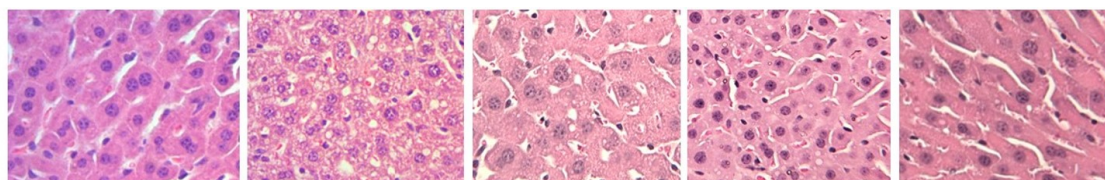
Legenda: Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média, n=6 por grupo. Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Intestino grosso corado com Alcian Blue e Ácido Periódico-Schiff (PAS), os quais coram glicoproteínas produzidas por células caliciformes (barra de escala = 40µm), marcadamente reduzidas pela dieta hiperlipídica e resgatadas pelos tratamentos de acordo com a estereologia (QA células caliciformes). C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de PPAR-alfa); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta) e HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta).

3.2.2.4 Inibidor de DPP-4 e ativação de PPAR-alfa atenuaram a esteatose hepática

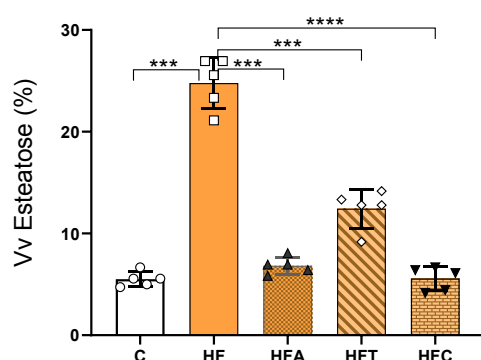
Camundongos alimentados com dieta HF exibiram esteatose hepática microvesicular perceptível, enquanto camundongos em todos os grupos tratados apresentaram mitigação da esteatose hepática, com o parênquima hepático semelhante ao do grupo C (Figura 31A). De acordo com esses achados histológicos, Vv [figado, est] no grupo HF foi maior do que no grupo C (+38%, Figura 31B). Todos os grupos tratados apresentaram reduções significativas na esteatose hepática (-72% para HFA vs. HF, -50% para HFT vs. HF e -77% para HFC vs. HF). Consistente com os achados estereológicos, os níveis hepáticos de TAG aumentaram no grupo HF (+38%). Por outro lado, os grupos tratados apresentaram concentrações hepáticas de TAG mais baixas do que no grupo HF (-11% para HFA, -16% para HFT e -13% para HFC; Figura 31C).

Figura 31 – Fotomicrografias representativas do tecido hepático ao final do experimento (A), Vv esteatose (%) (B) e níveis hepáticos de TAG (C)

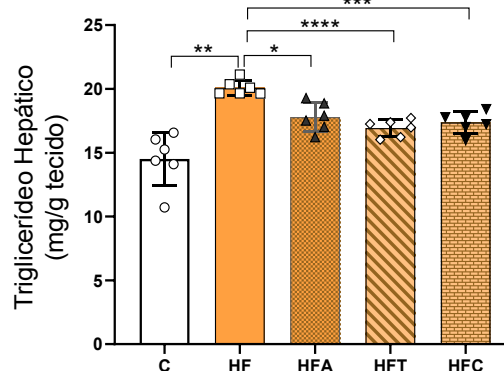
A



B



C



Legenda: A: Cortes de fígado corados com hematoxilina-eosina; B: Densidade de volume (Vv) (esteatose hepática); C: Triglicerídeo Hepático; barra de calibração = 50 μ m. Os valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão da média, n=6 por grupo. Diferenças significativas ($P < 0,05$) são indicadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Abreviações: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de PPAR-alfa); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta) e HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR-alfa e Trayenta).

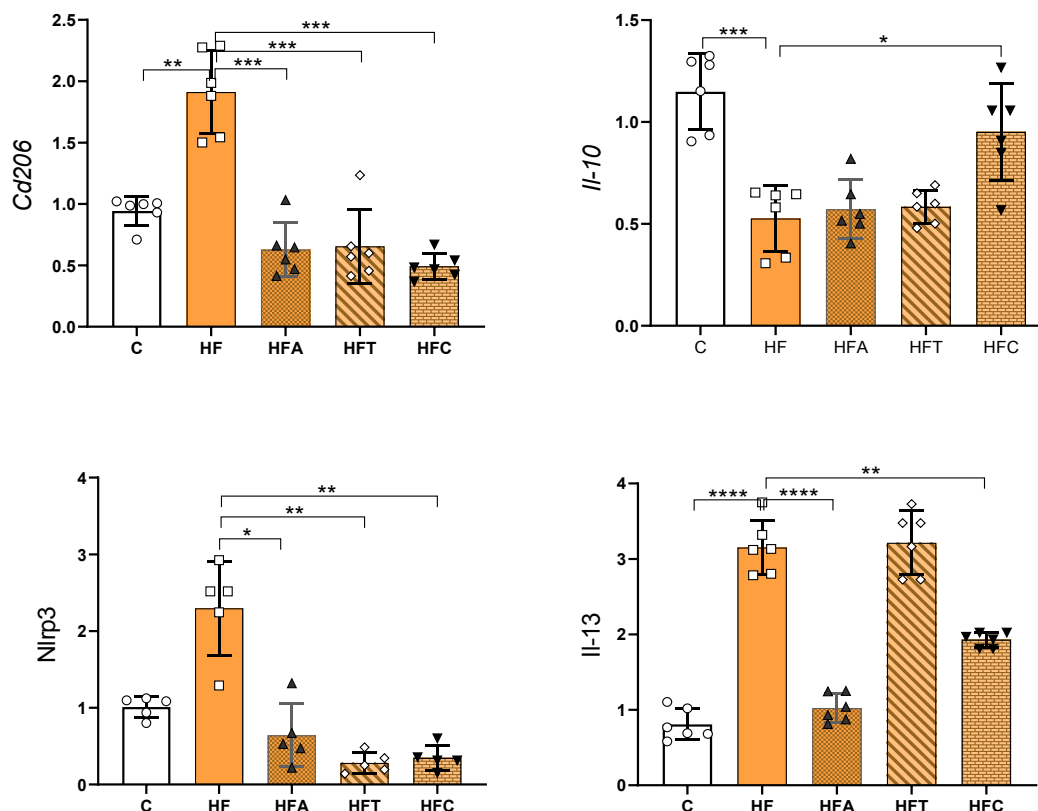
3.2.2.5 A inibição da DPP-4 e a ativação do PPAR-alfa atenuaram a ativação de macrófagos e reduziram a inflamação hepática em camundongos alimentados com HF

O grupo HF apresentou maior expressão de *Cd206*, que é um marcador específico de macrófagos, do que o grupo C (+103%, Figura 32A). Em contraste, os grupos tratados apresentaram expressão reduzida de *Cd206* (-67% para HFA vs. HF, -65% para HFT vs. HF e -74% para HFC vs. HF).

Além dos resultados de *Cd206*, a dieta HF reduziu significativamente a expressão de *IL-10* em comparação com o grupo C (-54%), enquanto o tratamento combinado produziu uma diminuição de 80% na expressão de *IL-10* no grupo HFC em comparação ao HF (Figura 32B). O gene *Nlrp3* apresentou resultados semelhantes ao *Cd206*, com maior expressão no grupo HF que no grupo C (+128%) e expressão reduzida no HFA (-72%), HFT (-88%) e HFC (-85%) em relação ao grupo C (Figura 32C).

Em relação à citocina *IL-13*, o grupo HF apresentou aumento significativo em relação ao grupo C (+290%). Apenas os tratamentos HFA e HFC foram capazes de reduzir a expressão desta citocina em comparação ao grupo HF (-39% e -67%) (Figura 32D).

Figura 32 – Expressão relativa de RNA mensageiro de *CD206* (A), *IL-10* (B), *Nlrp3* (C) e *IL-13* (D)



Legenda: Os valores estão representados como média $\pm$ desvio padrão da média, $n=6$ por grupo. Diferenças significativas ($P<0,05$) são indicadas: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$. Abreviações: C (dieta controle), HF (dieta hiperlipídica); HFA (dieta hiperlipídica mais agonista de PPAR- α); HFT (dieta hiperlipídica mais Trayenta) e HFC (dieta rica em gordura mais a combinação de PPAR- α e Trayenta).

3.2.3 Discussão

A ingestão excessiva de gordura saturada causa sobrepeso, intolerância oral à glicose, disbiose intestinal e alterações morfológicas e funcionais da barreira intestinal. Assim, os animais HF apresentaram endotoxemia com sinais pró-inflamatórios direcionados ao fígado, causando DHGNA. A monoterapia com o agonista de PPAR- α ou inibidor da DPP-4 e o tratamento combinado produziram resultados benéficos, reduzindo massa corporal, resgatando a tolerância oral à glicose, densidade numérica de células caliciformes intestinais por área, expressão gênica das proteínas das junções oclusivas, distribuição

filogenética da microbiota e concentrações de LPS. Assim, os animais tratados apresentaram mitigação da esteatose hepática e da inflamação devido à melhora da disbiose intestinal e controle da endotoxemia.

A ingestão crônica de uma dieta com alto teor de gorduras saturadas aumenta a massa corporal e prejudica o metabolismo de glicose e lipídeos (28). Assim, os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica estavam acima do peso e apresentavam intolerância oral à glicose, além de dificuldade em resgatar os níveis glicêmicos durante o TOTG em comparação ao grupo C. Essas alterações metabólicas foram acompanhadas pela disbiose intestinal no grupo HF, confirmando que os padrões alimentares interferem no eixo intestino-fígado, favorecendo a patogênese e progressão da DHGNA.

A integridade da estrutura e função da barreira intestinal está relacionada à composição da microbiota intestinal. A microbiota intestinal compreende uma grande diversidade de bactérias simbióticas, enquanto a barreira intestinal conta com proteínas juncionais que tornam esse epitélio menos permeável a patógenos e toxinas. Desta forma, ambos os mecanismos previnem o desequilíbrio metabólico e contribuem para a manutenção da homeostase intestinal (12).

A disbiose causada pelo consumo crônico de gorduras é geralmente caracterizada por um aumento de *Firmicutes* em relação a *Bacteroidetes*, como demonstrado pelo grupo HF. Esses dois filos constituem mais de 90% da categoria filogenética atualmente conhecida e caracterizada no intestino de modelos experimentais (63). Por outro lado, todos os grupos tratados apresentaram redução no percentual quantitativo de *Firmicutes*, principalmente os grupos tratados com o inibidor da DPP-4 e a terapia combinada.

O resgate da disbiose intestinal nos grupos tratados resultou em melhorias marcantes na expressão dos genes das proteínas das junções oclusivas. A dieta HF também prejudica os componentes juncionais presentes no epitélio intestinal, tornando-o mais permeável e consequentemente mais suscetível à translocação de microrganismos e toxinas para a circulação sistêmica. O aumento da permeabilidade intestinal é conhecido como intestino permeável, do inglês “*leaky gut*” (12, 146).

O intestino permeável foi resgatado através do aumento da expressão dos genes das junções oclusivas em todos os grupos tratados. Camundongos *knockout* para MUCINA2 exibem alterações nas proteínas estruturais das junções oclusivas, além de dano mitocondrial e inflamação, o que concorda com um intestino permeável (147). Os tratamentos aumentaram significativamente o gene *Mucina2*, que é o principal gene de células caliciformes responsável pela secreção de mucina, além da expressão dos genes das junções

oclusivas *Ocludina* e *Zo-1* (148). O PPAR-alfa foi recentemente descrito como essencial para a formação de gotículas lipídicas e expansão de criptas no intestino durante a ingestão crônica de dieta HF (149).

A sitagliptina, inibidor da DPP-4, exerceu efeitos protetores na barreira intestinal (expressão elevada de *Ocludina* e *Zo-1*) pela indução de GLP-2 na colite experimental (150). No presente estudo, a combinação dessas drogas resultou na maior expressão intestinal de *Mucina2* e *Ocludina*, indicando que a função adequada das células caliciformes e junções oclusivas bem preservadas podem estar subjacentes aos mecanismos envolvidos nos resultados benéficos obtidos no grupo HFC.

A ingestão de dieta hiperlipídica também prejudica o epitélio que reveste a mucosa intestinal. As células caliciformes encontradas nas vilosidades e criptas intestinais são produtoras de mucinas que desempenham um papel crucial na proteção e lubrificação da mucosa intestinal. O número de células caliciformes reflete indiretamente a capacidade de secretar muco (12). Aqui, a dieta HF causou um número reduzido de células caliciformes por área da cripta intestinal, enquanto todos os tratamentos reverteram essa alteração com a normalização da densidade numérica de células caliciformes e expressão do gene *Mucina2*. Assim, os tratamentos apoiaram a integridade da barreira intestinal e reduziram a translocação de endotoxinas, como LPS, na circulação sistêmica, resgatando os camundongos de uma condição chamada endotoxemia metabólica (18).

A alta translocação de endotoxinas derivadas da microbiota intestinal induz a ativação do TLR4. O LPS é o padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) mais comum e sua ligação ao TLR4 é catalisada pela proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP), que é expressa principalmente no fígado e no tecido adiposo (18).

O LPS resulta da destruição da parede celular bacteriana. Um aumento de LPS na circulação sistêmica desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias e uma amplificação inadequada da resposta imune, causando dano tecidual (63). Mostramos que a expressão hepática dos genes *Lbp* e *Tlr4* aumentou no grupo HF, induzindo a translocação de citocinas associadas à inflamação e alterando o metabolismo lipídico hepático, reconfigurando esse metabolismo para se tornar um potente indutor de fígado gorduroso e contribuindo para a patogênese da DHGNA.

Em contraste, os tratamentos normalizaram a expressão de *Lbp* e *Tlr4*, com ambos emergindo como alvos para o tratamento de DHGNA. O inibidor da DPP-4 alogliptina suprimiu o TLR4 via ativação ERK, resultando em diminuição de metaloproteinases de matriz e citocinas pró-inflamatórias em histiócitos U937 (151). A sitagliptina demonstrou

anteriormente atenuar a DHGNA ao suprimir a inflamação e a resistência à insulina devido à regulação negativa da via TLR4/NF- κ B em ratos diabéticos (150). A ativação de PPAR- α por WY-14643 mitigou a esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta rica em frutose, reduzindo as concentrações de LPS, melhorando a ultraestrutura da barreira intestinal, regulando positivamente a beta-oxidação hepática e suprimindo a lipogênese em camundongos (144).

Um estudo recente mostrou que o bloqueio sistêmico da LBP ou diminuição dos níveis da LBP no fígado normalizou a homeostase da glicose, principalmente pela redução dos níveis de glicemia de jejum, sem alterar a adiposidade ou a esteatose hepática (152). Neste estudo, o grupo tratado com o agonista do PPAR- α em monoterapia não apresentou concentrações reduzidas de LPS. No entanto, o tratamento reduziu a expressão hepática de *Lbp*, produzindo efeitos anti-inflamatórios e antiesteatóticos semelhantes aos dos outros tratamentos.

Nesse contexto, os macrófagos desempenham papéis nas doenças inflamatórias agudas e crônicas do fígado. Os macrófagos possuem receptores, como CD163 e CD206, que participam da fagocitose de substâncias nocivas. Devido à sua alta afinidade por macrófagos, CD206 é um potencial biomarcador de ativação de macrófagos hepáticos (células de Kupffer), o que indica inflamação e fibrose em doenças crônicas do fígado (153).

Em resposta ao LPS e outros estímulos, o perfil metabólico de macrófagos e células dendríticas estimula a via glicolítica, resultando no acúmulo metabólico de citrato e succinato, que, por sua vez, regulam a expressão gênica de citocinas como a interleucina 10 (IL-10) (154). Evidências recentes mostram que a IL-10 pode desempenhar um papel duplo em alguns contextos, estimulando a resposta imune em vez de suprimi-la. No entanto, a citocina IL-10 surgiu como um mediador anti-inflamatório determinando a proteção de seu hospedeiro em resposta a patógenos (155).

Nossos resultados mostraram que macrófagos *Cd206* positivos foram ativados no grupo HF, reforçando a ideia de que o consumo crônico desse tipo de dieta ativa vias inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento da doença hepática. Em contrapartida, os grupos tratados com o ativador de PPAR- α e inibidor da DPP-4 apresentaram expressão reduzida de *Cd206*, conferindo efeito protetor contra a ativação de vias inflamatórias. Evidências recentes mostraram que fígados altamente fibrosos tinham uma maior densidade de macrófagos *Cd206* (153).

A expressão do gene *IL-10* foi reduzida no grupo HF. No entanto, apenas o tratamento combinado aumentou a expressão de *IL-10*, implicando que os tratamentos

isolados podem ter agido por outra via anti-inflamatória. A superexpressão de *IL-13* em camundongos alimentados com dieta HF é uma via relacionada ao fígado esteatótico e ao aparecimento de RI. O tratamento combinado e a ativação do PPAR-alfa (em monoterapia) reduziram marcadamente a expressão hepática de *IL-13*, a qual está relacionada à redução da ativação de macrófagos e reestabelecimento da homeostase glicêmica para aliviar o fígado esteatótico (153).

Com relação aos inflamassomas, o NLRP3 está presente principalmente em células imunes e inflamatórias, como macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, após ativação por estímulos inflamatórios. O NLRP3 é ativado por vários PAMPs, como hiperglicemia, ácidos graxos, toxinas bacterianas e ácidos nucleicos bacterianos e virais. Estudos em macrófagos e modelos animais mostraram que lipoproteínas de baixa densidade oxidadas e cristais de colesterol desencadeiam a ativação do NLRP3. Em macrófagos e em modelos animais de DM2, a glicose e os ácidos graxos livres desencadeiam a ativação do inflamassoma, prejudicando o metabolismo da glicose e favorecendo a resistência à insulina (155). Assim, o NLRP3 pode contribuir para o aparecimento e progressão de diversas doenças relacionadas à síndrome metabólica.

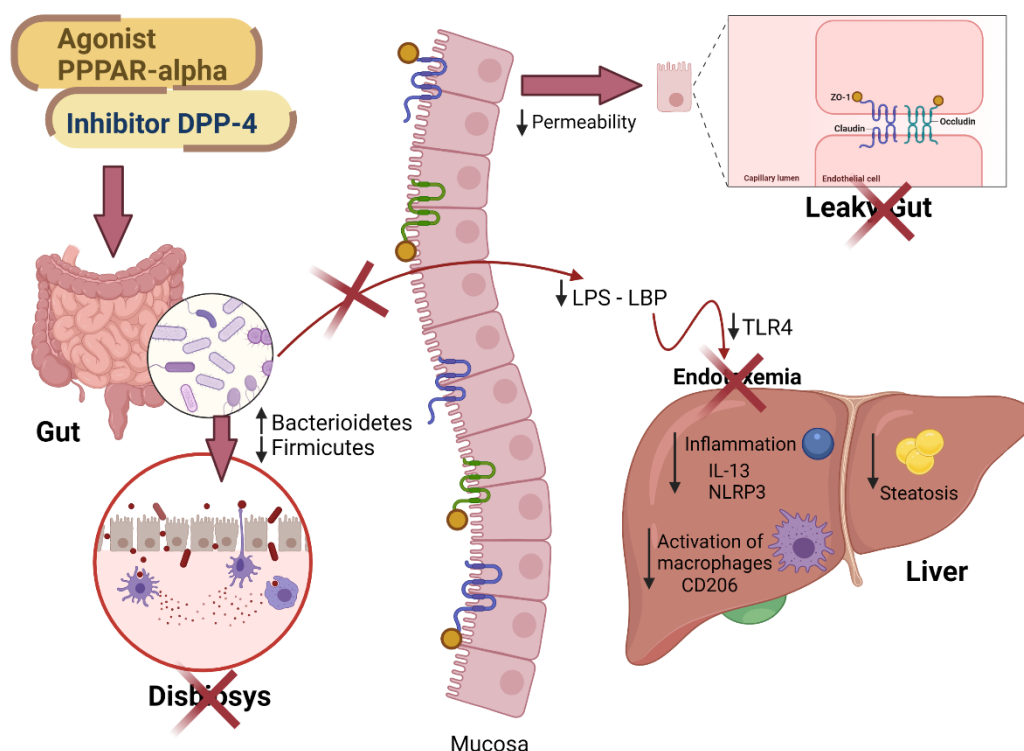
Neste estudo, mostramos que o tratamento com agonista do PPAR-alfa e inibidor da DPP-4 produziu um potente efeito anti-inflamatório no fígado, pois demonstraram redução da expressão gênica de *Nlrp3* e *Cd206*. O bloqueio de NLRP3 melhorou a DHGNA e atenuou a fibrose hepática em dois modelos de esteatohepatite (156), destacando os tratamentos propostos como ferramentas viáveis para controlar o fígado gorduroso. Dois inibidores de DPP-4 foram mostrados anteriormente capazes de suprimir o NLRP3 em macrófagos humanos, regulando negativamente a via TLR4-IL-1beta (157).

A sitagliptina aliviou a lesão hepática causada pela tioacetamida em camundongos, diminuindo o NLRP3 e exercendo efeitos antiapoptóticos (158). Em relação à ativação do PPAR-alfa, a oleiletanolamida protegeu contra a lesão hepática induzida por LPS em camundongos, suprimindo o NLRP3 (159). No entanto, o presente estudo é o primeiro a relatar os efeitos de ambas as drogas e sua combinação no eixo entero-hepático em camundongos alimentados com dieta HF. A Figura 33 resume nossas principais descobertas.

Algumas limitações do presente estudo incluem a ausência de avaliações de camundongas fêmeas para determinar possível dimorfismo sexual, a falta de medidas de concentração de glicose plasmática e a incapacidade de determinar as concentrações plasmáticas de LBP, embora sua expressão gênica tenha sido avaliada. Pesquisas futuras

também devem incluir a avaliação de gêneros e famílias no filo *Proteobacteria*, pois parece estar envolvido na evolução prejudicial da DHGNA.

Figura 33 – Representação esquemática dos principais efeitos do tratamento com o agonista PPAR-alfa e do inibidor da DPP4 sobre o eixo entero-hepático



Legenda: O esquema mostra que a associação do agonista PPAR-alfa com o inibidor da DPP-4 foi eficaz para restaurar o epitélio intestinal danificado e contornar a disbiose intestinal decorrentes do consumo crônico de dieta hiperlipídica. Os tratamentos restauraram a permeabilidade intestinal, contribuindo para bloquear a migração de endotoxinas, o que minimizou a inflamação e a esteatose no tecido hepático.

Fonte: A autora, 2022. Elaborado com o biorender (www.biorender.com)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que os camundongos alimentados com dietas HFRU ou HF apresentaram comprometimento da barreira intestinal e alteração na diversidade filogenética da microbiota intestinal, o que tem sido associado a doenças metabólicas. Como consequência, a disbiose intestinal contribuiu para o influxo de LPS no fígado causando endotoxemia. O eixo entero-hepático prejudicado favorece o dano hepático, tornando o fígado mais suscetível à DHGNA por meio de sinais pró-inflamatórios (regulação positiva de TLR4).

Ainda não é claro se as desordens da função da barreira intestinal associadas às alterações na diversidade filogenética da microbiota intestinal representam um fator etiológico primário na predisposição do desenvolvimento da DHGNA. No entanto, evidências experimentais identificaram que patógenos bacterianos comprometem o eixo entero-hepático.

O tratamento com o agonista PPAR-alfa e o inibidor de DPP-4 isolados ou em associação, modularam a microbiota intestinal e resgataram a expressão de genes associados à integridade da barreira intestinal e a densidade numérica de células caliciformes, mitigando a endotoxemia e a esteatose hepática por meio de sinalização anti-inflamatória. Diante dos efeitos benéficos dos tratamentos encontrados, ambos se tornaram possíveis estratégias terapêuticas para o espectro de doenças da DHGNA.

REFERÊNCIAS

1. Lambertz J, Weiskirchen S, Landert S, Weiskirchen R. Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1159.
2. Paniagua JA, Escandell-Morales JM, Gil-Contreras D, Berral de la Rosa FJ, Romero-Jimenez M, Gomez-Urbano A, et al. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. *Nutrition*. 2014;30(2):177-85.
3. Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C, et al. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One*. 2014;9(12):e115148.
4. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412-25.
5. Matsushita N, Osaka T, Haruta I, Ueshiba H, Yanagisawa N, Omori-Miyake M, et al. Effect of Lipopolysaccharide on the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Caloric Diet-Fed Mice. *Scand J Immunol*. 2016;83(2):109-18.
6. Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*. 2015;48(13-14):923-30.
7. Liu J, Zhuang ZJ, Bian DX, Ma XJ, Xun YH, Yang WJ, et al. Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41(7):482-8.
8. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69.
9. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(8):1012-9.
10. Sato N, Nakamura Y, Yamadera S, Inagaki M, Kenmotsu S, Saito H, et al. Linagliptin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Concentration-Dependently And -Independently. *J Inflamm Res*. 2019;12:285-91.
11. Manoharan I, Suryawanshi A, Hong Y, Ranganathan P, Shanmugam A, Ahmad S, et al. Homeostatic PPARalpha Signaling Limits Inflammatory Responses to Commensal Microbiota in the Intestine. *J Immunol*. 2016;196(11):4739-49.
12. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):9-21.
13. de Oliveira Correia BR, Rachid TL, de Oliveira Glauser JS, Martins FF, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. High dose of linagliptin induces thermogenic beige

adipocytes in the subcutaneous white adipose tissue in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Endocrine*. 2019;65(2):252-62.

14. Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, Nagata N, Xu L, Mukaida N, et al. DPP-4 Inhibition by Linagliptin Attenuates Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance by Regulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Diabetes*. 2016;65(10):2966-79.

15. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch*. 2011;459(5):477-85.

16. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc*. 2011;243(1):47-59.

17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

18. Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients*. 2018;10(6).

19. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;402:86-94.

20. Shigeto M, Ramracheya R, Tarasov AI, Cha CY, Chibalina MV, Hastoy B, et al. GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest*. 2015;125(12):4714-28.

21. Miranda CS, Silva-Veiga F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim-De-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat- and high-fructose-fed mice. *Nutrition*. 2020;78:110791.

22. Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Brooling J, Ghatora K, Farrell GC. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14,643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(2):341-50.

23. Takahashi H, Sanada K, Nagai H, Li Y, Aoki Y, Ara T, et al. Over-expression of PPAR α in obese mice adipose tissue improves insulin sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(1):108-14.

24. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):58-65.

25. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33(9):496-503.

26. Candido FG, Valente FX, Grzeskowiak LM, Moreira APB, Rocha D, Alfenas RCG. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr*. 2018;69(2):125-43.
27. Pajcecki D, de Oliveira LC, Sabino EC, de Souza-Basqueira M, Dantas ACB, Nunes GC, et al. Changes in the intestinal microbiota of superobese patients after bariatric surgery. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019;74:e1198.
28. De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? *J Transl Med*. 2019;17(1):169.
29. WHO. Obesity and Overweight. 2020.
30. Shao Y, Ding R, Xu B, Hua R, Shen Q, He K, et al. Alterations of Gut Microbiota After Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy in Sprague-Dawley Rats. *Obes Surg*. 2017;27(2):295-302.
31. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018;128(2):545-55.
32. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094-104.
33. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology*. 2014;59(5):1738-49.
34. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018;68(5):1063-75.
35. Zhou GY, Yi YX, Jin LX, Lin W, Fang PP, Lin XZ, et al. The protective effect of juglanin on fructose-induced hepatitis by inhibiting inflammation and apoptosis through TLR4 and JAK2/STAT3 signaling pathways in fructose-fed rats. *Biomed Pharmacother*. 2016;81:318-28.
36. Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*. 2016;151(4):733-46 e12.
37. Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaff MJ, Wehkamp J, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr*. 2017;147(5):770-80.
38. Pearce SC, Al-Jawadi A, Kishida K, Yu S, Hu M, Fritzky LF, et al. Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biol*. 2018;16(1):19.

39. Blech S, Ludwig-Schwellinger E, Grafe-Mody EU, Withopf B, Wagner K. The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(4):667-78.
40. Fuchs H, Runge F, Held HD. Excretion of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin in rats is primarily by biliary excretion and P-gp-mediated efflux. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(5):533-8.
41. Reimer RA, Grover GJ, Koetzner L, Gahler RJ, Lyon MR, Wood S. Combining sitagliptin/metformin with a functional fiber delays diabetes progression in Zucker rats. *J Endocrinol*. 2014;220(3):361-73.
42. Navarro-Garcia F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun*. 2010;78(10):4101-9.
43. Su YR, Hong YP, Mei FC, Wang CY, Li M, Zhou Y, et al. High-Fat Diet Aggravates the Intestinal Barrier Injury via TLR4-RIP3 Pathway in a Rat Model of Severe Acute Pancreatitis. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:2512687.
44. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
45. Tirapegui J. *Nutrição, fundamentos e aspectos atuais*. 3, editor: Atheneu; 2013.
46. Echeverria F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016;114:28-34.
47. Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res*. 2020;151(1):11-21.
48. Hernandez-Rodas MC, Valenzuela R, Echeverria F, Rincon-Cervera MA, Espinosa A, Illesca P, et al. Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Extra Virgin Olive Oil Prevents Liver Steatosis Induced by a High-Fat Diet in Mice through PPAR-alpha and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF-kB Downregulation. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(12).
49. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*. 2012;15(3):279-91.
50. Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R. Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(1):3-15.
51. Shao Y, Guo Y, Wang Z. beta-1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Poult Sci*. 2013;92(7):1764-73.

52. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):3-20; quiz 1-2.
53. Lueschow SR, McElroy SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front Immunol*. 2020;11:587.
54. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited: (Trends in Cell Biology 30, 805-817, 2020). *Trends Cell Biol*. 2020;30(12):1014.
55. Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol*. 1993;120(2):477-83.
56. Rose EC, Odle J, Blikslager AT, Ziegler AL. Probiotics, Prebiotics and Epithelial Tight Junctions: A Promising Approach to Modulate Intestinal Barrier Function. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
57. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-34.
58. Qin J LR, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59-65.
59. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
60. Zheng DL, Timur, Elinav, Eran Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Nature* 2020;30:492-506.
61. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70 Suppl 1:S38-44.
62. Siezen RJ, Kleerebezem M. The human gut microbiome: are we our enterotypes? *Microb Biotechnol*. 2011;4(5):550-3.
63. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019;20(4):461-72.
64. de Faria Ghetti F, Oliveira DG, de Oliveira JM, de Castro Ferreira L, Cesar DE, Moreira APB. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Nutr*. 2018;57(3):861-76.
65. Rogers ASD, Renée Z. *Comparative Anatomy and Histology* 2012.
66. Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors J, Kohler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):869-78.
67. Junqueira LCC, José. *Histologia Básica - Texto e Atlas*: Guanabara Koogan; 2013.

68. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
69. Adeva-Andany MM, Perez-Felpete N, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Pazos-Garcia C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep*. 2016;36(6).
70. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl(Suppl):S138-43.
71. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20314-26.
72. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(3):210-5.
73. Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2013;8(5):e64258.
74. Wu TC, Chen LK, Tsai SH, Liaw YH, Hwang B. Hepatic steatosis: an experimental model for quantification. *Arch Gerontol Geriatr*. 2011;52(2):164-6.
75. Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X, et al. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol*. 2016;230(2):227-37.
76. Scheeren PW, Adriana. Predizendo a infidelidade conjugal. *Periódicos Eletrônicos em Psicologia*. 2019;31(2).
77. Peeters A, Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Baes M. Hepatosteatosis in peroxisome deficient liver despite increased beta-oxidation capacity and impaired lipogenesis. *Biochimie*. 2011;93(10):1828-38.
78. Raza S, Rajak S, Upadhyay A, Tewari A, Anthony Sinha R. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021;26(2):206-37.
79. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
80. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):386-95.
81. Simoes ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;95:93-9.
82. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.

83. Brown CM, Dulloo AG, Montani JP. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 6:S28-34.
84. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4387.
85. Albhaisi SAM, Bajaj JS, Sanyal AJ. Role of gut microbiota in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020;318(1):G84-G98.
86. Wong VW, Singal AK. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019;4:53.
87. Zhuang X, Sun F, Li L, Jiang D, Li X, Sun A, et al. Therapeutic Effect of Metformin on Chemerin in Non-Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Clin Lab*. 2015;61(10):1409-14.
88. Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F, et al. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol*. 2016;229(2):133-44.
89. Suk KT, Kim DJ. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(3):193-204.
90. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*. 2018;27(11):1876-92.
91. Coll T, Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol*. 2009;2(1):46-55.
92. Tavares V, Hirata MH, Hirata RD. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(4):526-33.
93. Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(9):1083-99.
94. Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(12):469-74.
95. De Bosscher K, Desmet SJ, Clarisse D, Estebanez-Perpina E, Brunsveld L. Nuclear receptor crosstalk - defining the mechanisms for therapeutic innovation. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(7):363-77.
96. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
97. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):809-18.

98. Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*. 2021;114:154338.
99. Xavier HT. Farmacologia dos fibratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005;85(5).
100. Gomes MdB. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. *Arquivos Brasileiros de endocrinologia e Metabologia*. 2006;50(2).
101. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993;32(21):5598-604.
102. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*. 1997;46(8):1319-27.
103. Mirza AZ, Althagafi, II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*. 2019;166:502-13.
104. Shearer BG, Billin AN. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):1082-93.
105. Peters JM, Hollingshead HE, Gonzalez FJ. Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115(4):107-27.
106. Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol*. 2011;164(1):68-82.
107. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie*. 2017;140:106-16.
108. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*. 2004;37(1):3-15.
109. Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1202-14.
110. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2003;38(1):123-32.

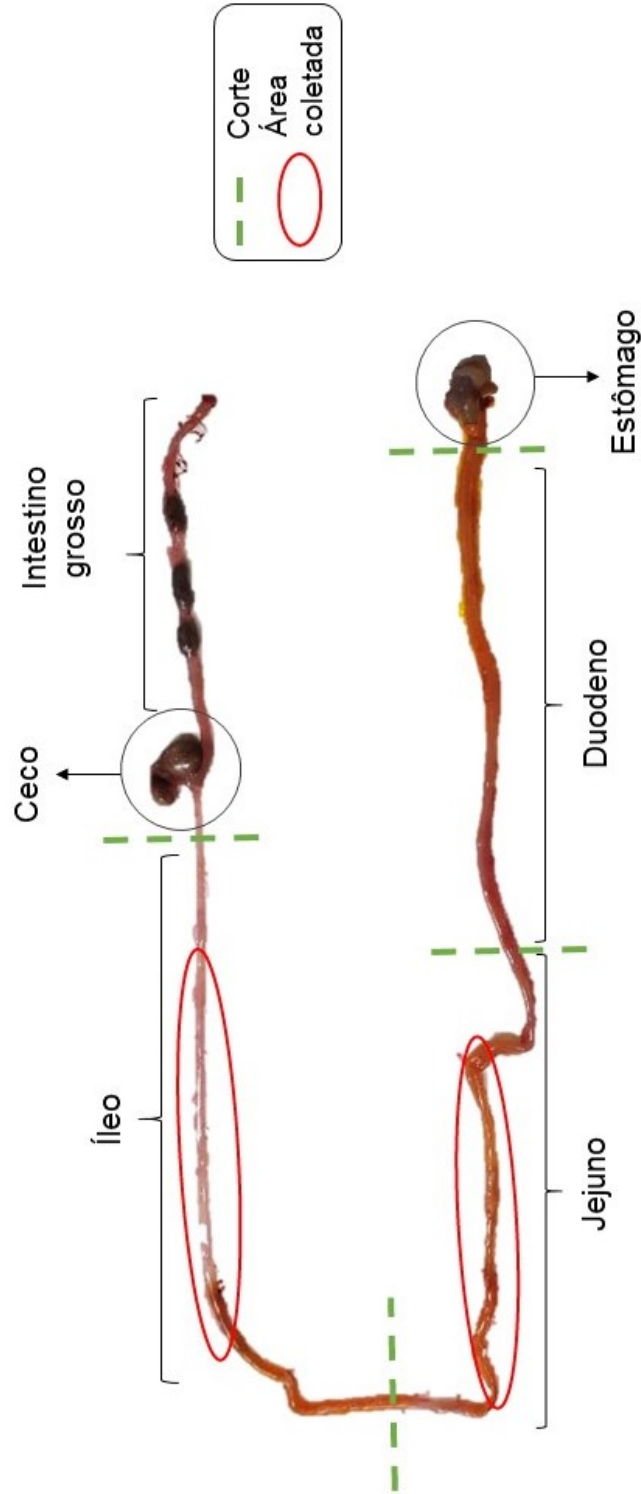
111. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol.* 2006;536(1-2):182-91.
112. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct.* 2003;28(2):105-12.
113. Chen L, Yang G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2014;2014:653017.
114. Rigano D, Sirignano C, Taglialatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPARalpha. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(4):427-38.
115. Michalowska J, Miller-Kasprzak E, Bogdanski P. Incretin Hormones in Obesity and Related Cardiometabolic Disorders: The Clinical Perspective. *Nutrients.* 2021;13(2).
116. Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiol Behav.* 2012;106(3):387-93.
117. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006;368(9548):1696-705.
118. Aroor AR, Manrique-Acevedo C, DeMarco VG. The role of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors in management of cardiovascular disease in diabetes; focus on linagliptin. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):59.
119. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab.* 2013;17(6):819-37.
120. McGill JB. Linagliptin for type 2 diabetes mellitus: a review of the pivotal clinical trials. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2012;3(4):113-24.
121. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwers DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2011;60(7):1917-25.
122. Sell H, Bluher M, Kloting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care.* 2013;36(12):4083-90.
123. Baumeier C, Schluter L, Saussenthaler S, Laeger T, Rodiger M, Alaze SA, et al. Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 2017;6(10):1254-63.
124. Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Rychlicki C, Agostinelli L, De Minicis S, Candelaresi C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation stimulates hepatic lipid oxidation and restores hepatic signalling alteration induced by a high-fat diet in nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2011;31(9):1285-97.

125. Tomas E, Wood JA, Stanojevic V, Habener JF. GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide inhibits weight gain and attenuates diabetes and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Regul Pept.* 2011;169(1-3):43-8.
126. Kern M, Kloting N, Niessen HG, Thomas L, Stiller D, Mark M, et al. Linagliptin improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *PLoS One.* 2012;7(6):e38744.
127. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
128. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):61-8.
129. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
130. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
131. Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Gene.* 1994;147(2):157-60.
132. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9351507.
133. Caussy C, Hsu C, Lo MT, Liu A, Bettencourt R, Ajmera VH, et al. Link between gut-microbiome derived metabolite and shared gene-effects with hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD. *Hepatology.* 2018;68(3):918-32.
134. Panasevich MR, Meers GM, Linden MA, Booth FW, Perfield JW, 2nd, Fritsche KL, et al. High-fat, high-fructose, high-cholesterol feeding causes severe NASH and cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;314(1):E78-E92.
135. Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I, Lu J, Steardo A, et al. Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR-alpha activation. *Gut.* 2014;63(8):1300-12.
136. Di Paola M, Bonechi E, Provensi G, Costa A, Clarke G, Ballerini C, et al. Oleoylethanolamide treatment affects gut microbiota composition and the expression of intestinal cytokines in Peyer's patches of mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):14881.
137. Birchenough GM, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergstrom JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):712-9.
138. Burgueno JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(5):263-78.

139. Hiromura M, Nohtomi K, Mori Y, Kataoka H, Sugano M, Ohnuma K, et al. Caveolin-1, a binding protein of CD26, is essential for the anti-inflammatory effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on human and mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):223-9.
140. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Diabetologia*. 2011;54(2):339-49.
141. Lua I, Li Y, Zagory JA, Wang KS, French SW, Sevigny J, et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J Hepatol*. 2016;64(5):1137-46.
142. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine*. 2015;50(2):355-67.
143. Jojima T, Tomotsune T, Iijima T, Akimoto K, Suzuki K, Aso Y. Empagliflozin (an SGLT2 inhibitor), alone or in combination with linagliptin (a DPP-4 inhibitor), prevents steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8:45.
144. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Martins FF, Daleprane JB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linagliptin. *J Endocrinol*. 2020;247(1):11-24.
145. Dunnett CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. *Journal of the American Statistical Association*. 1980;75:796-800.
146. Ortigao R, Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Libanio D. Gastrointestinal Microbiome - What We Need to Know in Clinical Practice. *GE Port J Gastroenterol*. 2020;27(5):336-51.
147. Borisova MA, Achasova KM, Morozova KN, Andreyeva EN, Litvinova EA, Ogienko AA, et al. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. *Sci Rep*. 2020;10(1):21135.
148. Meyer R. Comment on Guenette, S.A., Beaudry, F., Marier, J.F., and Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 265-270. *J Vet Pharmacol Ther*. 2007;30(1):91; author reply 2.
149. Stojanovic O, Altirriba J, Rigo D, Spiljar M, Evrard E, Roska B, et al. Dietary excess regulates absorption and surface of gut epithelium through intestinal PPARalpha. *Nat Commun*. 2021;12(1):7031.
150. Allam MM, Ibrahim RM, El Gazzar WB, Said MA. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor downregulates HMGB1/TLR4/NF-kappaB signaling pathway in a diabetic rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Physiol Biochem*. 2021:1-9.

151. Ta NN, Li Y, Schuyler CA, Lopes-Virella MF, Huang Y. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits TLR4-mediated ERK activation and ERK-dependent MMP-1 expression by U937 histiocytes. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):429-35.
152. Molinaro E, Andrikou K, Casadei-Gardini A, Rovesti G. BRCA in Gastrointestinal Cancers: Current Treatments and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
153. Nielsen MC, Hvidbjerg Gantzel R, Claria J, Trebicka J, Moller HJ, Gronbaek H. Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Cells*. 2020;9(5).
154. Darkhal P, Gao M, Ma Y, Liu D. Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of Il-13 gene in mice. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(8):1292-9.
155. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1).
156. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol*. 2017;66(5):1037-46.
157. Dai Y, Dai D, Wang X, Ding Z, Mehta JL. DPP-4 inhibitors repress NLRP3 inflammasome and interleukin-1beta via GLP-1 receptor in macrophages through protein kinase C pathway. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(5):425-32.
158. El-Kashef DH, Serrya MS. Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acute liver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice. *Life Sci*. 2019;228:266-73.
159. Hu J, Zhu Z, Ying H, Yao J, Ma H, Li L, et al. Oleoylethanolamide Protects Against Acute Liver Injury by Regulating Nrf-2/HO-1 and NLRP3 Pathways in Mice. *Front Pharmacol*. 2020;11:605065.

APÊNDICE – Representação esquemática da anatomia do intestino do camundongo



ANEXO – Aprovação do COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da capsaicina e de agonistas PPAR no remodelamento do tecido adiposo, fígado e intestino de camundongos alimentados com excesso de lipídios ou frutose", registrada com o nº 041/2018, sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Mello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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, 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), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 31/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	80
Peso/idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

AUTHOR COPY ONLY

Journal of
EndocrinologyF M Silva-Veiga *et al.*Treatments to NAFLD by
microbiota modulation

247:1

11–24

RESEARCH

**Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice:
a role for PPAR-alpha and linagliptin**Flávia Maria Silva-Veiga¹, Caroline Santos Miranda¹, Fabiane Ferreira Martins¹, Julio Beltrame Daleprane²,
Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda¹ and Vanessa Souza-Mello¹¹Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil²Laboratory for Studies of Interactions between Nutrition and Genetics, LEING, Institute of Nutrition, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BrazilCorrespondence should be addressed to V Souza-Mello: souzamello.uerj@gmail.com**Abstract**

Fructose dietary intake affects the composition of the intestinal microbiota and influences the development of hepatic steatosis. Endotoxins produced by gram-negative bacteria alter intestinal permeability and cause bacterial translocation. This study evaluated the effects of gut microbiota modulation by a purified PPAR-alpha agonist (WY14643), a DPP-4 inhibitor (linagliptin), or their association on intestinal barrier integrity, endotoxemia, and hepatic energy metabolism in high-fructose-fed C57BL/6 mice. Fifty mice were divided to receive the control diet (C group) or the high-fructose diet (HFRU) for 12 weeks. Subsequently, the HFRU group was divided to initiate the treatment with PPAR-alpha agonist (3.5 mg/kg/BM) and DPP-4 inhibitor (15 mg/kg/BM). The HFRU group had glucose intolerance, endotoxemia, and dysbiosis (with increased Proteobacteria) without changes in body mass in comparison with the C group. HFRU group showed damaged intestinal ultrastructure, which led to liver inflammation and marked hepatic steatosis in the HFRU group when compared to the C group. PPAR-alpha activation and DPP-4 inhibition countered glucose intolerance, endotoxemia, and dysbiosis, ameliorating the ultrastructure of the intestinal barrier and reducing *Tlr4* expression in the liver of treated animals. These beneficial effects suppressed lipogenesis and mitigated hepatic steatosis. In conclusion, the results herein propose a role for PPAR-alpha activation, DPP-4 inhibition, and their association in attenuating hepatic steatosis by gut-liver axis modulation in high-fructose mice model. These observations suggest these treatments as potential targets to treat hepatic steatosis and avoid its progression.

Key Words

- fructose
- hepatic steatosis
- gut microbiota
- PPAR-alpha
- DPP-4 inhibition

Journal of Endocrinology
(2020) **247**, 11–24

Introduction

Non-transmissible chronic diseases (NCDs) are becoming increasingly important in global public health. Although NCDs may be related to genetic factors and dietary habits, they represent a significant and modifiable factor for human health. Fructose intake has increased in recent years due to ultra-processed food intake and causes lipotoxicity with ectopic lipid deposition (Lambertz *et al.* 2017).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by intrahepatic lipid accumulation and is considered the hepatic component of the metabolic syndrome (Paniagua *et al.* 2014). An innovative concept proposes that the gut-liver axis plays a crucial role in the genesis and progression of NAFLD, as excessive fructose consumption alters the composition of the gut microbiota

<https://joe.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/JOE-20-0139>

© 2020 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain



Submit a Manuscript: <https://www.fupublishing.com>

World J Gastroenterol 2022 May 7; 28(17): 1814-1829

DOI: 10.3748/wjg.v28.i17.1814

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and dipeptidyl peptidase-4 inhibition target dysbiosis to treat fatty liver in obese mice

Flavia Maria Silva-Veiga, Caroline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Henrique Souza-Tavares, Fabiane Ferreira Martins, Julio Beltrame Daleprane, Vanessa Souza-Mello

Specialty type: Gastroenterology and hepatology

Provenance and peer review: Invited article; Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's scientific quality classification

Grade A (Excellent): 0
Grade B (Very good): B, B
Grade C (Good): 0
Grade D (Fair): 0
Grade E (Poor): 0

P-Reviewer: Dmielewska-Gesjak S, Poland; Li YL, China

Received: December 30, 2021

Peer-review started: December 30, 2021

First decision: January 27, 2022

Revised: February 4, 2022

Accepted: March 26, 2022

Article in press: March 26, 2022

Published online: May 7, 2022



Flavia Maria Silva-Veiga, Caroline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Henrique Souza-Tavares, Fabiane Ferreira Martins, Vanessa Souza-Mello, Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

Julio Beltrame Daleprane, Department of Clinical and Toxicology Analysis, State University of Rio de Janeiro, Nutrition Institute, State University of Rio de Janeiro, Nutrition Institute, University of Sao Paulo, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

Corresponding author: Vanessa Souza-Mello, PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Blvd. 28 de Setembro 87, Fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil. souzamello.nerj@gmail.com

Abstract

BACKGROUND

Obesity and comorbidities onset encompass gut dysbiosis, altered intestinal permeability, and endotoxemia. Treatments that target gut dysbiosis can cope with obesity and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) management. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation and dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) inhibition alleviate NAFLD, but the mechanism may involve gut microbiota modulation and merits further investigation.

AIM

To address the effects of PPAR-alpha activation and DPP-4 inhibition (isolated or combined) upon the gut-liver axis, emphasizing inflammatory pathways in NAFLD management in high-fat-fed C57BL/6J mice.

METHODS

Male C57BL/6J mice were fed a control diet (C, 10% of energy as lipids) or a high-fat diet (HFD, 50% of energy as lipids) for 12 wk, when treatments started, forming the groups: C, HF, HFA (HFD + PPAR-alpha agonist WY14643, 2.5 mg/kg body mass), HFL (HFD + DPP-4 inhibitor linagliptin, 15 mg/kg body mass), and HFC (HFD + the combination of WY14643 and linagliptin).

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/NTR

Original Research

A rise in *Proteobacteria* is an indicator of gut-liver axis-mediated nonalcoholic fatty liver disease in high-fructose-fed adult mice[☆]



Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro^{a,b}, Flávia Maria Silva-Veiga^a,
Carolline Santos Miranda^a, Édina Castello Branco de Andrade Gonçalves^b,
Julio Beltrame Daleprane^c, Vanessa Souza-Mello^{a,*}

^a Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratory of bioactive compounds, LABBIO, School of Nutrition, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratory for Studies of Interactions Between Nutrition and Genetics, LEING, Institute of Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2020

Revised 17 April 2021

Accepted 30 April 2021

Keywords:

Fructose

NAFLD

Proteobacteria

Gut microbiota, LPS

ABSTRACT

Current evidence suggests that high fructose intake results in gut dysbiosis, leading to endotoxemia and NAFLD onset. Thus, the hypothesis of the study was that an enhanced *Proteobacteria* proportion in the cecal microbiota could be the most prominent trigger of NAFLD through enhanced endotoxin (LPS) in adult high-fructose-fed C57BL/6 mice. Male C57BL/6 mice received a control diet (n = 10, C: 76% of energy as carbohydrates, 0% as fructose) or high-fructose diet (n = 10, HFRU: 76% of energy as carbohydrate, 50% as fructose) for 12 weeks. Outcomes included biochemical analyses, 16S rDNA PCR amplification, hepatic stereology, and RT-qPCR. The groups showed similar body masses during the whole experiment. However, the HFRU group showed greater water intake and blood pressure than the C group. The HFRU group showed a significantly lower amount of *Bacteroidetes* and a predominant rise in *Proteobacteria*, implying increased LPS. The HFRU group also showed enhanced *de novo* lipogenesis (*Chrebp* expression), while beta-oxidation was decreased (*Ppar-alpha* expression). These results agree with the deposition of fat droplets within hepatocytes and the enhanced hepatic triacylglycerol concentrations, as observed in the photomicrographs, where the HFRU group had a higher volume density of steatosis than the C group. Thus, we

[☆] Abbreviations: AMP, adenosine monophosphate; AMPK, Activated Protein Kinase; ATP, adenosine triphosphate; AUC, Area Under the Curve; BM, Body mass; C, Control diet; *Chrebp*, Carbohydrate-responsive element-binding protein; HSC, Hepatic Stellate Cells; HFRU, High-fructose diet; LPS, Lipopolysaccharides; NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; NASH, Nonalcoholic Steatohepatitis; OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; *Ppar*, Peroxisome proliferator-activated receptor; Pp, Partial points; PT, Teste points; rRNA, ribosomal RNA; RT-qPCR, Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; Vv, Volume density

* Corresponding author at: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (+55.21) 2868.8689

E-mail address: souzamello.uerj@gmail.com (V. Souza-Mello).

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.04.008>

0271-5317/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas

Aline Fernandes-da-Silva¹ · Caroline Santos Miranda¹ · Daiana Araujo Santana-Oliveira¹ · Brenda Oliveira-Cordeiro¹ · Camilla Rangel-Azevedo¹ · Flávia Maria Silva-Veiga¹ · Fabiane Ferreira Martins¹ · Vanessa Souza-Mello¹

Received: 11 July 2020 / Accepted: 11 March 2021
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Obesity challenges lipid and carbohydrate metabolism. The resulting glucolipotoxicity causes endoplasmic reticulum (ER) dysfunction, provoking the accumulation of immature proteins, which triggers the unfolded protein reaction (UPR) as an attempt to reestablish ER homeostasis. When the three branches of UPR fail to correct the unfolded/misfolded proteins, ER stress happens. Excessive dietary saturated fatty acids or fructose exhibit the same impact on the ER stress, induced by excessive ectopic fat accumulation or rising blood glucose levels, and meta-inflammation. These metabolic abnormalities can alleviate through dietary interventions. Many pathways are disrupted in adipose tissue, liver, and pancreas during ER stress, compromising browning and thermogenesis, favoring hepatic lipogenesis, and impairing glucose-stimulated insulin secretion within pancreatic beta cells. As a result, ER stress takes part in obesity, hepatic steatosis, and diabetes pathogenesis, arising as a potential target to treat or even prevent metabolic diseases. The scientific community seeks strategies to alleviate ER stress by avoiding inflammation, apoptosis, lipogenesis suppression, and insulin sensitivity augmentation through pharmacological and non-pharmacological interventions. This comprehensive review aimed to describe the contribution of excessive dietary fat or sugar to ER stress and the impact of this adverse cellular environment on adipose tissue, liver, and pancreas function.

Keywords ER stress · Fructose · High-fat diet · Inflammation · Obesity · Insulin resistance

Introduction

Obesity pandemics have drawn the scientific community's attention to its etiology and possible strategies to treat or prevent it [1]. Obesity comprises a chronic systemic low-grade inflammation, known as meta-inflammation, which disrupts adipose tissue (AT) homeostasis and triggers insulin resistance (IR), AT dysfunction, and lipotoxicity [2, 3].

Lipotoxicity, the term used to describe the noxious effects of excessive fat accumulation on non-adipose tissues, impairs several metabolic pathways at peripheral organs [4]. As the positive energy balance gets chronic, AT fails to buffer the excessive energy inflow and divert fat to

other organs, causing ectopic fat accumulation (steatosis) [5]. Much as mitochondria are most studied due to their role in thermogenesis and fatty acid oxidation [6, 7], another cellular organelle, the endoplasmic reticulum (ER), is also critical to maintaining metabolic homeostasis [8].

At the cellular level, the ER is an essential organelle for the synthesis, maturation, folding, post-translational modifications, assembly, trafficking, and secretion of proteins, calcium homeostasis, and lipids synthesis [9]. It is an extra-nuclear membrane network in which immature proteins undergo folding by chaperones and other modifications such as N-glycosylation during their maturation. Only the folded proteins are transported to the Golgi apparatus [10]. Thus, a well-developed protein quality control system (PQCS) helps to identify possible mistakes in the folding process, consisting of unfolded protein response (UPR), ER-associated degradation (ERAD), and autophagy [8].

The unfolded/misfolded proteins are usually retained within the ER, transferred to the cytoplasm via ERAD, and degraded in the proteasomes. Consequently, it is crucial to

Vanessa Souza-Mello
 souzamello.uerj@gmail.com

¹ Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjournal.com

Original Investigation

PPAR- α activation counters brown adipose tissue whitening: a comparative study between high-fat– and high-fructose– fed mice

Carolline Santos Miranda M.Sc., Flavia Silva-Veiga M.Sc., Fabiane Ferreira Martins Ph.D., Tamiris Lima Rachid Ph.D., Carlos Alberto Mandarim-De-Lacerda Ph.D., Vanessa Souza-Mello Ph.D. *

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, the University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Article History:

Received 8 November 2019
Received in revised form 15 January 2020
Accepted 29 January 2020

Keywords:

PPAR- α
Interscapular brown adipose tissue
Whitening
Obesity
Thermogenesis
Fructose

ABSTRACT

Objectives: To examine the effects of a selective peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- α) agonist treatment on interscapular brown adipose tissue (iBAT) whitening, focusing on thermogenic, lipolysis, and lipid oxidation markers in mice fed a high-fat or high-fructose diet.**Methods:** Fifty animals were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% lipids as energy), high-fat diet (HF, 50% lipids as energy), or high-fructose diet (HFRU, 50% fructose as energy) for 12 wk. Each group was redivided to begin the 5-wk treatment, totaling five experimental groups: C, HF, HF- α , HFRU- α , and HFRU- α . The drug was mixed with diet at the dose of 3.5 mg/kg body mass.**Results:** HF group was the heaviest group, and the HF and HFRU groups had glucose intolerance. PPAR- α activation alleviated these metabolic constraints. HF and HFRU groups had negative vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) immunostaining, but only the HF group had a pattern of lipid droplet accumulation that resembled the white adipose tissue, characterizing the whitening phenomenon. Whitening in the HF group was accompanied by decreased expression of genes related to thermogenesis, β -oxidation, and antiinflammatory effects. All of them were augmented by the PPAR- α activation in HF- α and HFRU- α groups, countering the whitening in the HF- α group. Treated groups also had a lower respiratory exchange ratio than untreated groups, suggesting that lipids were used as fuel for the enhanced thermogenesis.**Conclusions:** The PPAR- α agonist countered iBAT whitening by inducing the thermogenic pathway and reducing the lipid droplet size, in addition to enhanced VEGF-A expression, adrenergic stimulus, and lipolysis in HF-fed mice.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obesity has been increasing worldwide [1]. The rising intake of refined sugars from industrialized foods and beverages in the last decades is partly responsible for this epidemic [2]. High-fat diets cause insulin resistance after 8 wk and oxidative stress and low-grade systemic inflammation in the long run [3,4]. The resulting excessive body fat gain elicits adipocytes hypertrophy and hyperplasia, followed by altering adipokine release toward a proinflammatory profile, reduced insulin sensitivity, and impaired

thermogenesis [5,6]. Considering that a significant fraction of humans have active brown adipose tissue (BAT), studies that aim to unravel the role of adaptive thermogenesis inducers have increased scientific relevance [7].

The brown adipocyte is smaller than the white one and has several lipid droplets (LDs) of different sizes, dispersed in a relatively abundant cytoplasm (multilocular), a spherical and slightly central nucleus, and numerous mitochondria [7]. Mitochondria are responsible for the brownish color of BAT, in addition to its role in adaptive thermogenesis. The uncoupling protein 1 (UCP1) is located in the inner mitochondrial membrane and functions as an alternative proton channel, uncoupling oxidative phosphorylation from ATP synthesis and increasing energy expenditure [8,9].

Strategies to increase adaptive thermogenesis have become a promising target for obesity control [10,11]. The thermogenic capacity of BAT, a classical depot, surpasses the beige adipose tissue, an inducible depot [12]. Brown adipocyte dysfunction in

CSM was responsible for generation, collection, assembly, analysis and interpretation of data and drafting the manuscript. PS-V, TLR, and FFM were responsible for generation, collection, assembly, analysis and interpretation of data. CAML was responsible for analysis and interpretation of data and revision of the manuscript. VS-M was responsible for conception and design of the study, analysis and interpretation of data, revision of the manuscript, and supervision.

*Corresponding author. Tel.: +552128688316.

E-mail address: souzaemello.vj@gmail.com (V. Souza-Mello).<https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110791>

0899-9007/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

RESEARCH ARTICLE

Differential actions of PPAR- α and PPAR- β/δ on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice

Tamiris Lima Rachid, Flavia Maria Silva-Veiga, Francielle Graus-Nunes, Isabele Brighenti, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello*

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* souzamello.uerj@gmail.com



Abstract

Background and aims

Obesity compromises adipocyte physiology. PPARs are essential to adipocyte plasticity, but its isolated role in the browning phenomenon is not clear. This study aimed to examine whether activation of PPAR- α or PPAR- β/δ could induce beige cell depots in the subcutaneous white adipose tissue of diet-induced obese mice.

Material and methods

Sixty animals were randomly assigned to receive a control diet (C, 10% lipids) or a high-fat diet (HF, 50% lipids) for ten weeks. Then each group was re-divided to begin the treatments that lasted 4 weeks, totalizing six groups: C, C- α (C plus PPAR- α agonist, 2.5 mg/kg BM), C- β (C plus PPAR- β/δ agonist, 1 mg/kg BM), HF, HF- α (HF plus PPAR- α agonist), HF- β (HF plus PPAR- β/δ agonist).

Results

HF animals presented with overweight, glucose intolerance and subcutaneous white adipocyte hypertrophy. Both treatments significantly attenuated these parameters. Browning, verified by UCP1 positive beige cells and enhanced body temperature, was just observed in PPAR- α treated groups. PPAR- α agonism also elicited an enhanced gene expression of the thermogenesis effector UCP1, the beige-selective gene TMEM26 and the PRDM16, an essential gene for brown-like phenotype maintenance in the beige adipocytes when compared to their counterparts. The enhanced CIDEA and the reduced UCP1 gene levels might justify the white phenotype predominance after the treatment with the PPAR- β/δ agonist.

Conclusions

This work provides evidence that the PPAR- β/δ agonist ameliorated metabolic disorders through enhanced beta-oxidation and better tolerance to glucose, whereas the PPAR- α

OPEN ACCESS

Citation: Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Brighenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V (2018) Differential actions of PPAR- α and PPAR- β/δ on beige adipocyte formation: A study in the subcutaneous white adipose tissue of obese male mice. PLoS ONE 13(1): e0191365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191365>

Editor: Nobuyuki Takahashi, Tokyo University of Agriculture, JAPAN

Received: September 21, 2017

Accepted: January 3, 2018

Published: January 19, 2018

Copyright: © 2018 Rachid et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the "Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro" (www.fapari.br), award numbers: E-26/202.888/2015 and E-26/010.001576/2016 for V.S.-M. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice

Flavia Maria Silva-Veiga, Tamiris Lima Rachid, Letícia de Oliveira, Francielle Graus-Nunes, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello*

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
PPAR-beta
Obesity
Lipogenesis
Beta-oxidation
NAFLD
ER stress

ABSTRACT

Endoplasmic reticulum (ER) stress and hepatic steatosis are intertwined with insulin resistance. PPARs are at the crossroads of these pathways. This study aimed to investigate the effects of GW0742 (PPAR-beta agonist) on hepatic energy metabolism and ER stress in a murine diet-induced obesity model. HF diet caused overweight, hyperinsulinemia, hepatic inflammation (increased NF- κ B, TNF- α , and IL-6 protein expression) and favored hepatic lipogenesis, leading to ER stress, with ultrastructural and molecular alterations, ending up in pro-apoptotic stimulus. GW0742 rescued the overweight and the glucose tolerance, tackled hepatic inflammation and favored hepatic beta-oxidation over lipogenesis. These results comply with ER ultrastructure improvement, reducing ER stress and apoptosis in treated animals. Our results indicate that the PPAR-beta/delta activation alleviated the ER stress by improving the insulin sensitivity and maximizing the hepatic energy metabolism with a shift towards beta-oxidation. PPAR-beta/delta activation could be an essential tool to avoid the NAFLD progression and other obesity constraints.

1. Introduction

Currently, obesity is considered a worldwide epidemic, affecting different age groups in developed and underdeveloped countries (Aasheim and Sovik, 2011). Obesity is a hallmark of insulin resistance (IR) and inflammation development, favoring the type 2 diabetes mellitus (DM2) onset (Seidell and Halberstadt, 2015). Obesity pathogenesis is related to surplus energy intake coupled with reduced energy expenditure (Mokdad et al., 2003). In this regard, excessive saturated fatty acids intake disrupts many pathways, altering the balance among different PPAR isoforms in the liver, tuning it more prone to inflammation and glucolipotoxicity (Valenzuela et al., 2015).

Inflammation and IR frequently affect the liver, a central organ that is crucial to the regulation of energy metabolism (Gustafson and Smith, 2015). IR induces high rates of lipolysis in the white adipose tissue (WAT), reducing its capacity to store lipids and increasing the delivery of non-esterified fatty acids to the liver (De Minicis et al., 2013; Fan and Cao, 2013). Moreover, IR impairs the hepatic mitochondrial beta-oxidation and reduces the hepatic exportation of lipoproteins. As a result, lipid droplets (LDs) are deposited within the hepatic parenchyma, configuring the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Angulo,

2014).

The pathogenesis of NAFLD and endoplasmic reticulum (ER) stress are closely intertwined with IR, overweight and inflammation, showing a rising prevalence worldwide (Hotamisligil, 2010; Saponaro et al., 2015). ER stress is characterized by the formation of poorly folded and unfolded proteins, producing an imbalance between the cellular demand for folding and maturation of proteins, which facilitates the accumulation of unfolded proteins in the lumen of the ER (Yoshida, 2007). The central pathways activated by ER produce a pro-inflammatory effect through the activation of the nuclear factor kappa-B pathway (NF- κ B), linked to hepatic insulin resistance by increasing its target genes tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) (Umut Özcan Qiong Cao et al., 2004).

Hepatic metabolism of fatty acids (FA) appears to be strongly influenced by PPAR-beta/delta target genes, which regulates the expression of genes linked to insulin signaling, FA uptake and transport in the hepatocytes (Jeffrey M. Peters et al., 2008; Souza-Mello, 2015), profoundly influencing the dynamics and size of LDs (de la Rosa Rodríguez and Kersten, 2017). PPARs have fatty acids as ligands, being impaired by excessive HF diet intake (Echeverría et al., 2016). Concomitantly, the ER is also highly responsive to excessive nutrition and

* Corresponding author. Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fcs, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: souza-mello.uef@uef.br (V. Souza-Mello).
URL: <http://www.imm.c.uerj.br> (V. Souza-Mello).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.013>

Received 21 December 2017; Received in revised form 10 March 2018; Accepted 22 March 2018

Available online 23 March 2018

0303-7207/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.