

Universidade do Estado do Rio de Janeiro Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Isabela Macedo Lopes Vasques Monteiro

Efeitos da associação PPAR-alfa e gama, isolados ou em associação, sobre o eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro 2024 Isabela Macedo Lopes Vasques Monteiro

Efeitos da associação do PPAR-alfa e gama, isolados ou em associação, sobre o eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do 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 2024

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

M775	Monteiro, Isabela Macedo Lopes Vasques. Efeitos da associação PPAR-alfa e gama, isolados ou em associação, sobre o eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica/ Isabela Macedo Lopes Vasques Monteiro. – 2024. 89 f.
	Orientadora: Prof. ^a Dra. Vanessa de Souza Mello
	Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.
	1. Disbiose. 2. PPAR alfa - Teses. 3. Endotoxemina - Teses. 4. Pioglitazona. 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 dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Isabela Macedo Lopes Vasques Monteiro

Efeitos da associação do PPAR-alfa e gama, isolados ou em associação, sobre o eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

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. Dra. Patrícia Zancan Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

> Rio de Janeiro 2024

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre incentivarem os meus estudos. A minha mãe, por todo apoio e escuta durante todo esse período. Ao meu pai, de onde estiver, sei que esteve do meu lado me dando forças para continuar. Aos meus irmãos, por serem minhas inspirações na vida. A minha avó, por ser minha base de força e alegria. Ao meu filho de quatro patas, Zeca, por todo carinho e passeios ao ar livre que me distraia e alegrava durante os momentos difíceis de estudos. Ao Felipe, por ser meu companheiro de vida e estar ao meu lado em todos os momentos me dando força, apoio e felicidades.

Aos meus amigos de laboratório, em especial aos 'Vanessetes', por todos os ensinamentos de bancada, pesquisa e de vida. Sem vocês não teria conseguido. A minha dupla, Henrique, por toda parceria desde o início do mestrado, enfrentamos juntos desde as idas ao biotério sem dinheiro da passagem, disciplinas, apresentações, análises, bancada, qualificação, escrita e até agora, a finalização do mestrado. Obrigado também por todas as cervejas, pastel de feira, debates políticos e de reality shows, risadas e análise de resultados juntos.

À minha orientadora, Vanessa, por desde meu período de IC ter me acolhido de portas abertas. Você me inspira como professora, cientista e mulher. Amadureci e aprendi muito ao seu lado. Sempre serei extremamente grata por toda parceria desses anos.

Aos colegas, técnicos, funcionários e professores do laboratório e do programa de pósgraduação por todos ensinamentos e aprendizados durante esse período.

À CAPES e as agências de fomento pelo suporte financeiro deste trabalho e pela bolsa concedida.

Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância

- Simone de Beauvoir

RESUMO

MONTEIRO, Isabela Macedo Lopes Vasques. **Efeitos da associação do PPAR-alfa e gama, isolados ou em associação, sobre o eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.** 2024. 89f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O excesso de gordura saturada na dieta aumenta a concentração plasmática de lipopolissacarídeos (LPS), que compromete a integridade intestinal ao romper as proteínas estruturais das junções oclusivas (TJs) e alterar a permeabilidade intestinal. O extravasamento de LPS ativa TLR4 hepático que induz uma série de respostas inflamatórias, contribuindo pro desenvolvimento da doença hepática gordurosa metabólica (DHGM). Até o presente momento, não existe nenhum tratamento exclusivamente direcionado à DHGM. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) surgem como possíveis alvos para tratamento desta doença. O objetivo desse trabalho é analisar os efeitos da ativação do PPAR-α e do PPAR-γ (isolados ou em associação) no eixo intestino-fígado, com foco na endotoxemia e nas vias inflamatórias hepáticas relacionadas com a DHGM em murinos alimentados com um elevado teor de gordura. Camundongos C57BL/6J machos foram alimentados com uma dieta de controle (C) ou uma dieta rica em gordura (HF) durante 10 semanas. Após as 10 semanas, o grupo HF foi subdividido para receber os tratamentos por 4 semanas: HF, HF- α (WY14643), HF- γ (pioglitazona em baixa dose) e HF- $\alpha\gamma$ (em associação). O ambiente obesogênico da dieta rica em gordura saturada causou excesso de peso, resistência à insulina (RI), disbiose intestinal e expressão deficiente de genes das TJs, levando a endotoxemia, esteatose hepática e inflamação acentuadas. Todos os tratamentos reduziram a massa corporal (MC), a intolerância à glicose e a RI. Em particular, o grupo HF- $\alpha\gamma$ apresentou massa corporal semelhante à do grupo C. Esses benefícios metabólicos restauraram a microbiota intestinal (MI), aumentando as células caliciformes por área, expressão gênica das TJs e de Mucin-2 no intestino. Os tratamentos também reduziram as concentrações plasmáticas de LPS e os genes esteatóticos hepáticos, favorecendo genes relacionados a beta-oxidação em detrimento da lipogênese, reduziram a infiltração de macrófagos no figado e mitigaram a esteatose hepática. O tratamento com agonistas PPARs modulou a MI e a integridade da barreira intestinal, atenuando a esteatose hepática através de sinais anti-inflamatórios. Estes resultados mostram que estes agonistas podem contribuir para o tratamento da DHGM.

Palavras-chave: disbiose intestinal; PPAR; endotoxemia; pioglitazona em baixa dose; doença hepática gordurosa metabólica; células caliciformes.

ABSTRACT

MONTEIRO, Isabela Macedo Lopes Vasques. **Effects of the association of PPAR-alpha and gamma, alone or in combination, on the gut-liver axis of mice fed a high-fat diet.** 2024. 89f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Excess saturated fat in the diet increases the plasma concentration of lipopolysaccharides (LPS), which compromise intestinal integrity by breaking down the structural proteins of tight junctions (TJs) and altering intestinal permeability. LPS leakage activates hepatic TLR4, which induces a series of inflammatory responses, contributing to the development of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD). To date, there is no treatment exclusively aimed at MAFLD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are emerging as possible targets for treating this disease. The aim of this study is to analyze the effects of PPAR- α and PPAR- γ activation (alone or in combination) on the gut-liver axis, focusing on endotoxemia and hepatic inflammatory pathways related MAFLD in highfat-fed mice. Male C57BL/6J were fed a control diet (C) or a high-fat diet (HF) for a 10-week treatment. After 10 weeks, the HF groups was subdivided to receive treatment for 4 weeks: HF, HF- α (WY14643), HF- γ (low-dose pioglitazone), and HF- $\alpha\gamma$ (combination). The obesogenic environment of the high-fat diet caused overweight, insulin resistance, gut dysbiosis, and impaired TJs gene expression, leading to endotoxemia and marked hepatic steatosis. All treatments reduced body mass, glucose intolerance, and insulin resistance. In particular, the HFay group had a similar body mass to the C group. These metabolic benefits restored the gut microbiota diversity, increasing goblet cells per area, TJs and Mucin-2 gene expression in the intestine. Treatments also lowered the plasma LPS concentrations and hepatic steatotic genes, favoring beta-oxidation gene over lipogenesis, reduced macrophage infiltration in the liver, and hepatic steatosis mitigation. Treatment with PPAR agonists modulated the gut microbiota and the integrity of the intestinal barrier, alleviating hepatic steatosis. These results show that these agonists can contribute to metabolic-associated fatty liver disease treatment.

Keywords: gut dysbiosis; PPAR; endotoxemia; low-dose pioglitazone; metabolic-associated fatty liver disease; globet cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Digestão e metabolismo lipídico	17
Figura 2 – Histologia da mucosa intestinal	19
Figura 3 - Estrutura da barreira intestinal	21
Figura 4 – Componentes do lóbulo hepático	24
Figura 5 - Visão geral do metabolismo lipídico hepático	26
Figura 6 - Progressão da doença de um figado saudável para carcinoma hepatocelular	27
Figura 7 – Gatilhos para gênese da DHGM	30
Figura 8 – Mecanismos de ação dos PPARs	34
Figura 9 – Estrutura dos PPARs através de cristalografia de raios X, modelagem	
molecular e técnicas de mapeamento de solventes	36
Figura 10 – Estrutura de ligação entre agonista e receptor PPAR	38
Figura 11 – Evolução da massa corporal semanal e comportamento alimentar	51
Figura 12 – TOTG, ASC, FIRI e níveis plasmáticos de insulina e adiponectina	52
Figura 13 – Microbiota intestinal e expressão relativa de RNAm das junções	
oclusivas intestinais	53
Figura 14 – Fotomicrografia do intestino grosso, imuno-histoquímica para ocludina,	
estereologia Qa [cél. caliciformes] e expressão relativa de RNAm de mucir	na-2
intestinal	55
Figura 15 – Nível plasmático de LPS e expressão relativa de RNAm da cascata de	
endotoxemia hepática	53
Figura 16 – Expressão relativa de RNAm de genes relacionados a lipogênese e beta-	
oxidação hepáticos	57
Figura 17 – Fotomicrografia hepática, imuno-histoquímica para F4/80, Estereologia	
Vv [esteatose] e níveis hepáticos de TAG e colesterol	59
Figura 18 – Resumo gráfico do estudo	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Terapias não específicas usadas no tratamento da DHGM	. 32
Tabela 2 - Composição e conteúdo de energia das dietas experimentais	45
Tabela 3 - Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal	48
Tabela 4 - Sequências de primers RT-qPCR – Fígado	49
Tabela 5 - Sequências de primers RT-qPCR – Intestino	49

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ACC	Acetilcoa Carboxilase			
AF-1	Ativação independente de ligante-1			
AF-2	Ativação independente de ligante-2			
AG	Ácidos graxos			
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta			
AGL	Ácidos Graxos Livres			
AIN-93M	Instituto Americano de Nutrição para a fase de manutenção			
ALP	Fosfatase Alcalina			
ALT	Alanina aminotransferase			
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária			
Apo-A	Apoliproteína A			
ASC	Área Sob a Curva			
AST	Aspartato Aminotransferase			
ATP	Adenosina Trifosfato			
BRAs	Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina			
С	Grupo Controle			
CD14	Receptor Padrão de Reconhecimento De Moléculas 14, do inglês 'Cluster of Differention 14'			
CD36	Proteína que transporta os Ácidos Graxos de Cadeia Longa			
СЕН	Células Estreladas Hepáticas			
СНС	Carcinoma Hepatocelular			
ChREBP	Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo a Carboidratos			
СК	Ciclo de Krebs			
Cpt Ia e II	Carnitina aciltransferase Iα e II			
DHA	Ácido docosahexaenóico			
DHGM	Doença Hepática Gordurosa Metabólica			
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica			
DIO	Obesidade induzida por dieta, do inglês 'diet-induced obesity'			
DM2	Diabetes mellitus tipo 2			

DPP-4	Dipeptidil Peptidase 4		
EPA	Ácido eicosapentaenóico		
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina		
FAS	Ácido graxo sintase		
FATP	Proteínas de Transporte de Ácidos Graxos		
FDA	Federal Drug Administration		
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21		
FIRI	Índice de Resistência à Insulina em Jejum		
GLP-1	Peptídeo 1 Semelhante ao Glucagon		
GLUT4	Transportador de glicose 4		
HDL	Lipoproteína de alta densidade		
HF	Grupo Hiperlipídico		
HF-α	Grupo Hiperlipídico + agonista do PPAR-α WY-14643		
HF-αγ	Grupo Hiperlipídico + tratamento com combinação de agonista do PPAR-alfa e Pioglitazona		
HF-γ	Grupo Hiperlipídico + agonista do PPAR- γ Pioglitazona		
IL	Interleucina		
JAM-A	Molécula de Adesão Juncional-A		
LBD	Domínio de ligação ao ligante, do inglês 'Ligand Binding Domain'		
LBP	Proteína de ligação ao LPS, do inglês 'lipopolysaccharide-binding protein'		
LDL	Lipoproteína de baixa densidade		
LDN	Lipogênese de novo		
LPS	Lipopolissacarídeos		
MAFLD	Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica, do inglês 'Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease'		
MC	Massa Corporal		
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1		
MI	Microbiota Intestinal		
MUC-2	Mucina-2		
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo		
NLRP3	Inflamossoma NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3		
OMS	Organização Mundial de Saúde		

PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos			
PAS	Ácido Periódico de Schiff			
POF	Pesquisas nacionais de orçamento familiar			
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma			
PPARα	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo alfa			
ΡΡΑ R β/δ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo beta/delta			
PPARγ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo gama			
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR			
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados			
QA	Número de Células Caliciformes por Área			
RI	Resistência à insulina			
RN	Receptores nucleares			
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase			
RXR	Receptor retinóide X			
SCD-1	Estearoil-CoA dessaturase-1			
SGLT2	Cotransportador de Sódio-Glicose-2			
SIRT1	Sirtuína 1			
SM	Síndrome metabólica			
SREBP-1	Proteína 1 de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol			
TA	Tecido Adiposo			
TAG	Triacilglicerol			
TJs	Junções Oclusivas, do inglês 'tight junctions'			
TLR	Receptor do tipo Toll			
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa			
TOTG	Teste Oral de tolerância a glicose			
TZDs	Tiazolidinedionas			
Ul	Nível de ingestão superior tolerável			
Vigitel	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico			
Vv	Volume de Esteatose Hepática			
ZOs	Proteínas da Zônula de Oclusão			

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVO	43
1.1	Geral	43
1.2	Específicos	43
2	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1	Animais e dieta	44
2.2	Protocolo experimental	44
2.3	Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal	45
2.4	Teste Oral de tolerância a glicose	46
2.5	Eutanásia e extração de tecido	46
2.6	Análise bioquímica	46
2.7	Histologia e Estereologia	47
2.8	Amplificação 16S rDNA PCR	47
2.9	RT-qPCR	48
2.10	Imunohistoquímica	49
2.11	Análise de dados	50
3	RESULTADOS	51
3.1	Massa corporal, ingestão alimentar e ingestão energética	51
3.2	Resposta glicêmica	51
3.3	Distribuição filogenética da microbiota intestinal e expressões gênicas das	
	junções oclusivas intestinais	52
3.4	Histologia, imuno-histoquímica, estereologia e expressão gênica de	
	mucina-2 intestinal	53
3.5	Endotoxina plasmática e expressão gênica da cascata de	
	endotoxemia no fígado	56
3.6	Expressão gênica de fatores relacionado à lipogênese e beta-	
	oxidação no fígado	56
3.7	Histologia, imuno-histoquímica, estereologia e níveis de TAG e	
	colesterol hepáticos	.57
4	DISCUSSÃO	60

CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A – Aprovação do comitê de ética local	85
ANEXO B – Comprovação de submissão do artigo científico	86
ANEXO C – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do	
mestrado	.87
ANEXO D – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do	
mestrado	88
ANEXO E – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do	
mestrado	89

INTRODUÇÃO

A obesidade é atualmente considerada uma pandemia não transmissível e um dos maiores desafios de saúde global (1). Em 2022, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o excesso de peso corporal foi encontrado em quase 60% dos adultos e foi causa de mais de 1,2 milhão de mortes (2,3). Evidências acumuladas indicam que a obesidade é um risco potencial para alterações metabólicas, incluindo resistência à insulina (RI), intolerância à glicose, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa metabólica (DHGM) e, mais recentemente descrita, composição alterada da microbiota intestinal (MI) (disbiose) (4,5).

O excesso de gordura saturada na dieta aumenta a concentração plasmática de lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina do microbioma intestinal que compromete a integridade intestinal ao romper as proteínas estruturais das junções oclusivas (TJs) e alterar a permeabilidade intestinal (6). A ligação anatômica e funcional do trato digestório e do fígado, através da circulação portal, permite a passagem do LPS para a corrente sanguínea, processo chamado de endotoxemia (7,8). O influxo de produtos bacterianos, incluindo LPS, no fígado aumenta a expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (9). Altas concentrações de LPS foram detectadas na DHGM (popularmente conhecida como "esteatose hepática") em camundongos (10) e em humanos (11). O papel da MI na gênese da esteatose hepática passou a ser investigado após camundongos axênicos (*germ free*) que receberam transplantes fecais de camundongos com esteatose desenvolverem também esta doença (12).

Neste contexto, os medicamentos que aliviam a disbiose intestinal e as alterações hepáticas induzidas pela dieta são pertinentes (13), dada a elevada prevalência e a progressão deletéria da obesidade e que não existe, até o presente momento, nenhum tratamento exclusivamente direcionado à DHGM. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) surgem como possíveis alvos porque são fatores de transcrição que modulam vários processos biológicos desordenados na obesidade, incluindo inflamação, metabolismo de lipídios e glicose, e homeostase energética geral (14).

A ativação da isoforma alfa (PPAR α) reduz a massa corporal e a RI, favorecendo a betaoxidação mitocondrial (8). Por outro lado, a ativação total da isoforma gama (PPAR γ) aumenta a sensibilidade à insulina, embora com hipertrofia de adipócitos e esteatose hepática acentuada (9). A pioglitazona, agonista do PPAR γ , não reduziu a massa corporal e nem resgatou o suprimento neurovascular dos adipócitos marrons na dose de 10 mg/kg (15). Os efeitos da pioglitazona em baixas doses ou da combinação da ativação do PPAR α/γ no eixo intestinofígado são relevantes e sem precedentes no modelo de dieta hiperlipídica. Portanto, este estudo levantou a hipótese de que a ativação combinada do PPAR α/γ modula a MI para um perfil que reduza a endotoxemia e alivia a inflamação hepática com efeitos benéficos para o fígado no modelo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Lipídios: Dieta hiperlipídica

O consumo de alimentos com elevada densidade energética, alta palatabilidade, baixo poder sacietógeno e de fácil absorção, vem aumentando na população nas últimas décadas. Esses alimentos são conhecidos como 'ultraprocessados'(16), são formulações industriais tipicamente prontas para consumo, contêm pouco ou nenhum alimento inteiro em sua composição, além de terem maior densidade energética; maior quantidade de gorduras saturadas e *trans* (hiperlipídicos); menor densidade de fibras e aporte de micronutrientes (17). Esses atributos favorecem o aumento da ingestão alimentar e, portanto, contribuem para o desequilíbrio energético (16).

As pesquisas nacionais de orçamento familiar (POF) indicam aumentos progressivos na compra de alimentos ultraprocessados para consumo domiciliar realizadas pelas famílias brasileiras. De 2002/2003 a 2017/2018, eles passaram de 12,6% para 18,4% do total de energia adquirida nos domicílios do país (18,19). Os ultraprocessados representaram cerca de 20% do total de energia consumida em 2017-2018, sendo maior no sexo feminino, entre adolescentes, pessoas brancas com maior renda e escolaridade, e moradores de áreas urbanas das regiões Sul e Sudeste. Entretanto é importante alertar que nos últimos anos houve um aumento expressivo do consumo de ultraprocessados no grupo populacional de menores níveis de escolaridade e renda (18).

Especificamente sobre gordura saturada, a diretriz de saúde nacional indica a substituição da mesma por lipídios mono e poli-insaturados. O consumo de gordura saturada e trans é relacionado com o aumento de lipoproteína de baixa densidade – colesterol plasmático (LDL-c) e consequentes riscos clínicos (20). De acordo com as recomendações da OMS, o consumo de gordura saturada deve ser limitado a no máximo 10% do total de gordura da alimentação. A recomendação reforça a substituição desta gordura por outra 'mais saudável' (21,22). As limitações do consumo de gordura saturada são decorrentes das repercussões metabólicas, não apenas à nível de metabolismo lipídico, mas também pela sua influência em outros fatores de risco, como a RI e a pressão arterial (20).

Evidências provenientes de revisões sistemáticas e meta-análises de estudos, além de ensaios clínicos randomizados, têm evidenciado a associação entre o consumo de gordura

saturada com o risco de obesidade e diversas doenças crônicas não transmissíveis associadas (23–26). O consumo elevado por um tempo prolongado de dieta hiperlipídica leva a um quadro de hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, o que é determinante para a gênese e desenvolvimento da obesidade (27).

O tecido adiposo (TA) é o principal reservatório energético do organismo. As principais células do TA, adipócitos, são as únicas células que possuem especialização para armazenar lipídios, sem que isso comprometa a sua integridade funcional (28). Entretanto, em períodos prolongados de balanço energético positivo, que resultam do consumo excessivo de alimentos de alta densidade energética, somados à falta de atividade física, a adiposidade aumenta. Esse processo crônico pode levar ao desenvolvimento da obesidade (29,30).

Segundo dados da OMS entre 2015 e 2016, aproximadamente dois bilhões de indivíduos adultos possuíam sobrepeso, sendo um terço desse grupo portador de obesidade - esse valor representa cerca de 13% da população mundial acima de 18 anos (31). No Brasil, o último Vigitel (Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico), realizado em 2023 pelo Ministério da Saúde, mostrou que a frequência de excesso de peso em adultos foi de 61,4% e a frequência de adultos obesos foi de 24,3% (32).

Lipídios: Digestão e metabolismo lipídico

A digestão lipídica ocorre no intestino delgado, onde os sais biliares emulsificam os lipídios formando micelas para facilitar a ação das enzimas lipases. Essas enzimas produzidas pelo pâncreas, expelidas pelo canal pancreático, desembocam no duodeno onde são responsáveis por hidrolisar os triacilglicerois (TAG), liberando ácidos graxos (AG) e glicerol. Os ácidos graxos livres (AGL) formam micelas com sais biliares capazes de atravessar a mucosa intestinal e serão convertidos novamente em TAG (33).

Os TAG, juntamente com o colesterol, são incorporados às proteínas transportadoras, apolipoproteínas-A (Apo-A), formando os quilomícrons. Na estrutura de quilomícrons, os TAG se movem pela corrente sanguínea até chegar nos tecidos metabolizadores de lipídios, sendo o figado o principal órgão (Figura 1). O glicerol é metabolizado por ações enzimáticas até a formação de gliceraldeído-3-fosfato e segue o caminho para via glicolítica (Figura 1) (34,35).

Já os AGL são metabolizados no interior das mitocôndrias onde ocorre a beta-oxidação. Porém, para ser transportado até a mitocôndria, a molécula de AGL, ainda no citosol, é transformada em acil-CoA (através da adição de coenzima A (CoA)). O acil-CoA é transportado para mitocôndria através da ligação com as enzimas carnitina palmitoil transferase I e II (CPT I e CPT II), que se localizam, respectivamente, na membrana externa e interna mitocondrial. Na matriz mitocondrial, a carnitina é substituída pela CoA, formando novamente um acil-CoA que será, então, oxidado pelo processo chamado de beta-oxidação (34).

A beta-oxidação é o processo de catabolismo do AGL que leva à redução da estrutura do AGL de dois em dois carbonos, até convertê-los em acetil-CoA, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e dinucleótido de flavina e adenina (FAD). O acetil-CoA segue para o ciclo do ácido cítrico e os NADs e FADs seguem para a fosforilação oxidativa (Figura 1) (35). Esse processo é inibido na presença de altas concentrações de malonil-CoA por redução na expressão de CPT I. O excesso energético disponível, de carboidratos e lipídios, possui ligação com aumento de malonil-CoA e, consequentemente, redução da beta-oxidação (33).



Figura 1 – Digestão e metabolismo lipídico

Legenda: Os lipídios são emulsificados pelos sais biliares formando micelas. As micelas sofrem ação das lipases que hidrolisam os lipídios liberando AGL e glicerol. Juntamente com os sais biliares, essas moléculas atravessam a mucosa intestinal, e formam os quilomícrons que são transportados até o tecido alvo. O glicerol é metabolizado na via glicolítica. Já os AGLs são convertidos em acil-CoA e através de CPT I e II entram na matriz mitocondrial onde são oxidados. O resultado gera metabólitos para o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa.

Abreviaturas: AGL – Ácido graxo livre; CK – Ciclo de Krebs; CPT I e II - Carnitina palmitoil transferase I e II; FOS – Fosforilação oxidativa; G3P - Gliceraldeído-3-fosfato. Fonte: A autora, 2024

Quando o TA excede sua capacidade de armazenamento, o excesso de gordura 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 deposição lipídica ectópica e doenças metabólicas associadas, como a esteatose hepática (27,36).

Modelo experimental

Modelos experimentais em animais são considerados a base hierárquica das evidências científicas de pesquisas na saúde. Experimentos utilizando animais nas pesquisas são considerados imprescindíveis para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, auxiliam na descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras patologias que acometem os seres vivos (37,38). Como exemplo de contribuições provenientes da experimentação animal, temos a descoberta da insulina e antibióticos que contribuíram para o tratamento de diversas doenças, e o desenvolvimento de vacinas, inclusive contra o SARS-CoV-2 (39).

O modelo experimental mais utilizado para estudos em obesidade e síndrome metabólica (SM) em geral são camundongos da linhagem C57BL/6J. Essa linhagem de camundongos é a mais adequada para o modelo de "obesidade induzida por dieta" (DIO – do inglês *diet-induced obesity*), pois quando alimentados com dieta hiperenergética, desenvolvem obesidade central, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão semelhante a humanos (40).

O consumo excessivo de dieta rica em gordura saturada leva ao desenvolvimento de sobrepeso em camundongos C57BL6/J, o que promove aumento dos níveis de AG, provocando um acúmulo de gordura ectópica amplificando efeitos deletérios sistêmicos (41).

Intestino: Estrutura e Função

O intestino está envolvido em diversos processos do organismo, incluindo: absorção e digestão de nutrientes; modulação imunológica por ser a barreira física e química de conteúdos externos; além de ser o local que contém a maior população de microrganismos do corpo humano, a MI. Camundongos e mosca da fruta *Drosophila melanogaster* são modelos amplamente utilizados para estudar metabolismo intestinal e doenças humanas (42).

O intestino do camundongo, como nos humanos, pode ser separado em intestino delgado e grosso, e apresentam estrutura da mucosa intestinal semelhantes que serão mais detalhadas no tópico seguinte (42). Sendo o intestino delgado a região mais longa do trato digestório, com aproximadamente 7 metros de comprimento em humanos, ele se estende do estômago (piloro) até o intestino grosso (ceco), é dividido em duodeno, jejuno e íleo (43). O revestimento histológico dessas regiões influencia suas funções (44).

O duodeno possui o revestimento da mucosa com numerosas pregas que é ideal para maximizar a digestão e absorção dos nutrientes alimentares, por ser a região que recebe influência dos sucos digestivos hepáticos e pancreáticos. O jejuno possui pregas mais suaves e com presença de vilosidades, ideal para absorção dos nutrientes digeridos pelo estômago e duodeno. Já no íleo, as pregas são menos salientes importante para absorção de vitaminas e sais minerais (44).

O intestino grosso é adaptado para exercer suas funções: absorção de água, formação do bolo fecal e produção do muco. A maior parte do intestino grosso localiza-se dentro da cavidade abdominal, com a última porção na cavidade pélvica. Consiste em oito partes: ceco, apêndice, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e canal anal. A mucosa do intestino grosso é revestida por um epitélio cilíndrico simples formado por enterócitos e células caliciformes. Os enterócitos possuem microvilos, importantes para absorção de água e íons da região, enquanto as células caliciformes serão mais exploradas no tópico a seguir (44).

Intestino: Mucosa intestinal

A mucosa intestinal apresenta diversas estruturas responsáveis por aumentar a área de absorção dos nutrientes. Uma delas são as chamadas 'vilosidades' ou 'vilos', que são projeções alongadas em direção ao lúmen intestinal, que permitem aumentar a área de contato com os alimentos, facilitando a absorção de água e nutrientes. Entre os vilos existem pequenos espaços invaginados chamados de 'criptas', que são responsáveis pela proliferação desse tecido (Figura 2) (44).



Figura 2 – Histologia da mucosa intestinal

Legenda: Fotomicrografia representativa da mucosa intestinal, contendo as vilosidades, criptas, lâmina própria e a musculatura da região. Coloração pararosanilina e azul-de-toluidina. Fonte: Imagem adaptada do Livro - Histologia Básica 10 edição Junqueira e Carneiro (44).

Nas criptas residem as células-tronco intestinais, que produzem um tipo celular denominado, células progenitoras. À medida que, as células progenitoras migram em direção à região apical do intestino, elas podem se diferenciar em: enterócitos, células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas. O intestino apresenta peculiaridades na sua morfologia que lhe confere características distintas em cada região (44).

Especialmente a região do ceco e a extensão do intestino grosso possuem maior quantidade de criptas e poucas vilosidades. Essas regiões possuem uma quantidade muito superior de células caliciformes. Na última década, a célula caliciforme emergiu como grande objeto de estudo pelo seu papel na regulação da barreira intestinal (45–47). São células produtoras de glicoproteínas ácidas do tipo mucinas, a mucina-2 é a proteína presente no muco mais estudada.

Mucina-2 tem a capacidade de fazer ligações cruzadas intramoleculares para aumentar a estabilidade e expansão desse muco. Através da microscopia eletrônica, é possível ver que o muco forma uma estrutura tridimensional em forma de rede com pequenos poros (48). Este aspecto estrutural tem correlação imediata com sua funcionalidade. Dentre suas funções, o muco é capaz de restringir a difusão, a passagem e a aderência de substâncias não desejadas para a lâmina própria (Figura 3). Também absorve água e eletrólitos pelos enterócitos do epitélio da mucosa do intestino grosso, com a consequente formação da matéria fecal. Além disso, reduz a fricção e o atrito mecânico dos conteúdos presentes no lúmen intestinal (49,50).

A integridade da barreira intestinal também é mediada por um complexo proteico denominado 'junções oclusivas', também conhecida como '*tight junctions*' (TJs). As TJs estão localizadas na porção apical da membrana lateral das células epiteliais, constituídas principalmente por três proteínas: claudina, ocludina e molécula de adesão juncional-A (JAM-A) (51). As TJs exercem 'função de porta' por formar uma barreira de permeabilidade que restringe a livre difusão de moléculas no espaço intracelular e 'função de vedação' por atuar como uma barreira que restringe a mistura do domínio da membrana plasmática apical e basolateral (52) (Figura 3).

As claudinas são essenciais para a formação das fitas de TJs, devido a sua ligação com a família das proteínas da zônula de oclusão (ZOs), consideradas como 'proteínas de suporte' que servem de ligação entre as TJs e o citoesqueleto de actina. Acredita-se que a ligação das TJs com o citoesqueleto seja importante para regular a força mecânica e montagem desse complexo proteico. Mais análises são necessárias para examinar a funcionalidade das TJs com actina (52).

As claudinas formam pequenos poros seletivos de carga, enquanto JAM-A regula a formação de poros seletivos de tamanho grande, sendo também essencial para estruturar as TJs

(52). A fosforilação da ocludina tem sido associada com a regulação da interação com as ZOs e com as demais proteínas das TJs. Sendo assim, diferente das demais, a ocludina não desempenha um papel estrutural, mas sim um papel regulador (53). Mais achados sobre a ocludina são incentivados pela literatura.





Legenda: As células caliciformes são produtoras de mucina-2 responsáveis pela estabilidade, ligações, expansão e formação do muco. As TJs restringem a livre difusão de moléculas no espaço intracelular, são formadas principalmente pela: JAM-A, Claudina e Ocludina. Essas proteínas possuem interação com ZO e filamento de actina.

Abreviações: JAM – Molécula de adesão juncional; MUC-2 – Mucina 2; TJs – Junções oclusivas; ZO - Proteínas da zônula de oclusão.

Fonte: A autora, 2024.

Intestino: Microbiota intestinal

O trato digestório é povoado por uma diversidade bacteriana, com aproximadamente 10^{13} - 10^{14} microrganismos, conhecida como MI. Estima-se que exista aproximadamente 3 milhões de genes proveniente do genoma bacteriano, esse material genético da microbiota denomina-se microbioma (54). A quantidade e a diversidade de bactérias são variáveis de acordo com a porção do trato digestório, o número de células bacterianas no estômago e duodeno é de 10^2 a 10^3 bactérias, 10^4 a 10^7 de bactérias no jejuno e íleo, e 10^9 a 10^{12} de células no intestino grosso (55).

A formação da MI inicia-se desde o período neonatal, passa pelo amadurecimento aproximadamente aos três anos de idade, mas somente na fase adulta ela é capaz de se diversificar e estabilizar-se, de modo que influencie na fisiologia e no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro. Fatores genéticos, ambientais, medicamentosos, alimentares, idade e tipo de parto influenciam na sua composição (56).

Estudos em animais e em humanos evidenciam o papel da MI em diversos aspectos da saúde, como características metabólicas (57–60), imunológicas (61,62) e neurológicas (63,64). Isto ocorre devido às características funcionais da MI no organismo, cujas são: influência na produção de LPS, contribuição no metabolismo de carboidratos e lipídios, proteção contra bactérias patogênicas, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de vitaminas e aminoácidos enriquecidos (54).

Após o desenvolvimento do Projeto Microbioma Humano foi possível realizar o sequenciamento genético da MI, e a diversidade do ecossistema intestinal tem sido amplamente estudada (65). Com a aplicação do sequenciamento do gene metagenômico e do RNA ribossômico 16S foi possível identificar que em humanos e camundongos os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são os mais abundantes, seguido dos demais filos como *Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* (66).

O desequilíbrio na composição da MI é denominado de disbiose, que está associada a disfunções metabólicas. Alterações na proporção entre os filos dominantes, aumento de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes*, são descritas no desenvolvimento da obesidade (67). No entanto, os estudos não são unânimes quanto a esse resultado (67–69) e diferenças metodológicas e populacionais podem explicar esta questão. O fato em comum, na maioria dos estudos, é a redução da diversidade bacteriana na população com obesidade (70). Em detrimento disto, as pesquisas vêm mostrando que em vez de limitar os estudos na identificação de níveis taxonômicos, é necessário realizar análises metabólicas para melhor entendimento do desfecho da disbiose.

A alimentação é considerada um dos fatores que mais influencia a composição da microbiota. A alimentação pode modular a microbiota através de dois mecanismos de ação: através da modificação da comunidade de bactérias existente no trato digestório ou através da introdução de novas bactérias na microbiota (71). A ingestão de gorduras saturadas parece estar inversamente associada ao gênero *Prevotella*, resultando na redução do filo *Bacteroidetes* (58,72). Já a ingestão do excesso de frutose, está associada ao excesso de *Proteobacteria* (Gram negativa) (73).

Fígado: Estrutura e Função

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula, pesando cerca de 1,5kg. Está localizado, em humanos, na cavidade abdominal abaixo do diafragma. Já em camundongos, ocupa todo espaço subdiafragmático. O fígado apresenta subunidades lobulares, constituído por quatro lobos: esquerdo, direito, medial e caudado. As subunidades lobulares são altamente conservadas quanto à estrutura e função do órgão em humanos e em camundongos. Em geral, observa-se muitas semelhanças na estrutura e funções hepáticas entre ambas as espécies (74).

O figado possui funções endócrinas e exócrinas. Seu posicionamento anatômico é extremamente importante para suas funções. Este é um órgão considerado de interface entre o sistema digestivo e o sangue, pois através da veia porta recebe os nutrientes absorvidos pelo trato digestório. Uma de suas funções primordiais é de ser considerado o centro da homeostase metabólica, através dele é possível ocorrer a captação, processamento e distribuição de nutrientes e seus produtos energéticos para demais tecidos. Seu trabalho juntamente com a bile, armazenada na vesícula biliar, também é importante para a eliminação de substâncias tóxicas. O figado também exerce função na produção de proteínas plasmáticas e hormônios, secreção biliar e formação de fatores de coagulação (44)

Sob análise microscópica, através de cortes histológicos, são observados no tecido hepático unidades estruturais denominadas de lóbulos hepáticos. Os hepatócitos, células essenciais para o funcionamento hepático, são encontrados de forma abundante nessa região. Os hepatócitos localizam-se dispostos em todo lóbulo e estão configurados em um formato chamado de "cordões de tijolos". Esses cordões são entremeados por sinusóides capilares importantes para troca de fluidos (provenientes do sangue) entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos, e vice-versa (Figura 4) (44).

Na região das periferias lobulares, existem as denominadas "Tríade/Espaço Porta" que contém um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto e vasos linfáticos (Figura 4). O sangue arterial e venoso oriundo do sistema digestório e do baço entram no lóbulo através dessa "Tríade" e por meio de ramificações atinge a região sinusóide. Nutrientes e macromoléculas são trocadas entre hepatócitos e plasma através de sinusóides revestidos por endotélio fenestrado (44).

Os hepatócitos configuram as células parenquimatosas hepáticas, além delas existes as células não parenquimatosas que representam acerca de 50% das células do fígado. As células de Kupffer, como são chamados os macrófagos, são células fagocíticas responsáveis pelo controle imune local. Possuem a capacidade de metabolizar eritrócitos velhos, digerir

hemoglobina, secretar proteínas necessárias para o sistema imune e destruir bactérias patogênicas locais. As células estreladas hepáticas (CEH) possuem como principal função armazenamento de vitamina A na forma de ésteres de retinol. No figado saudável, as CEH encontram-se em estado de quiescência, sua ativação possui ligação com a presença de fibrose hepática. Além dessas duas, as células não parenquimatosas também são formadas por células endoteliais, linfócitos e células biliares(44).



Figura 4 - Componentes do lóbulo hepático

Legenda: O tecido hepático é configurado na estrutura de lóbulos. Nos lóbulos contém os hepatócitos que são entremeados por capilares sinusóides. Na região da periferia do lóbulo, existe a Tríade Portal, formada pelos ramos da artéria hepática, da veia porta e do ducto biliar. Fonte: A autora, 2024.

Fígado: Metabolismo hepático de lipídios

O figado exerce um papel central na regulação dos fluxos sistêmicos de glicose e lipídios durante a alimentação.

Os AGs chegam no fígado de três formas:

I. Fontes alimentares: A absorção de AG ocorre predominantemente através de transportadores de AG, a difusão passiva contribui pouco para esse processo. O transporte ocorre pelas proteínas de transporte de ácidos graxos (FATP), especificamente, as duas isoformas mais comuns no fígado são FATP2 e FATP5. O receptor ativado por PPARγ regula a proteína que transporta os ácidos graxos de cadeia longa (CD36) (75);

- II. Lipólise que ocorre no TA: Diante de períodos prolongados de balanço energético positivo, o mecanismo homeostático adaptativo do TA não é suficiente, levando à disfunção dos adipócitos. Dentre as consequências, ocorre a lipólise no TA branco e a liberação de AGL. Este excedente provoca a liberação de AGL para os demais tecidos, como é o caso do figado (76);
- III. Lipogênese de novo (LDN): O processo de LDN é a conversão de fontes glicídicas para a formação de AG. O efeito da glicose na expressão de genes lipogênicos é regulado principalmente pela proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP). Os níveis de glicose plasmática também afetam a expressão de enzimas lipogênicas, estimulando a liberação de insulina e inibindo a liberação de glucagon do pâncreas. O efeito da insulina na expressão de genes lipogênicos é controlado principalmente pela proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1) em células hepáticas e adipócitos (77). Dessa forma, glicose plasmática é regulada positivamente por ChREBP no figado, e a insulina plasmática é regulada positivamente por SREBP-1 no figado. Ambas as proteínas controlam a regulação transcricional de genes lipogênicos. Suas ativações levam à conversão do piruvato em AGL no figado e a um aumento de genes que ativam a síntese e captação de colesterol, AG, TAG e fosfolipídios (78).

Ao entrarem nos hepatócitos, em condições normais, os AGL podem seguir os dois caminhos: beta-oxidação mitocondrial ou conversão em TAG com armazenamento no TA. Porém, em condições de estresse metabólico, os AGL são armazenados no tecido hepático (79). Na presença de excesso de AGL, a enzima CPT Ia é inibida e, consequentemente, ocorre o acúmulo de Malonil-CoA, sendo ele o principal regulador negativo da beta-oxidação. Malonil-CoA inibe CPT I, retardando a beta-oxidação hepática. Consequentemente, ocorre o aumento da indução de SREBP1c, proteína capaz de modular as principais enzimas lipogênicas (acetilCoA carboxilase, ACC, e ácido graxo sintase, FAS), e induzir a expressão gênica para alongamento de AG e síntese de triglicerídeos (Figura 5) (80). Este processo configura a RI sistêmica e hepática, estresse do retículo endoplasmático e acúmulo de lipídios no fígado, caracterizando um quadro de esteatose hepática (81). Dessa forma, o excesso de lipídios leva ao desenvolvimento da lipotoxicidade hepática.



Figura 5 - Visão geral do metabolismo lipídico hepático

- Legenda: Lipídios da alimentação e do processo de lipólise do tecido adiposo são transportados por FATP1 ou 5 nos hepatócitos. No citoplasma são convertidos em Acil-CoA e seu destino pode ser beta-oxidação ou formação de TAG. Já a LDN converte Acetil-CoA (proveniente do excesso de carboidrato) em AG. A LDN é regulada por ChREBP (regulada positivamente pela glicose) e SREBP1 (regulada positivamente pela insulina). Em especial, a SREBP1 regula positivamente as enzimas ACC e FAS do processo de LDN.
- Abreviações: ACC AcetilCoA carboxilase; AG ácido graxo; AGL Ácido graxo livre; ChREBP Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos; CK Ciclo de Krebs; FAS- Ácido graxo sintase;
 FATP Proteína de transporte de ácidos graxos; LDN Lipogênese de novo; SREBP1 Proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; TA Tecido adiposo; TAG Triacilglicerol; β-oxi Beta-oxidação.

Fonte: A autora, 2024

Doença Hepática Gordurosa Metabólica (DHGM): Epidemiologia e Nomenclatura

O acúmulo de lipídios no figado é uma condição benigna precursora de eventos que podem evoluir para doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma das causas mais comuns de doença hepática no mundo. A DHGNA tem uma prevalência global estimada em 25% e sua ocorrência está aumentando em países desenvolvidos e em desenvolvimento (82). Existem poucos estudos epidemiológicos de DHGNA na América do Sul. No estudo brasileiro de Karnikowski et al., em uma população de 139 pacientes, acima de 55 anos de idade, a prevalência de DHGNA foi de 35,2% (83).

O termo "não alcoólico" foi derivado de semelhanças nos achados histopatológicos hepáticos de paciente não etilista em comparação com aqueles com doença hepática relacionada

ao álcool. Entretanto, no contexto clínico, havia muitas discussões em torno desse nome, pois não existia um consenso da quantidade do volume de álcool consumido que seria caracterizado dentro dessa nomenclatura. Em 2020, o termo "doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD)" ou "Doença hepática gordurosa metabólica (DHGM)" foi aceito (84).

Esta nomenclatura já é amplamente utilizada na prática clínica, e tem refletido na amplificação dos diagnósticos de pacientes em risco hepático, maior conscientização pública e menor estigma associado ao diagnóstico (85). No âmbito acadêmico, é possível perceber um aumento progressivo desta nomenclatura nas plataformas de buscas de estudos acadêmicos. Entre os anos de 2020 e 2023 (novembro) foram publicados no PUBMED 134 artigos associando 'MAFLD' em estudos experimentais em camundongos.

DHGM: Evolução e Diagnóstico

DHGM é também conhecida como 'esteatose hepática', o seu acompanhamento clínico faz-se extremamente necessário, pois 28% dos pacientes evoluem desse quadro para outras formas mais nocivas de doenças hepática, como a esteato-hepatite metabólica (anteriormente esteato-hepatite não alcoólica) até cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (Figura 6) (86).



Figura 6 - Progressão da doença de um fígado saudável para carcinoma hepatocelular

Legenda: Características histológicas e de diferenciação de cada estágio das doenças hepáticas metabólicas. Fotomicrografía do tecido hepático corado com hematoxilina e eosina, e marcação de fibrose com tricômico de masson

Abreviações: CHC – Carcinoma hepatocelular. Fonte: Adaptado de Sheka 2020 e Bae, 2022 (87,88) O critério de diagnóstico de DHGM requer a deposição de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos, na forma de micro e/ou macrovesículas, excedente a 5% do peso total do órgão ou quando a avaliação microscópica dos hepatócitos é igual ou superior a 5% de gordura. Somado a isso, agora os critérios para DHGM também inclui como pré-requisito de diagnóstico, a presença associada de desreguladores metabólicos. A presença de DM2 e/ou sobrepeso/obesidade é um critério para o diagnóstico. Já em casos de ausência dessas duas comorbidades, o indivíduo precisa ter dois desses sete fatores de risco para o diagnóstico:

- 1. Circunferência da cintura aumentada;
- 2. Pressão arterial elevada;
- 3. Triglicerídeos plasmáticos aumentados;
- 4. Lipoproteína de alta densidade (HDL) reduzida;
- 5. Pré-diabetes;
- 6. Avaliação do modelo de homeostase do escore de RI;
- 7. Proteína C reativa plasmática de alta sensibilidade elevada (85,89).

DHGM: Fisiopatologia

Não é à toa que a DHGM é considerada a repercussão hepática da SM. A desregulação metabólica sistêmica é a principal causa e fator preditor da progressão da DHGM. Sua patogênese ocorre devido interações metabólicas do fígado com os demais tecidos corporais. Conforme já demonstrado anteriormente, o fígado recebe AGL através de três vias, e estudos mostram que essas vias contribuem significativamente para os estoques lipídicos intrahepáticos, sendo: 59% derivados de AGL circulantes provenientes do TA; 26% derivados da DNL e 15% da alimentação.

Uma revisão sistemática e meta-análise demonstrou que o acúmulo de lipídios no figado aumenta significativamente a incidência de DM2 e SM em um período médio de 5 anos (90). Durante a expansão patológica do TA, ocorre a indução de resistência sistêmica à insulina, acompanhada de ativação dos macrófagos. A RI age no aumento da liberação de AGL resultando na lipotoxicidade e acúmulo de TAG no parênquima hepático.

Os adipócitos também secretam adipocinas, como é o caso da adiponectina. Durante a DHGM, os níveis de adiponectina estão baixos, de acordo com a reduzida sensibilidade à insulina e aumento de gordura no tecido hepático. A redução da adiponectina está associada a múltiplos mecanismos, como a diminuição de sirtuína 1 (SIRT1) e hiperinsulinemia (91). A

redução na via SIRT1/PPAR-α/fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) pode desregular o metabolismo de lipídico hepático através da redução da beta-oxidação mitocondrial, contribuindo para o acúmulo de TAG (92).

Atrelado a isto, os macrófagos hepáticos, células de Kupffer, contribuem para a progressão da DHGM através da produção de fatores inflamatórios e não inflamatórios. O que se sabe até o momento é que durante a esteato-hepatite e a cirrose, o número de macrófagos hepáticos residentes diminui em humanos e camundongos. Todavia, ainda é inicial o conhecimento sobre os macrófagos hepáticos durante a DHGM.

DHGM: Fisiopatologia - Eixo Intestino-Fígado

O *crosstalk* entre o intestino, juntamente com a MI, e o figado é denominado 'eixo intestino-figado'. Anatomicamente, a interação recíproca entre os dois órgãos ocorre através da veia porta, o fluxo sanguíneo portal expõe o figado aos produtos metabólicos produzidos pela MI desencadeando uma cascata pró-inflamatória hepática. A translocação de bactérias ou produtos bacterianos para a circulação portal é o mecanismo principal que liga a disbiose intestinal à progressão de doenças hepáticas crônicas (93).

Ademais, o ganho de peso, a dieta rica em gordura e o aumento na exposição de AG podem perturbar a estrutura da barreira intestinal, permitindo a translocação da endotoxina, LPS (94). Níveis circulantes de endotoxinas são mais elevados em pacientes com esteato-hepatite do que em pacientes controles (103). A disbiose intestinal aumenta a permeabilidade intestinal devido à ruptura das TJs das células epiteliais intestinais, levando à translocação da endotoxina, LPS (104).

O LPS é extraído da parede celular das bacterianas *gram negativas* e/ou das vesículas liberadas delas, sua presença induz inflamação, denominadas de 'cascata endotóxica' (105). Os LPS são padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que se ligam ao TLR4 induzindo inflamação de baixo grau, comprometendo a integridade da mucosa por alterações nas TJs, contribuindo para a translocação de metabólitos e microrganismos até a lâmina própria intestinal (15,59,95,96).

Concentrações elevadas de LPS no sangue é definida como endotoxemia metabólica, uma condição ligada a perturbações metabólicas como dislipidemia, RI, esteatose hepática e doenças cardiovasculares (97–99). Estudos em roedores e em humanos mostraram que a esteatose hepática está associada ao aumento da permeabilidade intestinal em comparação com controles saudáveis (59,95). O perfil da MI é influenciado por diversos fatores, conforme já visto anteriormente, mas a composição da dieta e o excesso energético consumido é considerado a influência principal, atualmente, para essas alterações. Diante disso, estudos no eixo intestino-fígado se torna um alvo terapêutico importante para o tratamento da DHGM. Portanto, por ser uma doença hepáticas de múltiplos gatilhos metabólicos, a terapêutica para DHGM deve levar isso em consideração.



Figura 7 – Gatilhos para gênese da DHGM

- Legenda: O eixo intestino-figado e tecido adiposo-figado contribuem de formas distintas para o acúmulo de TAG no parênquima hepático. Durante a expansão excessiva do TA ocorre a RI e polarização de macrófagos. Consequentemente, ocorre a inibição da produção da adiponectina pelos adipócitos, culminando na redução da sinalização da via PPARα-SIRT1-FGF21. Além disso, os macrófagos também contribuem, porém o conhecimento do seu nível de contribuição na DHGM ainda é inicial na literatura. Atrelado a isso, a disbiose da MI de acordo com a influência alimentar aumenta os níveis circulantes de endotoxemia, LPS, e ocorre a ruptura das TJs. A presença de LPS leva ao aumento da cascata LBP-CD14-TLR4 no tecido hepático, culminando no processo inflamatório e produção do inflamossoma NLRP3. Esses processos resultam na lipotoxicidade hepática contribuindo para o acúmulo de lipídios no parênquima hepático e a gênese da DHGM.
- Abreviações: AGL ácido graxo livre; CD14 Receptor padrão de reconhecimento de moléculas 14; DHGM Doença hepática gordurosa metabólica; FGF 21 - fator de crescimento de fibroblastos 21; LBP – Proteína de ligação ao LPS; LPS – Lipopolissacarídeos; NLRP3 – Inflamossoma; PPAR-α - Receptores ativados por proliferadores peroxissomais do tipo alfa; SIRT1 – Sirtuína 1; TA – Tecido adiposo; TAG-Triacilglicerol; TJs – Tight junctions; TLR4 - receptor do tipo Toll 4.

Fonte: A autora, 2024.

De início é importante salientar que não existe, até o momento, nenhuma terapia medicamentosa aprovada pela Federal Drug Administration (FDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) especificamente para a DHGM. O que existe atualmente são medicamentos aprovados para demais alterações metabólicas que geram efeitos pleiotrópicos sobre a DHGM.

A primeira linha de terapia indicada para a fase de esteatose é a prática de exercício físico e adequação alimentar. Uma revisão sistemática demonstrou, baseado em análises de estudos de ensaio clínicos randomizados, que o exercício físico aliviou a esteatose hepática e refletiu em melhoras metabólicas subjacentes à DHGM (100). A dieta mediterrânea vem demonstrando benefícios metabólicos e sua alta adesão por pelo menos 6 meses apresentou melhora no alívio da gordura intra-hepática (101,102). Acima de tudo, a adesão a longo prazo da intervenção dietética segura é considerada a estratégia mais eficaz, juntamente à atividade física, para alívio das alterações metabólicas.

Em alguns casos, estratégia conjunta com ação pleiotrópica de medicamentos são indicados na prática clínica. Os agentes antidiabéticos são frequentemente indicados. O uso de inibidores do cotransportador de sódio-glicose-2 (SGLT2), agonistas do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (GLP-1Ras), inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) e agonistas PPAR-γ na DHGM são associadas às consequências que o aumento da sensibilidade à insulina carrega, como: redução do peso corporal, melhora de perfís gênicos inflamatórios e redução na expressão de genes lipogênicos (103–111).

Medicamento usados para tratamento de dislipidemias também são utilizados nesse caso. Os agonistas do PPAR-α atuam indiretamente na DHGM devido ao seu papel de aumento na beta-oxidação mitocondrial hepática (58,112,113). Os demais agonistas PPARs também apresentam efeitos benéficos. Recentemente, a atenção tem-se voltado aos agonistas duplos PPARs como terapias promissoras ao tratamento específico da DHGM. Esses agonistas serão detalhados no próximo tópico desta revisão (114–116).

Os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRAs) possuem efeitos antifibróticos com melhoras progressivas na DHGM (117,118). No entanto, seu uso é controverso, uma vez que o estudo de Verbeek (2017) não associou o uso da losartana a melhorias das características histológicas do quadro de acúmulo hepático de lipídio (119). A suplementação de Vitamina E isolada ou combinada com outras terapêuticas como medicamentos e/ou mudança no estilo de vida está sendo estudada. O uso de forma isolada é necessário uma dosagem alta para ter efeito na esteatose hepática, mas ainda sim é considerado de baixo impacto. Sua associação com

demais terapêuticas exerce efeito potencializado, mas não essencial para este tratamento (120,121).

Mecanismo de ação	Princípio ativo	Efeitos na DHGM
Inibidores SGLT2	Canagliflozina Empagliflozina	Redução de fluidos e peso corporais (103). Redução de enzimas ALT, AST e ALP (104). Diminuição de genes inflamatórios hepáticos: <i>Tnf-</i> α , <i>Il-</i> 6, <i>Mcp-1</i> e <i>Nlrp-3</i> (105)
Agonistas do receptor de GLP-1	Exenatida Liraglutida Dulaglutida Semaglutida	Perda de peso. Inibição de NLRP3 (106). Aumento na expressão de PPARγ (107,108).
Inibidores de DPP-4	Sitagliptina Linaglipitina	Atenuam a expressão de SREBP-1c, SCD-1 e FAS; aumentando a expressão de PPAR α (109). Favorecimento de genes beta- oxidativos (58).
Agonistas do PPARγ (TZDs)	Pioglitazona Rosiglitazona	Redução de marcadores séricos de ALT e AST (110 111)
Agonistas do PPARα	Fenofibrato WY14643	Aumento da beta-oxidação (112). Efeitos antioxidantes e anti- inflamatórios (113). Redução de TAG plasmáticos e hepáticos (58).
Agonista duplo dos PPARs - Em desenvolvimento	Saroglitazar (Agonista α/γ) Elafibranor (Agonista α/δ)	Melhora até mesmo do nível fibrótico (114). Redução dos scores histopatológicos de esteatose (111).
Agonistas pan-PPAR	Lanifibranor Bezafibrato	Inibição de genes pró-fibróticos e inflamatórios (115). Aumento de genes da beta-oxidação. Prevenção no desenvolvimento da esteatose (116).
Bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA)	Valsartana Losartana	Diminuição da fibrose e esteatose hepática (117). Melhora da função mitocondrial. Ativação do PPARγ (118).
Antioxidante	Vitamina E: Isolada (800 UI/ml) Combinada (600 UI/ml)	Redução fraca da esteatose hepática quando isolada. Não demonstra resultados superiores quando comparada com outras intervenções. Importante na complementação (120,121).

Tabela 1– Terapias não específicas usadas no tratamento da DHGM

Abreviações: ALP - Fosfatase Alcalina; ALT - Alanina aminotransferase; AST - Aspartato aminotransferase; BRA - Bloqueadores dos receptores da angiotensina; DHGM – Doença hepática associada a disfunção

metabólica; DPP-4 - Dipeptidil peptidase 4; FAS – Ácido graxo sintase; GLP-1 - Peptídeo semelhante a glucagon 1; IL-6 – Interleucina-6; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; NLRP-3 - NOD-like receptor 3; PPAR - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma; SCD-1 - Estearoil-CoA dessaturase-1; SGLT2 - Inibidores do cotransportador de sódio-glicose-2; SREBP-1c - Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1; TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa; Ul - Nível de ingestão superior tolerável.

Sem aprovação de medicamentos específicos para DHGM, vários medicamentos usados para DM2, hipertensão, obesidade e dislipidemias são reaproveitados devido à interseção das vias metabólicas relacionadas com acúmulo de lipídios no tecido hepático. Faz-se necessário o desenvolvimento de terapias específicas para DHGM de modo que seja possível ter efeitos benéficos a longo prazo. Acredita-se que as terapias em desenvolvimento possam contemplar essa questão.

Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs): Função e Mecanismo de ação

Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares (RNs) cujas funções fisiológicas estão ligadas ao metabolismo, homeostase energética, desenvolvimento celular, diferenciação e biogênese peroxissomal (122). Os RNs atuam diretamente no processo de transcrição de genes. A transcrição é uma etapa regulatória que pode gerar a indução ou a inibição da expressão de determinado gene, a depender de respostas extracelulares. A maioria dos eventos regulatórios de produção de proteínas ocorre na iniciação da transcrição, com isso os RNs atuam diretamente na regulação de inúmeros processos biológicos como reprodução, desenvolvimento e metabolismo geral (123).

Os PPARs são considerados sensores metabólicos, sensibilizados por carboidratos e lipídios. São capazes de induzir a expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando preferencialmente na oxidação de AG, 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 (81,124).

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica ligando-se especificamente a elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Cada receptor heterodimeriza com o receptor retinóide X (RXR, onde X pode ser α , β/δ ou γ) e se liga ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas de DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes alvo. Este mecanismo de ação do PPAR é

conhecido como transativação. Além disso, os PPARs podem regular a expressão genética independentemente da ligação aos PPREs, através do mecanismo de transrepressão (Figura 8). Existe uma interferência entre os PPARs e outros fatores de transcrição que regulam a sua expressão genética, e a maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos PPARs decorrem deste mecanismo (125).

Os PPARs estão localizados no citoplasma na ausência de ligante ou no núcleo, onde formam heterodímeros obrigatórios com RXR ligado ao DNA. Quando há presença de um ligante para PPAR, ocorre uma mudança de conformação no receptor, que causa a remoção de proteínas e recrutamento de coativadores que promovem a expressão gênica. Devido aos seus papéis reguladores metabólicos cruciais, muitos agonistas dos PPARs foram sintetizados para o tratamento de doenças metabólicas, especialmente dislipidemia e DM2. Ademais, os PPARs também têm implicações profundas em outras facetas da SM, como complicações diabéticas, DHGM, bem como distúrbios não metabólicos, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer e doenças inflamatórias (14,123,126,127).





- Legenda: Os PPARs são fatores de transcrição que após ativados por seus ligantes, regulam a expressão gênica de duas formas: A A conformação PPAR-RXR se ligam ao chamado PPRE formando uma estrutura que desencadeará a transcrição de genes alvos específicos. Isto é a transativação. B O PPAR também pode regular a expressão de genes independente de PPRE, configurando na transrepressão. A maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos PPARs são provenientes deste mecanismo.
- Abreviações: PPAR Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; PPRE Elementos responsivos ao PPAR; RXR Receptor retinóide X.

Fonte: A autora, 2024.
Através da técnica de cristalografia de raios X, modelagem molecular e técnicas de mapeamento de solvente a estrutura de ligação dos PPARs foi estudada (Figura 9). A estrutura possui quatro domínios caracterizados abaixo:

- I. Região N-terminal (Domínio A/B), abriga uma região de função de ativação independente de ligante-1 (AF-1), ou seja, funciona independente da presença de um ligante;
- II. Domínio central de ligação ao DNA (Domínio C), região de reconhecimento ao PPRE;
- III. Região de dobradiça flexível (Domínio D), região de ancoragem dos cofatores;
- IV. Domínio de ligação ao ligante C-Terminal (LBD, do inglês "*Ligand Binding Domain*", Domínio E), possui sítio de ligação de agonistas ou antagonistas e apresenta AF-2 (128).

O LBD delineia uma bolsa hidrofóbica em forma de Y na região (a bolsa de ligação ao ligante), sendo que nos PPARs essa bolsa possui um tamanho maior do que nos demais receptores, tornando-se uma característica específica dos PPARs. Além disso, a bolsa de ligação ao ligante possui distinções entre os isótopos, podendo ser essa característica a responsável pelas especificidades de ligação de cada um. A bolsa de ligação ao PPAR do tipo beta/delta (PPAR β/δ) é menor do que as das demais isoformas, possivelmente indicando que o tamanho da bolsa se torna uma especificidade aos ligantes dessa isoforma. Já a bolsa do PPAR α possui características mais lipofílicas, sendo essa característica que distingue seus ligantes aos da isoforma PPAR γ (129).

Figura 9 – Estrutura dos PPARs através de cristalografia de raios X, modelagem molecular e técnicas de mapeamento de solventes



Legenda: A região N-terminal está colorida de azul e em vermelho a região LBD C-terminal. Foi revelado a partir da estrutura dos PPARs que o N-terminal contém DNA região de ligação e C-terminal continha área de ligação do ligante.Fonte: Mirza et al., 2019 (129).

PPARs: Isoformas e importâncias fisiológicas

O primeiro PPAR, mais tarde definido como PPAR α , foi identificado em 1990 (130). Posteriormente, dois outros PPARs, PPAR β/δ e PPAR γ , foram identificados (131,132).

O PPAR α é amplamente expresso em tecidos com altas taxas de oxidação dos AG, como coração, fígado e músculo esquelético. A expressão de PPAR α também é significativa no TA marrom, adrenal e renal, bem como em vários tipos de células inflamatórias/imunes, como monócitos/macrófagos (133). PPAR α influencia na expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo lipídico, especialmente os voltados para oxidação de AG, além de controlar a expressão de genes envolvidos na desnaturação dos AG, síntese e quebra de TAG. Sua função metabólica está diretamente relacionada a sua localização. Sabe-se que a ativação de PPAR α leva ao aumento do seu gene alvo jusante, CPT I α , durante a regulação positiva da β -oxidação. Dessa maneira, a relação PPAR α -CPT I α é extremamente importante para a função metabólica

O PPAR γ é um receptor abundantemente expresso no TA, onde desempenha um papel central na adipogênese, além de suas funções na melhora a sensibilidade à insulina, lipogênese, armazenamento lipídico e metabolismo da glicose. Existem duas isoformas de PPAR γ , PPAR γ 1 e PPAR γ 2, em camundongos, enquanto em humanos e macacos, além de PPAR γ 1 e PPAR γ 2, também é expresso a isoforma PPAR γ 4 (135). A isoforma PPAR γ 2 é a mais estudada, pois ela é mais expressa no TA branco e marrom em condições de homeostase metabólica. Já em resposta ao balanço energético positivo, sua expressão é induzida ectopicamente no fígado e músculo esquelético. As demais isoformas são expressas nos tecidos adiposos, vasculatura e macrófagos (135,136).

O PPAR γ é o regulador chave da adipogênese, processo pelo qual os pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros, assumindo características morfológicas e funcionais maduras. Após esse processo, os adipócitos cessam o crescimento e iniciam a função de acúmulo energético, mecanismo considerado protetor dos demais tecidos periféricos contra a sobrecarga energética (135,137). Além disso, o PPAR γ regula a secreção de adipocinas (adiponectina e leptina) que são mediadoras da ação de insulina nas células dos tecidos periféricos. Em detrimento a isso, a ativação do PPAR γ também é fortemente associada à sensibilização de insulina, melhorando a ação metabólica da insulina e a hiperglicemia em pacientes com DM2 (136,138,139).

O PPARβ/δ é expresso em todas as células de camundongos (140), ratos (141) e humanos (142). Em camundongos, a expressão mais alta é detectada no trato digestório, incluindo intestino delgado e cólon, níveis altos a moderados na pele, TA marrom, figado, rim, pulmão e vasculatura, e níveis baixos no coração, músculo esquelético, cérebro, timo e demais tecidos (135). A ativação do PPARβ/δ já demonstrou melhora nos distúrbios metabólicos através do aumento na β-oxidação e de melhora na tolerância à glicose (143). O PPARβ/δ estava sendo considerado promissor no tratamento dos distúrbios metabólicos, por demonstrar regulação na transcrição de genes envolvidos no transporte, oxidação e termogênese de AG do TA marrom ou branco (144), além da regulação da glicose hepática (81). Apesar disso, estudos com ativação do PPARβ/δ foram descontinuados em animais, devido à promoção da carcinogênese através de mecanismos inflamatórios crônicos no desenvolvimento de câncer colorretal e gástrico (145,146). Devido a isso, daqui em diante, essa revisão será voltada apenas a estudo com as isoformas PPAR α e γ .

PPARs: Agonistas PPARs- α/γ - Mecanismo de ação de um agonista

Um agonista é uma molécula que se liga a um receptor e o estabiliza numa determinada conformação. Quando ligado a um agonista, o receptor tem mais tendência a encontrar-se na sua conformação ativa do que na sua conformação inativa. Dependendo do receptor, os agonistas podem ser fármacos ou ligantes endógenos (Figura 10). Dentro dos princípios da farmacologia, para ocorrer a ligação do agonista e ativação do receptor, fatores como a concentração do fármaco, receptores livres e conformação ativa do receptor são importantes

para entender a eficácia. Na maioria dos casos, a ativação do receptor é proporcional à ligação do seu agonista. Esses fatores são estudados dentro da farmacocinética para compreender a relação entre a potência e a eficácia de um agonista (147). Neste trabalho, os desfechos farmacocinéticos não serão explorados.



Figura 10 – Estrutura de ligação entre agonista e receptor PPAR

Legenda: Ilustração esquemática da ligação do receptor com seu agonista. Quando não ligado a um agonista ou antagonista, o receptor é considerado inativo não-ligado. Quando ligado ao seu agonista, se torna ativo e abre o canal iônico transmembrana. Fonte: Adaptado de Golan, 2014 (147).

É comum encontrar na literatura agonistas parciais e totais dentre os agonistas PPARs. Um agonista parcial é uma molécula que se liga a um receptor em seu sítio ativo, mas que só produz uma resposta parcial, mesmo quando todos os receptores estão ocupados (ligados) pelo agonista, diferente do agonista total que produz resposta integral ao ligar-se ao seu receptor. Com análises da curva de dose-resposta é possível perceber a diferença de efeitos máximos entre os agonistas parciais e totais (147).

PPARs: Agonistas PPARs- α/γ - Naturais

A família de PPARs possui a capacidade de seus receptores agregarem diferentes tipos de ligantes no seu sítio de ligação, além dos agonistas sintéticos, algumas plantas e fontes alimentares também são capazes de se ligarem ao sítio de ligação dessa família de receptores. Um estudo *in vitro* demonstrou que as catequinas presentes no chá verde atuam de forma dependente à ativação do PPARα no alívio da esteatose hepática (148). A modulação da ativação do PPARα na melhora do perfil metabólico e na redução da pressão arterial foi demonstrada através do efeito da combinação do café verde e do extrato de chá verde (149) em

ratos no modelo de SM. O extrato etanólico de gengibre preto mostrou capacidade de ligar-se ao ligante do PPARγ, refletindo em efeitos moduladores na RI, porém sem alterar os valores da adiponectina plasmática (150).

Os AG e seus derivados podem se ligar ao PPAR α e PPAR γ e quanto maior a insaturação, maior a afinidade por esses RNs. O estudo de Manio et al. demonstrou que o tipo de gordura da dieta influencia na ativação dos PPARs (151). O consumo de óleo de coco por camundongos promoveu redução da β -oxidação hepática, aumento de LPS plasmático e baixa sensibilidade insulínica. O consumo desse AG saturado tem efeitos na redução da ativação do PPAR α e não são encontradas associações atuais com PPAR γ . Por outro lado, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ativam a expressão de PPAR α hepático, resultando no aumento da β -oxidação e mitigação da esteatose hepática, além da redução de LPS e melhora na sensibilidade à insulina (152).

Um estudo *in vitro* que usou o ácido oleico, presente no azeite de oliva, resultou na melhora da produção de insulina, além de efeito inibitório do TNF- α e aumento na translocação de PPAR γ para o núcleo (153). Ratas alimentadas com alto teor de azeite de oliva extra-virgem foram associadas ao aumento na expressão de PPAR α hepático, redução significativa de TNF α na mucosa do cólon e diminuição nos níveis de colesterol total (154).

A ativação de PPARγ por PUFAs n-3 é ainda considerada controversa. O estudo de Luo et al. demonstrou que o ácido docosahexaenóico (DHA), um dos principais PUFAs n-3, foi associado à polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório M2 através da via de sinalização PPARγ e NF-κBp65 (155). Por outro lado, a suplementação de ratas lactantes com o do óleo de linhaça, que é rico em alfa-linolênico que pode ser convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e DHA, resultou em RI e redução da expressão de *Ppar-gama* na sua prole adulta (156).

Todavia, até o momento, a maioria dos agonistas naturais identificados em fontes alimentares são considerados agonistas fracos. Os efeitos dos seus metabólitos merecem mais investigação para melhor estímulo do seu potencial terapêutico (157).

PPARs: Agonistas PPARs- α/γ - Sintéticos

Devido aos seus papéis reguladores metabólicos cruciais e excelente capacidade de medicação, muitos agonistas do PPAR foram sintetizados para o tratamento de doenças metabólicas. O sucesso clínico dos fibratos, com atividade hipolipemiante dos agonistas PPARα, e o uso dos tiazolidinedionas (TZDs), com atividade hipoglicemiante dos agonistas PPAR- γ , impulsionaram as indústrias farmacêuticas e o meio científico à criação de novos agonistas PPARs para a terapêutica de alterações metabólicas proveniente do excesso de consumo energético.

Agonistas do PPAR- α como os fibratos (genfibrozila, clorfibrato, fenofibrato) são usados na prática clínica mundialmente para tratar rotineiramente hiperlipidemia devido a sua capacidade de diminuir as concentrações plasmáticas de TAG e aumentar as de HDL através da indução de Apo-AI, Apo-AII e Apo-AV(135). A classe dos fibratos também desempenham um papel regulador nas funções metabólicas do fígado, do músculo esquelético e cardíaco, todos estes efeitos terapêuticos podem advir das suas propriedades anti-inflamatórias. Em adipócitos 3T3-L1, o fenofibrato regulou positivamente a SIRT1 e negativamente a expressão de marcadores inflamatórios, IL-6 e TNF- α (158). A ativação dos PPAR α com o uso dos fibratos regula positivamente a expressão de genes *CptIa* e *CptII*, além de restaurar os níveis séricos de ALT e TNF- α no figado (159). Mais recentemente, modulou a MI e restaurou a permeabilidade intestinal em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios ou frutose (58–60).

Apenas 2-15% da população tratada com fibratos relatam efeitos indesejáveis durante o tratamento, levando à necessidade de interrupção do uso (160). Casos de rabdomiólise têm sido descritos com o uso da associação de estatinas com genfibrozila. Sendo assim, não é recomendada essa associação. O uso contínuo dos fibratos tem associação com o aumento da creatinina sérica, o que o torna limitante para pacientes com doença renal crônica. Sua administração a longo prazo induz carcinogênese hepática em roedores, apesar desse fenômeno não ser visto em humanos, diretrizes atuais recomendam testes iniciais de função hepática antes e depois de 8-12 semanas de administração dos fibratos (161).

O uso dos TZDs é associado a características promissoras antivirais (162), anticancerígenas (163) e anti-inflamatórias (164), além de melhora cardiovascular com alívio da tensão endotelial (165). Entretanto, é a atividade antidiabética das TZDs que possui destaque farmacológico, com aumento da sensibilidade à insulina e diminuição das concentrações plasmáticas de insulina e TAG circulantes (129) a partir da ativação do PPAR γ . Dessa forma, como já descrito anteriormente, a ação de sensibilizante à insulina das TZDs ocorre pelo fato do *Ppar-gama* ser o gene crucial da adipogênese e, consequentemente, o predomínio de adipócitos pequenos melhoram sinalização dos receptores de insulina (166).

Tal efeito foi descoberto no início da década de 80 (167) e, desde então, diversos fármacos foram desenvolvidos: troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona e balaglitazona. A troglitazona foi o primeiro a ser descoberto e, em 1997, recebeu aprovação pela FDA para tratamento da DM2, entretanto poucos anos depois teve sua desaprovação e retirada imediata

do mercado por associação fatal ao desenvolvimento de hepatotoxicidade idiossincrática rara. Em seguida, os dois TZDs que ganharam força na clínica e na pesquisa foram a rosiglitazona e a pioglitazona, ambas apresentaram segurança hepática e receberam liberação pelo FDA. Dentre eles, a rosiglitazona foi a que mais se destacou com altas demandas de vendas no ramo farmacêutico, embora em 2001 surgiram os primeiros relatos de sua possível associação ao quadro de insuficiência cardíaca devido à retenção hídrica. Em 2007, através de uma metaanálise, isso foi comprovado, e então seu uso foi suspenso na Europa, e os EUA criou diversas restrições para sua indicação (168). Enquanto isso, a pioglitazona não apresentou relatos de risco cardiovasculares, pelo contrário, os efeitos cardioprotetores das TZDs devem-se a ela (166).

Diretrizes atuais da Associação Americana de Endocrinologia Clínica recomendam o uso da pioglitazona em pacientes com DM2 e DHGM como primeira linha de recomendação, sendo esta associação de tratamento enquadrada em 'forte nível de evidência científica'(169). Do mesmo modo, a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda a pioglitazona como primeira escolha no tratamento da DHGM em pessoas com DM2 com grau de esteatose, esteatohepatite e/ou fibrose (170).

No entanto, é importante salientar, os efeitos adversos das TZDs incluem retenção de sódio e edema periférico, ganho de peso, insuficiência cardíaca (exceto pioglitazona), fraturas e diminuição da glicosúria. Em 2019, pacientes com DM2 do Hospital das Clínicas/USP receberam o tratamento de pioglitazona 30mg/dia durante 24 semanas para melhoria dos desfechos metabólicos. Este tratamento levou a um aumento de 3% na massa corporal, além de não promover alterações glicêmicas, do TA marrom e hipotálamo (171).

O uso de baixa dosagem da pioglitazona começou a ser considerado uma saída terapêutica para redução dos efeitos adversos desse tratamento. Ratos administrados com pioglitazona (3mg/kg) por 4 semanas melhoraram o perfil metabólico lipídico e a resposta à insulina, além de redução de marcadores inflamatórios hepáticos, sem impacto na massa corporal (172). A terapia com doses baixas de pioglitazona pode mostrar o mesmo grau de efeitos nas melhorias no metabolismo da glicose e dos lipídios, figado gorduroso, RI e adiponectina que a terapia com pioglitazona em doses mais altas (173). Contudo, ainda se faz necessário mais estudos que analise o impacto metabólico da pioglitazona em dose baixa.

A presença de efeitos indesejáveis nessas agonistas isolados impulsionou o desenvolvimento de agonistas duplo PPARs. Inicialmente, cientistas e a indústria farmacêutica acreditavam que o desenvolvimento de agonistas duplos iria permanecer com os efeitos metabólicos de ambas as monoterapias e minimizariam os efeitos adversos. A classe de agonistas duplos PPAR- α/γ é denominada "Glitazares", muitos deles evoluíram para fase de

ensaios clínicos de fase tardia, como o muraglitazar, tesaglitazar e aleglitazar. Esses medicamentos foram desenvolvidos para serem uma opção de tratamento para pacientes com hiperglicemia e hiperlipidemia. Todavia, tiveram ensaios clínicos suspensos devido aos efeitos adversos encontrados, como: insuficiência cardíaca, insuficiência renal, ganho de peso e edema (122).

Na maioria dos casos, os efeitos adversos atribuídos aos agonistas duplos se devem à maior potência de ativação do receptor PPAR γ , o que leva à sua ativação suprafisiológica em alguns tecidos e órgãos. Diante disso, novos agonistas duplos com ativação parcial do PPAR γ vêm sendo desenvolvidos, de modo que previna as complicações encontradas na ativação total desse agonista.

O saroglitazar, um agonista duplo do PPAR- α/γ com atividade predominante do PPAR- α , têm uma perspectiva otimista na dislipidemia diabética. É o primeiro glitazar aprovado no mercado, por enquanto somente na Índia, para o tratamento da DM2 e hiperlipidemia (122). Além disso, ensaios clínicos de fase inicial com saroglitazar em pacientes com DHGM demonstraram eficácia na melhoria da esteatose hepática e de desfechos histológicos relacionados (174), além de impacto benéfico nos lipídios e lipoproteínas séricas nesses pacientes (175). *In vitro*, o saroglitazar apresentou melhores efeitos na regressão da NASH que o agonista PPAR- α (fenofibrato) e o agonista PPAR- γ (pioglitazona) isolados (176). Até o momento, não foram relatados efeitos adversos importantes no seu uso. Entretanto, futuros ensaios com este medicamento a respeito da segurança a longo prazo ainda são necessários.

Diante desse cenário, o desenvolvimento de agonistas duplos PPARs é considerado um caminho promissor por ativarem simultaneamente duas isoformas que atuam no metabolismo corporal de forma ampla, além da vantagem de ativar parcialmente um ou os dois de modo que ocorra a redução dos efeitos adversos em comparação com sua ativação total ou isoladas. Nesse contexto, este tratamento pode ser favorável para a DHGM, por ser um espectro de doença com múltiplos gatilhos metabólicos e até o momento não se tem um tratamento específico que atue diretamente no contexto global de sua fisiopatologia.

1. **OBJETIVO**

1.1 Geral

Avaliar os efeitos da ativação do PPAR-alfa e -gama (isolados ou em associação) sobre o eixo intestino-fígado, com ênfase na integridade da barreira intestinal e na esteatose hepática em camundongos alimentados com excesso de gordura saturada na dieta.

1.2 Específicos

Avaliar os efeitos do agonista PPAR-alfa e/ou PPAR-gama, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, sobre os seguintes parâmetros:

- a) Massa corporal e comportamento alimentar;
- b) Tolerância oral à glicose e níveis plasmáticos de insulina, LPS e adiponectina;
- c) Distribuição dos principais filos da microbiota intestinal;
- d) Expressão gênica da família de proteínas das junções oclusivas;
- e) Remodelamento estrutural intestinal com histologia e estereologia das células caliciformes;
- f) Imunomarcação de fator relacionado à integridade da barreira intestinal;
- g) Expressão gênica da principal proteína do muco (mucina-2);
- h) Expressão gênica de fatores relacionados à cascata de endotoxemia no fígado;
- i) Expressão gênica de fatores relacionados à beta-oxidação e lipogênese hepática;
- j) Níveis hepáticos de triacilglicerol e colesterol;
- k) Remodelamento estrutural hepático com histologia e estereologia da esteatose hepática;
- 1) Imunomarcação de fator relacionado à esteatose hepática;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e dieta

Cinquenta camundongos C57BL/6J machos adultos foram alojados em grupo (n = 5 por gaiola) e mantidos sob condições controladas (temperatura: 21 ± 2 °C e umidade: $60 \pm 10\%$), com água e comida *ad libitum* em prateleiras ventiladas com microisoladores para camundongos (NexGen mouse 500, Allentown, PA, Estados Unidos). O ambiente contou com período claro-escuro de 12/12 horas e ciclos de renovação de ar (15 min/h). Os procedimentos seguiram as recomendações do Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (publicação NIH nº 85-23, revisado em 1996) e foram aprovados pelo nosso Comitê de Ética local (Instituto de Biologia, número 020/2022).

2.2 Protocolo experimental

Cinquenta camundongos C57BL/6J machos (3 meses de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais compuseram aleatoriamente dois grupos nutricionalmente diferentes: (1) Grupo controle (C) – alimentados com dieta controle (14% de energia como proteína, 10% como gordura e 76% como carboidratos; energia total 15 KJ/g, n = 10); e (2) Grupo hiperlipídico (HF) – alimentado com dieta rica em gordura saturada (14% de energia como proteína, 50% como gordura e 36% como carboidratos; energia total 21 KJ/g, n = 40) por dez semanas. Em seguida, o grupo HF foi dividido em quatro grupos para iniciar um tratamento de quatro semanas com agonistas PPARs, totalizando 14 semanas de experimento com os seguintes grupos:

- A. C (n=10): Dieta controle durante todo o experimento;
- B. HF (n=10): Dieta hiperlipídica durante todo o experimento;
- C. HF-α (n=10): Dieta HF + tratamento com WY-14643 (agonista do PPAR-α, Sigma/Merck) na dose de 3,5 mg/kg de massa corporal;
- D. HF- γ (n=10): Dieta HF + tratamento com Pioglitazona (agonista do PPAR- γ , Sigma Aldrich) na dose de 4,5 mg/kg de massa corporal;
- E. HF-αγ (n=10): Dieta HF + tratamento com combinação de agonista do PPAR-alfa e Pioglitazona (nas mesmas doses utilizadas nos grupos que receberam monoterapia).

Os agonistas PPARs foram misturados nas dietas produzidas pela Prag Soluções (Jaú-SP, Brasil). A dosagem consumida considerou a ingestão alimentar média diária de cada animal. A dose de WY-14643 seguiu um estudo anterior do nosso grupo (124), enquanto a dose de pioglitazona foi inferior ao habitual na literatura para possivelmente descartar os efeitos indesejados observados anteriormente, conforme relatado em outro estudo (172).

Os conteúdos vitamínicos e minerais de ambas as dietas foram idênticos e seguiram as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para a fase de manutenção (AIN-93M) (177). Cinco animais foram utilizados para análises moleculares, enquanto a outra metade foi submetida a avaliações microscópicas.

Ingredientes (g/Kg)	Dietas experin	nentais
	С	HF
Caseína	140,0	175,0
Amido de milho	620,69	347,7
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha	0,0	238,0
Fibra alimentar	50,0	50,0
Mistura de Vitaminas	10,0	10,0
Mistura de Minerais	35,0	35,0
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total (g)	1.000	1.000
Energia (Kcal/Kg)	3810	5000
Hidrato de carbono (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lipídio (%)	10	50

Tabela 2 - Composição e conteúdo de energia das dietas experimentais

Abreviações: C – Dieta controle; g – Grama; HF – Dieta do grupo hiperlipídico; Kcal – quilocaloria; Kg – kilograma; Fonte: Instituto Americano de Nutrição (177)

2.3 Ingestão alimentar, ingestão energética e massa corporal

Durante todo o período experimental, a massa corporal (MC) dos animais foi mensurada semanalmente em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). A ingestão alimentar foi obtida diariamente durante todo o protocolo experimental, através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi realizada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias

da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias é convertido para quilojoules, medida universal.

2.4 Teste Oral de tolerância a glicose

Na 13^a semana, os animais foram submetidos ao Teste Oral de tolerância a glicose (TOTG). Utilizando um glicosímetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil), foram colhidas amostras de sangue da veia caudal em jejum de 6 horas (tempo 0) e após 15, 30, 60 e 120 minutos da gavagem orogástrica de solução glicosada (2g/kg MC). A área sob a curva (ASC) foi calculada através do software GraphPad Prism (versão 9.3.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos).

2.5 Eutanásia e extração de tecido

Na última semana de tratamento, camundongos em jejum de 6 horas foram submetidos à anestesia (cetamina intraperitoneal 240 mg/kg e xilazina 15 mg/kg) e punção cardíaca para coleta de amostras de sangue heparinizado. O fígado e o intestino grosso foram dissecados e os fragmentos foram coletados aleatoriamente. Alguns fragmentos foram fixados (tampão formaldeído fosfato 4% p/v 0,1 M, pH 7,2, por 48 h em temperatura ambiente), embebidos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), e os blocos foram seccionados em 5 μ m de espessura para análises microscópicas (n=5/grupo). As demais amostras foram congeladas a -80°C para análises moleculares (n = 5/grupo).

2.6 Análise bioquímica

O plasma foi separado por centrifugação (712 xg durante 15 min). Ensaios ELISA foram realizados para medir a insulina plasmática (kit ELISA de insulina de rato/camundongo Cat #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA), adiponectina (kit ELISA de adiponectina de mouse Cat #EZMADP-60K, Millipore, Missouri, EUA) e LPS (multi -espécies LPS ELISA Kit Cat. #SEB526Ge-96T, Cloud-Clone Corp., Katy, EUA). A glicemia de jejum foi medida por meio de glicosímetro após jejum de 6 horas (Accu Chek Performa, Roche, SP, Brasil). O Índice de Resistência à Insulina em Jejum (FIRI) abordou a RI da seguinte forma: insulina em jejum (mU/L) x glicemia em jejum (mmol/L) / 25(178). As concentrações de TAG e colesterol hepáticos foram avaliadas por espectrofotometria seguindo protocolo prévio (179).

2.7 Histologia e Estereologia

Fotomicrografias de lâminas de fígado, coradas com hematoxilina e eosina, ou lâminas de ceco, coradas com Alcian Blue (Sigma Chemical Company-pH 2,5) mais ácido periódico de Schiff (PAS, intestino-Sigma Chemical Company), foram analisadas de forma cega com STEPanizer (www.stepanizer.com):

- Estereologia hepática: Foram analisados cinco animais por grupo e dez imagens por animal. A densidade de volume de esteatose hepática [Vv (figado)] foi estimada pela técnica de contagem de pontos utilizando um sistema de teste de 36 pontos, através do cálculo: Vv [est, figado] = Pp [est, figado] / PT (Pp é o número de pontos que atingem as inclusões lipídicas, PT é o total de pontos de teste) (179).
- Estereologia intestinal: O número de células caliciformes por área [Q_A] foi estimado usando STEPanizer, onde o número total de células caliciformes foi contado (à exceção das que tocavam a linha proibida) e dividido pela área teste total (em μm²), através do cálculo: Qa [cél.caliciformes] = número de células caliciformes na área teste / área teste total (μm²) (58).

2.8 Amplificação 16S rDNA PCR

As fezes encontradas no ceco do 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 do DNA foram determinadas usando Qubit (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) e eletroforese horizontal (gel de agarose a 1%). Os ensaios de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) avaliaram a quantificação relativa dos filos *Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria* e *Proteobacteria* na microbiota fecal do intestino de camundongos, detectando genes 16S rRNA. Para quantificação relativa, as abundâncias de diferentes filos foram normalizadas pelo método $\Delta\Delta$ Ct para a quantidade bacteriana total nas amostras (180). Os indicadores utilizados estão descritos na Tabela 3.

Filo ou Classe	5'- 3'	3'-5'
Actinobacteria	5'-TACGGCCGCAAGGCTA-3'	5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3'
Bacteroidetes	5'-CRAACAGGATTAGATACCCT-3'	5'-GGTAAGGTTCCTCGCGTAT-3'
Class-y- proteobacteria	5'-TCGTCAGCTCGTGTYGTGA-3'	5'-CGTAAGGGCCATGATG-3'
Eubacteria (all bacteria)	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGAGT-3'	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
Firmicutes	5'-TGAAACTYAAAGGAATTGACG-3'	5'-ACCATGCACCACCTGTC-3'

Tabela 3 - Iniciadores do filo ou classe de microrganismos da microbiota intestinal

2.9 RT-qPCR

A extração de RNA total compreendeu a utilização do reagente Trizol (Invitrogen, CA, Estados Unidos) em 30 mg de fígado e 70 mg de intestino grosso. 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 ressuspenso com 500 µL de etanol 75% e depois centrifugado (1200 g por 5 min a 4°C). O etanol foi removido e o pellet ressuspenso 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). O qPCR foi realizado utilizando um reciclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) e SYBR Green mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Os genes constitutivos foram Beta-actina para o figado e Gapdh para amostras de intestino. As sequências iniciadoras utilizadas são mostradas na Tabela 4 (fígado) e Tabela 5 (intestino). Todos os símbolos relacionados aos genes estão em itálico (a primeira letra está em maiúscula) (181).

Primers	5'- 3'	3'-5'
Beta-actin	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Lbp	GGTGGCTGCTGAATCTCTTC	TCTGCTGTGACTGGCAGAGT
Cd14	TGAATCCCACTCGGAGAAGT	GCAAAGCCAGAGTTCCTGAC
Tlr4	GCCGGAAGGTTATTGTGGTA	GAAACTGCCATGTTTGAGCA
Il-18	GCCATGTCAGAAGACTCTTGCGTC	GTACAGTGAAGTCGGCCAAAGTTGTC
Nlpr3	ATGCTGCTTCGACATCTCCT	GTTTCTGGAGGTTGCAGAGC
Ppar-gamma	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
Srebp-1c	AGCAGCCCCTAGAACAAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
Ppar-alpha	AATGCAATTCGCTTTGGAAG	GGCCTTGACCTTGTTCATGT
CptIa	GCAGAGCACGGCAAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
Sirt 1	GGTATCTATGCTCGCCTTGC	ACACAGAGACGGCTGGAACT
Fgf21	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	TGTTCCATCCTCCCTGATCT

Tabela 4 - Sequências de primers RT-qPCR - Fígado

Abreviações: *Cd14* - Receptor padrão de reconhecimento de moléculas 14; *CptIa* - Carnitina palmitoiltransferase Ia; *Fgf21* - Fator de Crescimento de Fibroblastos 21; *Il-18* – Interleucina-18; *Lbp* – Proteína de ligação ao LPS; *Nlrp3* – Inflamossoma; *Sirt1* – Sirtuína; *SREBP-1c* - fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1; *Tlr4* - receptor do tipo Toll 4.

Primers	5'- 3'	3'-5'
Ppar-gamma	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
Ppar-alpha	AATGCAATTCGCTTTGGAAG	GGCCTTGACCTTGTTCATGT
Gapdh	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
Claudin-12	GCCTTGCTACTCTGCCTGAT	CAGACACTTGGCCAGTTTGA
Occludin	CCTTCTGCTTCATCGCTTCC	AGCGCTGACTATGATCACGA
Jam-a	AAGTCGGGGGGATCTGATCTT	CACATTCAGCTCCACAGCAT
Mucin-2	GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA	ATGCCCACCTCCTCAAAGAC

Tabela 5 - Sequências de primers RT-qPCR – Intestino

Abreviações Gapdh - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Jam-a - Molécula De Adesão Juncional-A.

2.10 Imunohistoquímica

As lâminas de figado e ceco foram desparafinizadas e o protocolo imunohistoquímico foi iniciado utilizando o Sistema de Detecção de Polímeros Novolink Max (Leica Biosystems, Heidelberger, Alemanha). As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica (Epitope Retrieval Solution a 60°C por 15 min), bloqueio de peroxidase endógena e bloqueio de ligações inespecíficas. Na sequência, foram incubadas com anticorpos contra F4/80 (fígado, sc-377009, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, diluição 1:100) ou Ocludina (ceco, CSB-PA190654, Cusabio, Houston, EUA, diluição 1:50), por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Prime Powder (Leica Biosystems) por 30 minutos, seguida de incubação com Novolink Polymer (Leica Biosystems) por 30 minutos. Diamino benzidina (DAB) revelou as reações (3 min de incubação para F4/80 e 7 min de incubação para Ocludina, DAB Chromagen com Novolink DAB Substrate Buffer, Leica Biosystems). As lâminas foram contrastadas com hematoxilina.

2.11 Análise de dados

Durante as primeiras 10 semanas, a análise estatística foi realizada com Teste T de Student e a correção de Welch. Durante a fase de tratamento, os dados foram analisados usando ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós-teste de Dunnett T3 (182). Em todos os casos, foi utilizado o índice de significância com P<0,05 (GraphPad Prism versão 9.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos) (183).

3. RESULTADOS

3.1 Massa corporal (MC), ingestão alimentar e ingestão energética

Os animais C e HF tinham MC semelhantes no início do estudo. Todos os animais toleraram bem as dietas e tratamentos. Animais do grupo HF apresentaram excesso de peso da 2^{a} até a 14^a semana (+29% vs. C, Figura 11A), enquanto HF- α (-15% vs. HF) e HF- γ (-17% vs. HF) reduziram significativamente a MC. O HF- $\alpha\gamma$ (-23% vs. HF) apresentou MC igual ao C (Figura 11A). Embora a ingestão alimentar não tenha diferido entre os grupos (Figura 11B), a ingestão energética nos grupos alimentados com dietas hiperlipídicas superou o grupo C (Figura 11C).





Legenda: A - Massa corporal semanal; B - Ingestão alimentar; e C - Ingestão energética. ANOVA unidirecional de Welch e Brown-Forsythe e teste post hoc de Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). Diferenças significativas (P < 0,05) são indicadas: a≠C; b≠HF; c≠HF-α; d≠HF-γ para massa corporal e ***P < 0,001 para ingestão de energia.

Abreviações: C - Dieta Controle; HF - Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPAR-γ; KJ – quilojoules.

3.2 Resposta glicêmica

A Figura 12A mostra a curva TOTG, onde todos os grupos tratados exibiram níveis basais de glicemia resgatados nos momentos de avaliação: T30, T60 e T120, assim como o grupo C. Por outro lado, HF não atingiu os níveis basais de glicose, indicando intolerância oral

à glicose, conforme confirmado pela ASC mais elevada para TOTG no grupo HF do que no grupo C (+55%, Figura 12B). A hiperinsulinemia (+285% vs. C, Figura 12C) e valores aumentados de FIRI (+378% vs. C, Figura 12D) retrataram RI no grupo HF, concordando com redução da adiponectina plasmática (-63% vs. C, Figura 12E). Os tratamentos combateram a hiperinsulinemia plasmática (Figura 12C) e a RI, observada através de um FIRI (Figura 12D), com resultados dos grupos tratados inferiores ao do grupo HF. Além disso, os grupos tratados apresentaram hiperadiponectinemia em comparação ao grupo HF (HF- α : +96%; HF- γ : +263%; HF- $\alpha\gamma$: +205% vs. HF, Figura 12E).

Figura 12 – TOTG, ASC, FIRI e níveis plasmáticos de insulina e adiponectina



Legenda: A - Teste oral de tolerância à glicose (TOTG); B - Área sob a curva para TOTG; C- Insulina plasmática; D - Índice de Resistência à Insulina em Jejum (Firi); e E - Adiponectina plasmática. Welch e Brown – Forsythe one-way ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). São indicadas diferenças significativas: **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

Abreviações: ASC – Área Sob a Curva; C - Dieta Controle; FIRI – Índice de Resistência à Insulina em Jejum; HF - dieta hiperlipídica; HF-α - tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ - tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ - tratado com agonista PPAR-γ; TOTG – Teste oral de tolerância a glicose.

3.3 Distribuição filogenética da microbiota intestinal e expressões gênicas das junções oclusivas intestinais

O grupo HF mostrou proporções aumentadas de *Firmicutes* (+18% vs. C) e *Actinobacteria* (+107% vs. C) juntamente com diminuição dos filos *Bacteroidetes* (-20% vs. C) e *Proteobacteria* (-43% vs. C, Figura 13A). Os tratamentos melhoraram a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* (+48% vs. C, Figura 13A), assemelhando-se ao grupo C.

Corroborando com isso, HF apresentou genes intestinais reduzidos: *Claudina-12* (-80% vs. C, Figura 11B), *Ocludina* (-54% vs. C, Figura 13C) e *Jam-a* (-80% vs. C, Figura 13D). Por

outro lado, os tratamentos aumentaram a expressão dos genes TJs: *Claudina-12* (HF- α : +586%; HF- γ : +191%; HF- $\alpha\gamma$: +203% vs. HF, Figura 13B), *Ocludina* (HF- α : +282%; HF- γ : +45%; HF- $\alpha\gamma$: +396% vs. HF, Figura 13C) e *Jam-a* (HF- α : +307%; HF- γ : +197%; HF- $\alpha\gamma$: +325% vs. HF, Figura 13D).

O agonista do PPAR-α restaurou a expressão intestinal do *Ppar-alfa* no HF-α (+141%) e aumentou sua expressão no HF-αγ (+ 39%, Figura 13E). O agonista do PPAR-γ aumentou o *Ppar-gama* intestinal no HF-γ (+596%) e HF-αγ (+366%, Figura 13F). A relação *Ppar-alfa/gama* (Figura 13G) reduziu no HF-γ e HF-αγ (-87% e -69% vs. HF).





Legenda: A- Composição da microbiota filogenética; B – *Claudina-12*; C – *Ocludina*; D – *Jam-a*; E – *Ppar-alfa*; F –*Ppar-gama*; G Razão Ppar-alfa/ Ppar-gama. Welch e Brown – Forsythe one-way ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). São indicadas diferenças significativas: *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

Abreviações: C - Dieta Controle; HF, Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPAR-γ; Jam-a - Molécula De Adesão Juncional-A.

3.4 Histologia, imuno-histoquímica, estereologia e expressão gênica de mucina-2 intestinal

As Figura 14A e 14C mostram diminuição do muco no grupo HF e redução do Qa [células caliciformes] (-39% vs. C), enquanto os tratamentos elevaram a produção de muco na região apical das criptas, comprovado pelo aumento do Qa [células caliciformes] no HF- α (+57%), HF- γ (+108%) e HF- $\alpha\gamma$ (+117% vs. HF, Figura 14C). O grupo HF apresentou

diminuição da expressão do gene *Mucina-2* intestinal (-60% vs. C), enquanto o HF- α , HF- γ e HF- $\alpha\gamma$ apresentaram *Mucina-2* regulada positivamente (+290% para HF- α , +231% para HF- γ e +444% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF; Figura 14D). Em corroboração a isso, a imunomarcação positiva para ocludina nos grupos tratados assemelhou-se à imunomarcação encontrada para o grupo C (Figura 14B).



Figura 14 – Fotomicrografia do intestino grosso, imuno-histoquímica para ocludina, estereologia Qa [células caliciformes] e expressão relativa de RNAm de mucina-2 intestinal

Legenda: A - Ceco corado com Alcian Blue e Periodic Acid-Schiff (PAS). Alcian Blue e PAS coram glicoproteínas produzidas por células caliciformes, que foram marcadamente reduzidas pela dieta rica em gordura e resgatadas pelos tratamentos. B - Imunohistoquímica para ocludina no ceco. Setas indicam regiões com imunomarcações concentradas. C - Densidade numérica de células caliciformes por área; D – Expressão relativa de mRNA de Mucina-2 intestinal. Barra de escala = 30µm. Welch e Brown – Forsythe oneway ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n =5). São indicadas diferenças significativas: *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001, ****P < 0,0001.
Abreviações: C - Dieta Controle; HF, Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPAR-γ; Qa – número de células por área.

3.5 Endotoxina plasmática e expressão gênica da cascata de endotoxemia no fígado

O grupo HF apresentou LPS plasmático aumentado (+28% vs. C, Figura 15A), enquanto os tratamentos o atenuaram significativamente (-12% para HF- α , -16% para HF- γ e -18% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF). A regulação negativa da cascata de endotoxemia nos grupos tratados correspondeu à redução da expressão do gene *Lbp* no figado (-12% para HF- α , -16% para HF- γ e -18% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 15B). Os genes *Cd14* (Figura 15C), *Tlr4* (Figura 15D), *Il-18* (Figura 15E) e *Nlrp3* (Figura 15F) aumentaram no grupo HF (+159%, +210%, +316% e +95% vs. C, respectivamente), enquanto os grupos tratados apresentaram pelo menos uma diminuição de 54% nas suas expressões.



Figura 15 – Nível plasmático de LPS e expressão relativa de RNAm da cascata de endotoxemia hepática

Legenda: A - Concentrações plasmáticas de lipopolissacarídeos; B - *Lbp*; C-*Cd14*; D-*Tlr4*; E-*Il-18*; F-*Nlrp3*. Welch e Brown – Forsythe one-way ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). São indicadas diferenças significativas: *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001.

Abreviações: C - Dieta Controle; CD14 - Receptor padrão de reconhecimento de moléculas 14; HF, Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPAR-γ; Il-18 – Interleucina-18; LBP – Proteína de ligação ao LPS; LPS, lipopolissacarídeos; NLRP3 – Inflamossoma; TLR4 - receptor do tipo Toll 4.

3.6 Expressão gênica de fatores relacionado à lipogênese e beta-oxidação no fígado

Os genes lipogênicos aumentaram no grupo HF, apresentando *Ppar-gama* (+127%, Figura 16A) e *Srebp-1c* (+182%, Figura 16B) mais elevados do que o grupo C. Por outro lado, os tratamentos suprimiram os genes lipogênicos *Ppar-gama* e *Srebp-1c* reduzidos em HF- α (-80 e -59 %), HF- γ (-53 e -49 %) e HF- $\alpha\gamma$ (-73 e -59 % vs. HF).

Em contrapartida, quatro genes relacionados à beta-oxidação tiveram menor expressão no grupo HF do que no C: *Ppar-alfa* (-63%, Figura 16C), *Cpt-Ia* (-59%, Fig. 17D), *Sirt1* (-79%, Figura 16E) e *Fgf21* (-75%, Figura 16F). Em vez disso, os grupos tratados aumentaram o *Ppar-alfa* (+186% para HF- α , +33% para HF- γ e +108% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 16C), *Cpt-Ia* (+254% para HF- α , +210% para HF- γ e +90% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 16D), *Sirt1* (+653% para HF- α , +224% para HF- γ e +325 % para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 16E) e *Fgf21* (+426% para HF- α , +138% para HF- γ e +231% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF, Figura 16F).

Figura 16 – Expressão relativa de RNAm de genes relacionados a lipogênese e beta-oxidação hepáticos



Legenda: A - *Ppar-gama*; B- *Srebp1c*; C- *Ppar-alfa*; D- *Cpt1a*; E- *Sirt1*; F- *Fgf21*. Welch e Brown – Forsythe one-way ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). São indicadas diferenças significativas: *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

Abreviações: C - Dieta Controle; CptIa - Carnitina palmitoiltransferase Ia FGF 21 - Fator de Crescimento de Fibroblastos 21; HF - Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPAR-γ; SIRT1 – Sirtuína 1; SREBP-1c - fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1.

3.7 Histologia, imuno-histoquímica, estereologia e níveis de TAG e colesterol hepáticos

As imunomarcações para F4/80 (Figura 17A) foram positivas na HF e podem sugerir o início da migração de macrófagos residentes para o tecido hepático, implicando inflamação. Os grupos tratados apresentaram marcação F4/80 mais fraca que o grupo HF, corroborando o parênquima hepático bem preservado após os tratamentos.

Camundongos do grupo HF exibiram esteatose hepática perceptível, enquanto os grupos tratados apresentaram mitigação, com parênquima hepático semelhante ao C (Figura

17A). De acordo, o Vv (fígado) foi elevado no grupo HF (+121% vs. C, Figura 17B), enquanto todos os grupos tratados o diminuíram (-67% para HF- α , -68% para HF- γ , e -71% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF).

Animais do grupo HF apresentaram concentrações elevadas de TAG hepático (Figura 17C) e colesterol (Figura 17D) (+56% e +8% vs. C). Os grupos tratados apresentaram concentrações mais baixas de TAG hepático (-22% para HF- α , -31% para HF- γ e -25% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF). Apenas o uso de PPAR- γ e PPAR- $\alpha\gamma$ reduziram o colesterol hepático (-8% para HF- γ e -9% para HF- $\alpha\gamma$ vs. HF).



Figura 17 – Fotomicrografia hepática, imuno-histoquímica para F4/80, Estereologia Vv [esteatose] e níveis hepáticos de TAG e colesterol.

Legenda: A- Cortes hepáticos de hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para F4/80 no figado. Setas indicam o depósito de gotícula de gordura e regiões com imunomarcações concentradas; B- Densidade de volume (Vv) (esteatose hepática); C- Triacilglicerol hepático; D- Colesterol hepático. Cortes de figado mostram esteatose hepática generalizada após ingestão de dieta com HF crônica e redução expressiva em todos os grupos tratados (barra de escala = 15µm). Welch e Brown – Forsythe one-way ANOVA e teste post hoc Dunnett T3 (média ± dp, n = 5). São indicadas diferenças significativas: *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

Abreviações: C - Dieta Controle; HF, Dieta Hiperlipídica; HF-α, tratado com agonista do PPAR-α; HF-αγ, tratado com combinação de PPAR-αγ; HF-γ, tratado com agonista PPARγ; Vv – Densidade de volume.

4. DISCUSSÃO

A ingestão excessiva de gordura saturada levou ao excesso de peso, intolerância oral à glicose, disbiose intestinal e comprometimento da barreira intestinal, desencadeando em endotoxemia plasmática com aumento da expressão gênica de fatores endotóxicos e

lipogênicos no fígado, levando ao desenvolvimento da DHGM. Os agonistas do PPAR- α/γ (isolados ou em associação) atenuaram esses distúrbios metabólicos, restaurando a distribuição filogenética da microbiota, a expressão gênica das TJs intestinais, a densidade numérica das células caliciformes e as concentrações plasmáticas de LPS. Os animais tratados mostraram mitigação da esteatose com aumento da expressão de genes beta-oxidativos no tecido hepático e restauração da barreira intestinal através da modulação do eixo intestino-fígado pela ativação dos PPARs. A associação do PPAR- α/γ foi capaz de normalizar a MC dos animais.

A ingestão crônica de gorduras saturadas (50% de energia como gordura) durante 14 semanas levou ao excesso de peso no grupo HF, conforme descrito anteriormente (184,185). O agonista PPAR- α reduziu a MC aumentando a termogênese e o gasto energético (182). Em contraste, a ativação completa do PPAR- γ induz retenção de líquidos e ganho de MC devido à adipogênese favorecida e possível ação no ducto coletor renal (186). O tratamento com pioglitazona (10mg/kg) não reduziu a MC (15). No presente estudo, animais tratados com dose baixa de pioglitazona (4,5mg/kg) apresentaram redução na MC em comparação ao grupo HF. O HF- α/γ tratado apresentou a mesma MC do grupo C, indicando um possível sinergismo para maximizar os resultados. Os tratamentos não alteraram o consumo alimentar, excluindo a necessidade de grupos pair feeding.

Os tratamentos atenuaram a RI e a hiperinsulinemia encontradas em animais do grupo HF. Os agonistas do PPAR- γ são potentes sensibilizadores da insulina e melhoram a tolerância à glicose através da translocação periférica do transportador de glicose 4 (GLUT4) (137). Consequentemente, a pioglitazona melhorou a adiponectina plasmática, uma adipocina que aumenta o transporte de glicose no músculo e diminui a produção hepática de glicose (187), cujo aumento é necessário para os efeitos benéficos da pioglitazona na DHGM (188). Os agonistas do PPAR- α também aumentam os níveis de adiponectina indiretamente em camundongos e adipócitos 3T3-L1 associado a redução da MC, um efeito não observado em camundongos deficientes em PPAR α (189).

A dieta hiperlipídica altera a composição da microbiota em animais e humanos, principalmente pelo aumento da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* (72,190), como visto no

grupo HF. Dietas hiperenergéticas favorecem a proliferação de Firmicutes devido à sua maior eficácia na extração de energia dos alimentos do que outros filos, promovendo assim a absorção excessiva de calorias e o ganho de MC (67,191). Por outro lado, todos os grupos tratados reduziram a proporção de *Firmicutes*, especialmente os grupos HF- γ e HF- $\alpha\gamma$. A disbiose intestinal devido à dieta hiperlipídica está relacionada ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal, conhecida como "intestino permeável" (190). O grupo HF apresentou expressão reduzida dos genes TJs, facilitando a translocação de microrganismos e toxinas para a circulação sistêmica. A recuperação da relação *Firmicutes/Bacteroidetes* nos grupos tratados resultou em melhorias marcantes na expressão do gene TJs.

TJs compreende proteínas integrais de membrana localizadas próximas à porção apical da membrana lateral das células epiteliais intestinais, que selam a mucosa intestinal e limita/regula a passagem de íons e moléculas (tamanho <4Å) entre as células (51). A família Claudina é responsável pela estrutura e função da espinha dorsal das TJs (192). O subtipo Claudina-12 está presente em todo o trato gastrointestinal de camundongos, especificamente no jejuno, íleo e cólon, colocalizado com ocludina nos pólos mais apicais das membranas laterais das células epiteliais (193). A Ocludina é um componente regulador da montagem estrutural e funcional da TJs (194), enquanto Jam-a regula a permeabilidade paracelular epitelial intestinal. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, frutose e colesterol nocaute a Jam-a apresentam endotoxemia exacerbada, acelerando a progressão de esteatose para esteato-hepatite metabólica (195).

A ingestão crônica de dieta hiperlipídica também diminuiu a secreção de muco e a densidade numérica das células caliciformes. O muco gelatinoso nesta camada, composto por proteínas mucinas secretadas pelas células caliciformes, é a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana (196,197). O aumento da expressão dos genes TJs nos grupos tratados foi paralelo à preservação da camada de muco. O agonista PPAR- α recentemente resgatou a expressão dos genes TJs e a densidade numérica das células caliciformes na ingestão crônica de dieta hiperlipídica (17 semanas) (58). Dose mais elevada de pioglitazona (10mg/kg) apenas regulou positivamente *Claudina-12* sem influenciar *Ocludina* e *Jam-a* em animais alimentados com dieta hiperlipídica, além de ser incapaz de resgatar a ultraestrutura ileal (15). Aqui, a combinação PPAR- α/γ resultou na maior expressão de *Mucina-2* e *Ocludina*, e a pioglitazona em dose baixa (4,5 mg/kg) aumentou a densidade numérica das células caliciformes, implicando preservação da barreira intestinal.

As alterações intestinais do grupo HF foram concomitantes com a inflamação do figado, confirmando que a dieta hiperlipídica leva a um intestino permeável, com aumento de LPS plasmático de 2 a 3 vezes, favorecendo o início da DHGM (198). As bactérias da

microbiota liberam LPS através de sua membrana externa ou vesículas desta membrana, e os agregados de LPS se ligam ao Lbp, que transfere o LPS para o Cd14. Este último divide os agregados de LPS em moléculas monoméricas e os apresentam ao complexo TLR4-MD2 (199). A dimerização do complexo TLR4-MD2 sinaliza o reconhecimento fisiológico do LPS e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando a cascata endotóxicas (200).

A dieta HF está associada ao desenvolvimento de danos e inflamação no fígado. A presença de palmitato, o ácido graxo saturado mais abundante desta dieta, que atua como PAMPs neste modelo de camundongo, ativa NLRP3 e caspase-1, desencadeando a produção de IL-18 (201). A disbiose intestinal e a translocação de produtos microbianos também aumentam as concentrações sistêmicas de Il-18 e influenciam patologias extra-intestinais (202). Os inflamassomas NLRP6 e NLRP3 e a proteína efetora Il-18 regulam a progressão da DHGM para esteato-hepatite e comorbidades da SM através da modulação da MI (203).

Neste estudo, o grupo HF apresentou aumento de LPS plasmático, implicando afrouxamento da barreira intestinal, tornando o ambiente mais permeável à translocação bacteriana. Assim, houve regulação positiva de *Lbp-Cd14-Tlr4-Il18-Nlrp3*, prejudicando a homeostase metabólica hepática nesses animais. Os tratamentos diminuíram o LPS plasmático e atenuaram a expressão gênica dessa cascata endotóxica no figado. O agonista do PPAR- α , WY-14643, suprime a secreção de citocinas inflamatórias induzidas por LPS (204), considerando que o agonista do PPAR- γ reduz a produção de TNF- α induzida por LPS em 29% in vitro (205). Saroglitazar (agonista duplo de PPAR- α/γ) neutraliza a ativação do inflamassoma NLRP3 e a liberação de IL-1 β (206). Os tratamentos propostos aliviaram os genes da inflamação hepática pela modulação do eixo intestino-figado, com efeitos imprevistos, como a supressão do inflamassoma.

Os sinais lipogênicos hepáticos aumentam após duas semanas de administração da dieta hiperlipídica (201), e o *Ppar-gama* é considerado um sinal adicional de aumento lipogênico ao transcrever *Srebp-1c* (207). Aumento de *Srebp-1c* desempenha um papel na patogênese da DHGM, por estimular as principais enzimas lipogênicas (ACC e FAS) (80). Contrariamente, a atividade de transrepressão do PPAR- α é suficiente para prevenir a progressão da esteato-hepatite através de sinais anti-inflamatórios na inflamação crónica do fígado (208,209). A ativação do PPAR- α pelo WY-14643 resgatou a disbiose intestinal em camundongos HF e alimentados com alto teor de frutose, além de mitigar a esteatose hepática ao diminuir *Tlr4, Ppar-gama* e *Srebp-1c* (58,59). Aqui, ambos os grupos tratados com o agonista PPAR- α (HF- α e HF- α/γ) apresentaram supressão de genes lipogênicos hepáticos e aumento de *CptIa, Sirt1* e *Fgf21*, sugerindo uma prevalência da via beta-oxidativa.

O uso prolongado de pioglitazona interrompeu a progressão da esteato-hepatite (210). O *Ppar-gama* é essencial para a diferenciação dos adipócitos, secreção de adiponectina e aumento da sensibilidade à insulina devido à redistribuição da gordura de locais viscerais, como figado e músculo, para o TA subcutâneo periférico (125). Saroglitazar (agonista duplo de PPAR- α/γ) melhorou a esteatose hepática, a inflamação lobular, o balonamento hepatocelular e o estágio de fibrose suficientemente para atenuar esteato-hepatite em camundongos, igual ou superior à pioglitazona (211). De acordo, os grupos HF- γ e HF- α/γ tiveram efeitos benéficos semelhantes em relação à mitigação da esteatose hepática e redução do colesterol hepático. Pioglitazona é a recomendação atual para tratar DHGM em pacientes com biópsia comprovada (212).

Recentemente, alterações na renovação e função de macrófagos hepáticos foram relacionadas à DHGM (213). Células de Kupffer residentes em tecidos (F4/80+/GATA6+) e macrófagos derivados de monócitos recrutados da circulação sistêmica compreendem os macrófagos hepáticos (213). Durante os estágios avançados de fibrose hepática, o número de macrófagos hepáticos residentes diminui tanto em humanos quanto em camundongos, mas há um aumento nos monócitos recrutados na circulação sistêmica (214). Por outro lado, camundongos ApoE (-/-) com esteatose hepática apresentaram expressão aumentada de F4/80 juntamente com *Mcp-1* e, em menor extensão, *Tnf-* α e *Il-6*. A redução da inflamação hepática acompanhou a diminuição da infiltração de macrófagos residentes e da inflamação lobular, aliviando a esteatose hepática acentuada e acúmulo de TAG hepático, como observado no grupo HF. Após os tratamentos propostos, a fraca marcação F4/80 acompanhou a diminuição da taxa de esteatose. Estas observações sugerem que na esteatose, o número de macrófagos residentes no tecido hepático difere dos estágios mais avançados deste espectro. A Figura 18 resume os principais achados deste estudo.





Legenda: A dieta HF causou disbiose e rompeu a barreira intestinal com redução de células caliciformes por densidade numérica, expressão gênica de Mucina-2 e de TJs. Assim, o LPS extravassou e atingiu o figado, ativando a cascata endotóxica Lbp-Cd14-Tlr4-Il-18-Nlrp3. Esse cenário favoreceu a lipogênese em detrimento da beta-oxidação, levando à esteatose hepática. Por outro lado, a combinação PPAR-αγ atenuou esses distúrbios metabólicos induzidos pela dieta hiperlipídica, modulando a microbiota intestinal, restaurando a barreira intestinal e mitigando a DHGM. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Abreviações: *Cd14* - Receptor padrão de reconhecimento de moléculas 14; *CptIa* -Carnitina palmitoiltransferase Ia; *Fgf21* -Fator de Crescimento de Fibroblastos 21; HF, Dieta Hiperlipídica; *Il-18* – Interleucina-18; *Jam-a* - Molécula De Adesão Juncional-A; *Lbp* – Proteína de ligação ao LPS; LPS, lipopolissacarídeos; *Nlrp3* – Inflamossoma; *Sirt1* – Sirtuína; *Srebp-1c* - fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1; *Tlr4* receptor do tipo Toll 4. Fonte: A autora, 2024.

CONCLUSÃO

Em conclusão, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram disbiose intestinal e comprometimento da barreira intestinal (redução das células produtoras de muco e da expressão de genes TJs), levando ao extravasamento de endotoxinas para o figado. Este cenário aumentou os marcadores esteatóticos hepáticos e favoreceu o início da DHGM. O tratamento com agonistas PPARs aumentaram a expressão dos genes TJs e a densidade numérica das células caliciformes, cessou a endotoxemia e os sinais esteatótico que desencadeiam a DHGM. A combinação PPAR- α/γ foi o único tratamento que normalizou a MC dos animais. Este estudo traz como inédito resultados de que o uso de pioglitazona em baixa dose e a associação dos PPAR α/γ (WY-14643 + pioglitazona) podem emergir como estratégias de estudos futuros para o tratamento da DHGM.

Algumas limitações do presente estudo incluem a falta de amostras suficientes para abordar a diversidade da microbiota e outros níveis taxonômicos, além da ausência de camundongos fêmeas para abordar o dimorfismo sexual.

REFERÊNCIAS

- 1. Green M, Arora K, Prakash S. Microbial Medicine: Prebiotic and Probiotic Functional Foods to Target Obesity and Metabolic Syndrome. Int J Mol Sci [Internet]. 2 de abril de 2020 [citado 8 de agosto de 2023];21(8). Disponível em: /pmc/articles/PMC7215979/
- Boutari C, Mantzoros CS. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. Metabolism [Internet]. 1° de agosto de 2022 [citado 8 de agosto de 2023];133:155217. Disponível em: /pmc/articles/PMC9107388/
- Szmygin H, Szmygin M, Cheda M, Kłobuszewski B, Drelich-Zbroja A, Matyjaszek-Matuszek B. Current Insights into the Potential Role of fMRI in Discovering the Mechanisms Underlying Obesity. J Clin Med [Internet]. 29 de junho de 2023 [citado 8 de agosto de 2023];12(13):4379. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37445414/
- 4. Zhou Y, Li C, Wang X, Deng P, He W, Zheng H, et al. Integration of FGF21 Signaling and Metabolomics in High-Fat Diet-Induced Obesity. J Proteome Res [Internet]. 6 de agosto de 2021 [citado 8 de agosto de 2023];20(8):3900–12. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34237942/
- 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 [Internet]. 2017 [citado 8 de agosto de 2023];147(5):770–80. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356436/
- 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 [Internet]. 1º de fevereiro de 2016 [citado 8 de agosto de 2023];83(2):109–18. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26524607/
- Shen F, Zheng RD, Sun XQ, Ding WJ, Wang XY, Fan JG. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Hepatobiliary Pancreat Dis Int [Internet]. 15 de agosto de 2017 [citado 8 de agosto de 2023];16(4):375–81. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28823367/
- Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. Cell Metab [Internet]. 6 de outubro de 2015 [citado 24 de setembro de 2023];22(4):658– 68. Disponível em: http://www.cell.com/article/S1550413115003897/fulltext
- Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]. 2021 [citado 24 de setembro de 2023];78:1233–61. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y
- 10. Fukunishi S, Sujishi T, Takeshita A, Ohama H, Tsuchimoto Y, Asai A, et al. Lipopolysaccharides accelerate hepatic steatosis in the development of nonalcoholic fatty

liver disease in Zucker rats. J Clin Biochem Nutr [Internet]. janeiro de 2014 [citado 24 de setembro de 2023];54(1):39. Disponível em: /pmc/articles/PMC3882483/

- Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. Hepatology [Internet]. 1º de agosto de 2020 [citado 24 de setembro de 2023];72(2):470–85. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.31056
- Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut [Internet]. dezembro de 2013 [citado 8 de agosto de 2023];62(12):1787–94. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197411/
- Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhah M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, doubleblind, placebo-controlled pilot study. Am J Clin Nutr [Internet]. 1º de março de 2014 [citado 8 de agosto de 2023];99(3):535–42. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24401715/
- Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 1º de janeiro de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];13(1):36–49. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27636730/
- 15. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Fernandes-da-Silva A, Guimarães Pereira VR, Martins BC, Daleprane JB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 15 de fevereiro de 2023 [citado 21 de novembro de 2023];562. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36581062/
- ABESO AB para o E da O e da SM. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 2016. (4 Edição).
- 17. da Costa Louzada ML, da Cruz GL, Silva KAAN, Grassi AGF, Andrade GC, Rauber F, et al. Consumption of ultra-processed foods in Brazil: distribution and temporal evolution 2008–2018. Rev Saude Publica. 2023;57.
- 18. IBGE IB de G e E. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro; 2020.
- 19. IBGE IB de G e E. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.
- Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R., Lottenberg AMP, et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arq Bras Cardiol [Internet]. 2013 [citado 4 de dezembro de 2023];100:1–40. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abc/a/3TLGLy5VWGfTZfvZr8DxBHf
- 21. WHO. Guideline Total fat intake for the prevention of unhealthy weight gain in adults and children. 2023.
- WHO. Guideline Saturated fatty acid and trans-fatty acid intake for adults and children: WHO guideline [Internet]. 2023 [citado 4 de dezembro de 2023]. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240073630
- 23. De Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational

studies. BMJ [Internet]. 12 de agosto de 2015 [citado 4 de dezembro de 2023];351. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26268692/

- Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. Diabetes [Internet]. 2014 [citado 4 de dezembro de 2023];63(7):2356–68. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24550191/
- 25. Clifton PM, Keogh JB. A systematic review of the effect of dietary saturated and polyunsaturated fat on heart disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis [Internet]. 1° de dezembro de 2017 [citado 4 de dezembro de 2023];27(12):1060–80. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29174025/
- 26. Liu X, Harding S V., Rideout TC. Saturated Fat and Cardiovascular Health: Phenotype and Dietary Factors Influencing Interindividual Responsiveness. Curr Atheroscler Rep [Internet]. 1º de maio de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];24(5):391–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35320834/
- 27. Hernández-Rodas MC, Valenzuela R, Echeverría F, Rincón-Cervera MÁ, 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-α and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF-kB Downregulation. Mol Nutr Food Res [Internet]. 1° de dezembro de 2017 [citado 4 de dezembro de 2023];61(12). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28940752/
- 28. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2000 [citado 4 de dezembro de 2023];11(8):327–32. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10996528/
- Guyenet SJ, Schwartz MW. Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. março de 2012 [citado 4 de dezembro de 2023];97(3):745– 55. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22238401/
- 30. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2000 [citado 4 de dezembro de 2023];11(9):351–6. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11042464/
- 31. Seidell JC, Halberstadt J. The global burden of obesity and the challenges of prevention. Ann Nutr Metab [Internet]. 9 de junho de 2015 [citado 4 de dezembro de 2023];66 Suppl 2:7–12. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26045323/
- 32. Ministério da Saúde. VIGITEL 2023: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas em Inquérito Telefônico. Brasilia; 2023.
- 33. Echeverría 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 [Internet]. 1º de novembro de 2016 [citado 4 de dezembro de 2023];114:28–34. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27926461/
- 34. Prestes J, Bucci M, Urtado CB, Caruso FG, Pereira M, Cavaglieri CR. Lipid Metabolism: supplementation and human perfomance. Saúde em Revista. 2006;8(18):49–54.
- 35. Nelson DL, COX MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 8º ed. Artmed Editora, organizador. 2022.

- 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 [Internet]. 3 de março de 2012 [citado 4 de dezembro de 2023];15(3):279. Disponível em: /pmc/articles/PMC3314979/
- Wallace SS, Barak G, Truong G, Parker MW. Hierarchy of Evidence Within the Medical Literature. Hosp Pediatr [Internet]. 1º de agosto de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];12(8):745–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35909178/
- Evans D. Hierarchy of evidence: a framework for ranking evidence evaluating healthcare interventions. J Clin Nurs [Internet]. 1º de janeiro de 2003 [citado 4 de dezembro de 2023];12(1):77–84. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519253/
- Vasques-Monteiro IML, Souza-Mello V. Coronavirus disease 2019 severity in obesity: Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in the spotlight. http://www.wjgnet.com/ [Internet]. 28 de abril de 2021 [citado 3 de setembro de 2021];27(16):1738–50. Disponível em: https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v27/i16/1738.htm
- Kern M, Knigge A, Heiker JT, Kosacka J, Stumvoll M, Kovacs P, et al. C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO). Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 13 de janeiro de 2012 [citado 4 de dezembro de 2023];417(2):717–20. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22177950/
- 41. Raatz SK, Conrad Z, Johnson LAK, Picklo MJ, Jahns L. Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. Nutrients [Internet]. 1° de maio de 2017 [citado 4 de dezembro de 2023];9(5). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28452961/
- 42. Funk MC, Zhou J, Boutros M. Ageing, metabolism and the intestine. EMBO Rep [Internet]. 3 de julho de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];21(7). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32567155/
- 43. Netter F. Atlas de Anatomia Humana. 7º ed. Koogan G, organizador. 2018.
- 44. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10º ed. 2004.
- 45. Birchenough GMH, Nystrom EEL, Johansson MEV, Hansson GC. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. Science [Internet]. 24 de junho de 2016 [citado 3 de dezembro de 2023];352(6293):1535–42. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27339979/
- 46. Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. Front Immunol [Internet]. 4 de setembro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];11. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33013869/
- Bergstrom K, Shan X, Casero D, Batushansky A, Lagishetty V, Jacobs JP, et al. Proximal colon-derived O-glycosylated mucus encapsulates and modulates the microbiota. Science [Internet]. 23 de outubro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];370(6515). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33093110/
- 48. Krupa L, Bajka B, Staroń R, Dupont D, Singh H, Gutkowski K, et al. Comparing the permeability of human and porcine small intestinal mucus for particle transport studies. Sci Rep [Internet]. 1º de dezembro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];10(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33219331/

- 49. Gustafsson JK, Johansson MEV. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]. 1° de dezembro de 2022 [citado 3 de dezembro de 2023];19(12):785–803. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36097076/
- 50. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. Chest [Internet]. 1° de julho de 2018 [citado 3 de dezembro de 2023];154(1):169–76. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29170036/
- 51. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. Anim Sci J [Internet]. 1° de janeiro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];91(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32219956/
- 52. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. Trends Cell Biol [Internet]. 1° de outubro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];30(10):805–17. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32891490/
- 53. Rao R. Occludin Phosphorylation in Regulation of Epithelial Tight Junctions. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 1º de maio de 2009 [citado 3 de dezembro de 2023];1165(1):62–8. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2009.04054.x
- 54. Liu BN, Liu XT, Liang ZH, Wang JH. Gut microbiota in obesity. World J Gastroenterol [Internet]. 7 de julho de 2021 [citado 3 de dezembro de 2023];27(25):3837. Disponível em: /pmc/articles/PMC8291023/
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science [Internet]. 18 de dezembro de 2009 [citado 25 de janeiro de 2024];326(5960):1694–7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19892944/
- 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 [Internet]. 1º de julho de 2021 [citado 3 de dezembro de 2023];22(13). Disponível em: /pmc/articles/PMC8268081/
- 57. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. Nature [Internet]. 8 de março de 2018 [citado 3 de dezembro de 2023];555(7695):210–5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29489753/
- 58. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Souza-Tavares H, Martins FF, Daleprane JB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and dipeptidyl peptidase-4 inhibition target dysbiosis to treat fatty liver in obese mice. World J Gastroenterol [Internet]. 7 de maio de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];28(17):1814–29. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35633911/
- 59. 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 [Internet]. 1° de outubro de 2020 [citado 21 de novembro de 2023];247(1):11–24. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698143/
- 60. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Fernandes-da-Silva A, Guimarães Pereira VR, Martins BC, Daleprane JB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma synergism modulate the gut-adipose tissue axis and mitigate obesity. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 15 de fevereiro de 2023 [citado 21 de novembro de 2023];562. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36581062/
- Zhang H, Sparks JB, Karyala S V., Settlage R, Luo XM. Host adaptive immunity alters gut microbiota. ISME J [Internet]. 25 de março de 2015 [citado 3 de dezembro de 2023];9(3):770–81. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25216087/
- Rosshart SP, Herz J, Vassallo BG, Hunter A, Wall MK, Badger JH, et al. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. Science [Internet]. 2 de agosto de 2019 [citado 3 de dezembro de 2023];365(6452). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31371577/
- 63. Mou Y, Du Y, Zhou L, Yue J, Hu X, Liu Y, et al. Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. Front Immunol [Internet]. 7 de abril de 2022 [citado 3 de dezembro de 2023];13. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35464431/
- 64. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. Cell [Internet]. 1º de dezembro de 2016 [citado 3 de dezembro de 2023];167(6):1469-1480.e12. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27912057/
- 65. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. Genome Res [Internet]. dezembro de 2009 [citado 3 de dezembro de 2023];19(12):2317–23. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819907/
- 66. Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley RE. Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. Science [Internet]. 29 de abril de 2016 [citado 3 de dezembro de 2023];352(6285):532–5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126034/
- 67. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients [Internet]. 1º de maio de 2020 [citado 3 de dezembro de 2023];12(5). Disponível em: /pmc/articles/PMC7285218/
- Ppatil D, Pdhotre D, Gchavan S, Sultan A, Jain DS, Lanjekar VB, et al. Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals. J Biosci [Internet]. setembro de 2012 [citado 3 de dezembro de 2023];37(4):647–57. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922190/
- Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. ISME J [Internet]. abril de 2013 [citado 3 de dezembro de 2023];7(4):707–17. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23190729/
- Aguirre M, Venema K. Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling. Microorganisms [Internet]. 1º de junho de 2015 [citado 3 de dezembro de 2023];3(2):213–35. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27682087/
- Salonen A, De Vos WM. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. Annu Rev Food Sci Technol [Internet]. 2014 [citado 3 de dezembro de 2023];5(1):239–62. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24387608/
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking longterm dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science [Internet]. 7 de outubro de 2011 [citado 3 de dezembro de 2023];334(6052):105–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21885731/

- 73. Vasques-Monteiro IML, Silva-Veiga FM, Miranda CS, de Andrade Gonçalves ÉCB, Daleprane JB, Souza-Mello V. A rise in Proteobacteria is an indicator of gut-liver axismediated nonalcoholic fatty liver disease in high-fructose-fed adult mice. Nutr Res [Internet]. 1º de julho de 2021 [citado 9 de novembro de 2023];91:26–35. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34130208/
- 74. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative Anatomy and Histology. Comparative Anatomy and Histology. 2012;
- 75. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]. 1° de setembro de 2018 [citado 26 de novembro de 2023];75(18):3313. Disponível em: /pmc/articles/PMC6105174/
- De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Insights. Curr Pharm Des. 3 de agosto de 2013;19(29):5239–49.
- Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. Metabolism [Internet]. 2014 [citado 26 de novembro de 2023];63(7):895– 902. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24814684/
- 78. Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. J Cell Sci [Internet]. 1º de setembro de 2005 [citado 26 de novembro de 2023];118(Pt 17):3905–15. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16091421/
- 79. 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 [Internet]. 2016 [citado 26 de novembro de 2023];230(2):227–37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288055/
- Byrne CD. Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids [Internet]. abril de 2010 [citado 26 de novembro de 2023];82(4–6):265–71. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20189787/
- Silva-Veiga FM, Rachid TL, de Oliveira L, Graus-Nunes F, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 15 de outubro de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];474:227– 37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29580823/
- 82. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abbastabar H, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet [Internet]. 17 de outubro de 2020 [citado 26 de novembro de 2023];396(10258):1204–22. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33069326/
- 83. Karnikowski M, Córdova C, de Oliveira RJ, de Oliveira Karnikowski MG, de Tolêdo Nóbrega O. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. Sao Paulo Medical Journal [Internet]. 2007 [citado 26 de novembro de 2023];125(6):333–7. Disponível em: https://www.scielo.br/j/spmj/a/4dkd6pVRd8mjHFv3k6Sd3Vh/
- 84. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international

expert consensus statement. J Hepatol [Internet]. 1º de julho de 2020 [citado 25 de janeiro de 2024];73(1):202–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32278004/

- Bofton C, Upendran Y, Zheng MH, George J. MAFLD: How is it different from NAFLD? Clin Mol Hepatol [Internet]. 1º de fevereiro de 2023 [citado 26 de novembro de 2023];29(Suppl):S17. Disponível em: /pmc/articles/PMC10029949/
- 86. Badmus OO, Hillhouse SA, Anderson CD, Hinds TD, Stec DE. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. Clin Sci (Lond) [Internet]. 1º de setembro de 2022 [citado 26 de novembro de 2023];136(18):1347. Disponível em: /pmc/articles/PMC9508552/
- 87. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. JAMA [Internet]. 24 de março de 2020 [citado 23 de janeiro de 2024];323(12):1175–83. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32207804/
- Bae SDW, George J, Qiao L. From MAFLD to hepatocellular carcinoma and everything in between. Chin Med J (Engl) [Internet]. 3 de março de 2022 [citado 23 de janeiro de 2024];135(5):547. Disponível em: /pmc/articles/PMC8920461/
- 89. Matos AF de G, Valério CM, Silva Junior WS da, Araújo Neto JM de, Giacaglia LR, Bertoluci MC. Doença hepática gordurosa metabólica (DHGM). Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2023;
- 90. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol [Internet]. 1º de maio de 2016 [citado 4 de dezembro de 2023];31(5):936–44. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667191/
- 91. Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. Int J Mol Sci [Internet]. 2 de abril de 2021 [citado 4 de dezembro de 2023];22(8). Disponível em: /pmc/articles/PMC8072900/
- 92. Zhang J, Feng Q. Pharmacological Effects and Molecular Protective Mechanisms of Astragalus Polysaccharides on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Front Pharmacol [Internet]. 3 de março de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];13. Disponível em: /pmc/articles/PMC8929346/
- 93. Tilg H, Adolph TE, Trauner M. Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications. Cell Metab [Internet]. 1º de novembro de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];34(11):1700–18. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36208625/
- 94. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. Am J Clin Nutr [Internet]. 1º de novembro de 2007 [citado 3 de dezembro de 2023];86(5):1286–92. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991637/
- 95. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. Rev Endocr Metab Disord [Internet]. 1º de dezembro de 2019 [citado 3 de dezembro de 2023];20(4):461. Disponível em: /pmc/articles/PMC6938793/
- 96. Santana-Oliveira DA, Souza-Tavares H, Fernandes-da-Silva A, Silva-Veiga FM, Casimiro-Lopes G, Cristina Lisboa P, et al. Exercise prevents obesity by reducing gutderived inflammatory signals to brown adipocytes in mice. J Endocrinol [Internet]. 1º de

setembro de 2023 [citado 3 de dezembro de 2023];259(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37462522/

- 97. Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. Physiology (Bethesda) [Internet]. 1º de julho de 2016 [citado 3 de dezembro de 2023];31(4):283–93. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27252163/
- 98. Kang K, Sun Y, Pan D, Sang LX, Sun MJ, Li YL, et al. Distinctive gut microbial dysbiosis between chronic alcoholic fatty liver disease and metabolic-associated fatty liver disease in mice. Exp Ther Med [Internet]. 25 de fevereiro de 2021 [citado 3 de dezembro de 2023];21(5). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33777186/
- 99. Violi F, Cammisotto V, Bartimoccia S, Pignatelli P, Carnevale R, Nocella C. Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol [Internet]. 1º de janeiro de 2023 [citado 3 de dezembro de 2023];20(1):24–37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35840742/
- 100. Whitsett M, VanWagner LB. Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. World J Hepatol [Internet]. 2015 [citado 4 de dezembro de 2023];7(16):2041–52. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261693/
- 101.Montemayor S, Mascaró CM, Ugarriza L, Casares M, Llompart I, Abete I, et al. Adherence to Mediterranean Diet and NAFLD in Patients with Metabolic Syndrome: The FLIPAN Study. Nutrients [Internet]. 1º de agosto de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];14(15). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35956364/
- 102.Mirabelli M, Chiefari E, Arcidiacono B, Corigliano DM, Brunetti FS, Maggisano V, et al. Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. Nutrients [Internet]. 1º de abril de 2020 [citado 4 de dezembro de 2023];12(4). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32290535/
- 103.Pereira MJ, Eriksson JW. Emerging Role of SGLT-2 Inhibitors for the Treatment of Obesity. Drugs [Internet]. 28 de fevereiro de 2019 [citado 4 de dezembro de 2023];79(3):219–30. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30701480/
- 104.Leiter LA, Forst T, Polidori D, Balis DA, Xie J, Sha S. Effect of canagliflozin on liver function tests in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab [Internet]. 1º de fevereiro de 2016 [citado 4 de dezembro de 2023];42(1):25–32. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26575250/
- 105.Benetti E, Mastrocola R, Vitarelli G, Cutrin JC, Nigro D, Chiazza F, et al. Empagliflozin Protects against Diet-Induced NLRP-3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. J Pharmacol Exp Ther [Internet]. 1º de outubro de 2016 [citado 4 de dezembro de 2023];359(1):45–53. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27440421/
- 106.Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT. Evolution of NAFLD and Its Management. Nutr Clin Pract [Internet]. 1º de fevereiro de 2020 [citado 4 de dezembro de 2023];35(1):72–84. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31840865/
- 107.Shao N, Yu XY, Ma XF, Lin WJ, Hao M, Kuang HY. Exenatide Delays the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in C57BL/6 Mice, Which May Involve Inhibition of the NLRP3 Inflammasome through the Mitophagy Pathway. Gastroenterol Res Pract [Internet]. 2018 [citado 4 de dezembro de 2023];2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29849583/

- 108.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 [Internet]. outubro de 2011 [citado 4 de dezembro de 2023];31(9):1285–97. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21745271/
- 109.Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, et al. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. Diabetes [Internet]. abril de 2011 [citado 4 de dezembro de 2023];60(4):1246–57. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21330637/
- 110. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, et al. Rosiglitazone for Nonalcoholic Steatohepatitis: One-Year Results of the Randomized Placebo-Controlled Fatty Liver Improvement With Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. Gastroenterology. 2008;135(1):100–10.
- 111. Fougerat A, Montagner A, Loiseau N, Guillou H, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Novel Ligands as Candidates for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Cells [Internet]. 8 de julho de 2020 [citado 4 de dezembro de 2023];9(7). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32650421/
- 112. Abdelmoneim D, El-Adl M, El-Sayed G, El-Sherbini ES. Protective effect of fenofibrate against high-fat-high-fructose diet induced non-obese NAFLD in rats. Fundam Clin Pharmacol [Internet]. 1º de abril de 2021 [citado 4 de dezembro de 2023];35(2):379–88. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32757283/
- 113. Arai H, Yamashita S, Yokote K, Araki E, Suganami H, Ishibashi S. Efficacy and Safety of Pemafibrate Versus Fenofibrate in Patients with High Triglyceride and Low HDL Cholesterol Levels: A Multicenter, Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomized Trial. J Atheroscler Thromb [Internet]. 2018 [citado 4 de dezembro de 2023];25(6):521–38. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29628483/
- 114. Akbari R, Behdarvand T, Afarin R, Yaghooti H, Jalali MT, Mohammadtaghvaei N. Saroglitazar improved hepatic steatosis and fibrosis by modulating inflammatory cytokines and adiponectin in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. BMC Pharmacol Toxicol [Internet]. 1º de dezembro de 2021 [citado 4 de dezembro de 2023];22(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34593018/
- 115. Wettstein G, Luccarini JM, Poekes L, Faye P, Kupkowski F, Adarbes V, et al. The newgeneration pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. Hepatol Commun [Internet]. 2017 [citado 4 de dezembro de 2023];1(6):524–37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29404476/
- 116. Barbosa-Da-Silva S, Souza-Mello V, Magliano DC, Marinho TDS, Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. Life Sci [Internet]. 15 de abril de 2015 [citado 4 de dezembro de 2023];127:73–81. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25748419/
- 117. Qiang G, Zhang L, Yang X, Xuan Q, Shi L, Zhang H, et al. Effect of valsartan on the pathological progression of hepatic fibrosis in rats with type 2 diabetes. Eur J Pharmacol [Internet]. 15 de junho de 2012 [citado 4 de dezembro de 2023];685(1–3):156–64. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546234/

- 118. Wang CH, Liu HM, Chang ZY, Huang TH, Lee TY. Losartan Prevents Hepatic Steatosis and Macrophage Polarization by Inhibiting HIF-1α in a Murine Model of NAFLD. Int J Mol Sci [Internet]. 1° de agosto de 2021 [citado 4 de dezembro de 2023];22(15). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34360607/
- 119. Verbeek J, Spincemaille P, Vanhorebeek I, Van Den Berghe G, Vander Elst I, Windmolders P, et al. Dietary intervention, but not losartan, completely reverses nonalcoholic steatohepatitis in obese and insulin resistant mice. Lipids Health Dis [Internet].
 23 de fevereiro de 2017 [citado 4 de dezembro de 2023];16(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231800/
- 120.Nobili V, Manco M, Devito R, Ciampalini P, Piemonte F, Marcellini M. Effect of vitamin E on aminotransferase levels and insulin resistance in children with non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther [Internet]. dezembro de 2006 [citado 4 de dezembro de 2023];24(11–12):1553–61. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17206944/
- 121.Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. JAMA [Internet]. 27 de abril de 2011 [citado 4 de dezembro de 2023];305(16):1659–68. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21521847/
- 122.Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS. Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. Int J Mol Sci [Internet]. 2 de outubro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];20(20). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31614690/
- 123.Hong F, Xu P, Zhai Y. The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. Int J Mol Sci [Internet]. 1º de agosto de 2018 [citado 25 de janeiro de 2024];19(8). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30060458/
- 124.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 [Internet]. 1° de outubro de 2020 [citado 21 de novembro de 2023];78. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32682271/
- 125.Souza-Tavares H, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Sandoval C, Santana-Oliveira DA, Silva-Veiga FM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas. World J Gastroenterol [Internet]. 14 de julho de 2023 [citado 21 de novembro de 2023];29(26):4136–55. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37475842/
- 126. Wagner N, Wagner KD. PPAR Beta/Delta and the Hallmarks of Cancer. Cells [Internet]. 4 de maio de 2020 [citado 21 de novembro de 2023];9(5). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32375405/
- 127.Kumar AP, P P, Kumar BRP, Jeyarani V, Dhanabal SP, Justin A. Glitazones, PPAR-γ and Neuroprotection. Mini Rev Med Chem [Internet]. 5 de março de 2021 [citado 21 de novembro de 2023];21(12):1457–64. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33663364/
- 128.Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors.

Pharmacol Rev [Internet]. dezembro de 2006 [citado 21 de novembro de 2023];58(4):726–41. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17132851/

- 129.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 [Internet]. 15 de março de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];166:502–13. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30739829/
- 130.Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature [Internet]. 1990 [citado 21 de novembro de 2023];347(6294):645–50. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2129546/
- 131.Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, et al. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. J Steroid Biochem Mol Biol [Internet]. 1993 [citado 21 de novembro de 2023];47(1–6):65–73. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8274443/
- 132.Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferatoractivated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 19 de julho de 1994 [citado 21 de novembro de 2023];91(15):7355–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8041794/
- 133.Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPARα in Lipid Metabolism and Inflammation. Endocr Rev [Internet]. 1° de outubro de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];39(5):760–802. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020428/
- 134.Liu X, Hu M, Ye C, Liao L, Ding C, Sun L, et al. Isosilybin regulates lipogenesis and fatty acid oxidation via the AMPK/SREBP-1c/PPARα pathway. Chem Biol Interact [Internet]. 1° de dezembro de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];368. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36347319/
- 135.Han L, Shen WJ, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S. PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-β/δ and PPAR-γ. Future Cardiol [Internet]. 1° de maio de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];13(3):279–96. Disponível em: /pmc/articles/PMC5941699/
- 136.Alemán-González-Duhart D, Tamay-Cach F, Álvarez-Almazán S, Mendieta-Wejebe JE. Current Advances in the Biochemical and Physiological Aspects of the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus with Thiazolidinediones. PPAR Res [Internet]. 2016 [citado 21 de novembro de 2023];2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313601/
- 137.Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene--a review. Diabetes Metab Syndr [Internet]. 1º de janeiro de 2015 [citado 21 de novembro de 2023];9(1):46–50. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25450819/
- 138.Lebovitz HE. Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. Curr Diab Rep [Internet]. 1° de dezembro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];19(12). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776781/
- 139.Park S, Zhang T, Yue Y, Wu X. Effects of Bile Acid Modulation by Dietary Fat, Cholecystectomy, and Bile Acid Sequestrant on Energy, Glucose, and Lipid Metabolism and Gut Microbiota in Mice. Int J Mol Sci [Internet]. 1º de junho de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];23(11). Disponível em: /pmc/articles/PMC9180239/

- 140.Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferatoractivated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 19 de julho de 1994 [citado 21 de novembro de 2023];91(15):7355–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8041794/
- 141.Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. Reprod Toxicol [Internet]. junho de 2009 [citado 21 de novembro de 2023];27(3–4):246–57. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996469/
- 142.Ding Y, Yang KD, Yang Q. The role of PPARδ signaling in the cardiovascular system. Prog Mol Biol Transl Sci [Internet]. 2014 [citado 21 de novembro de 2023];121:451–73. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24373246/
- 143.Rachid TL, Silva-Veiga FM, Graus-Nunes F, Bringhenti I, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. 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 [Internet]. 1° de janeiro de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];13(1). Disponível em: /pmc/articles/PMC5774787/
- 144.Mansour M. The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. Prog Mol Biol Transl Sci [Internet]. 2014 [citado 21 de novembro de 2023];121:217–66. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24373239/
- 145.Zuo X, Deguchi Y, Xu W, Liu Y, Li HS, Wei D, et al. PPARD and Interferon Gamma Promote Transformation of Gastric Progenitor Cells and Tumorigenesis in Mice. Gastroenterology [Internet]. 1º de julho de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];157(1):163–78. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30885780/
- 146. Wang D, Fu L, Ning W, Guo L, Sun X, Dey SK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor ä promotes colonic inflammation and tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 13 de maio de 2014 [citado 21 de novembro de 2023];111(19):7084–9. Disponível em: /pmc/articles/PMC4024916/
- 147.Golan DE e RHS. Princípios da Farmacologia . 3º ed. 2014.
- 148.Marinovic MP, Sousa-Filho CPB, Batista FAH, Avelino TM, Cogliati B, Figueira ACM, et al. Green tea extract increases adiponectin and PPAR α levels to improve hepatic steatosis. J Nutr Biochem [Internet]. 1° de maio de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];103. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35134507/
- 149.Lukitasari M, Nugroho D, Rohman M, Widodo N, Farmawati A, Hastuti P. Beneficial effects of green coffee and green tea extract combination on metabolic syndrome improvement by affecting AMPK and PPAR-α gene expression. J Adv Pharm Technol Res [Internet]. 1° de abril de 2020 [citado 21 de novembro de 2023];11(2):81–5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32587821/
- 150.Ochiai M, Takeuchi T, Nozaki T, Ishihara K o., Matsuo T. Kaempferia parviflora Ethanol Extract, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligand-binding Agonist, Improves Glucose Tolerance and Suppresses Fat Accumulation in Diabetic NSY Mice. J Food Sci [Internet]. 1º de fevereiro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];84(2):339–48. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30726580/
- 151.Manio MC, Matsumura S, Inoue K. Low-fat diet, and medium-fat diets containing coconut oil and soybean oil exert different metabolic effects in untrained and treadmill-

trained mice. J Int Soc Sports Nutr [Internet]. 18 de junho de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];15(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29914522/

- 152.López-Salazar V, Tapia MS, Tobón-Cornejo S, Díaz D, Alemán-Escondrillas G, Granados-Portillo O, et al. Consumption of soybean or olive oil at recommended concentrations increased the intestinal microbiota diversity and insulin sensitivity and prevented fatty liver compared to the effects of coconut oil. J Nutr Biochem. 1º de agosto de 2021;94:108751.
- 153. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. Lipids Health Dis [Internet]. 2009 [citado 21 de novembro de 2023];8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558671/
- 154.Bigagli E, Toti S, Lodovici M, Giovannelli L, Cinci L, D'Ambrosio M, et al. Dietary Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols Do Not Attenuate Colon Inflammation in Transgenic HLAB-27 Rats but Exert Hypocholesterolemic Effects through the Modulation of HMGCR and PPAR-α Gene Expression in the Liver. Lifestyle Genom [Internet]. 1° de fevereiro de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];11(2):99–108. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630166/
- 155.Luo W, Xu Q, Wang Q, Wu H, Hua J. Effect of modulation of PPAR-γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. Sci Rep [Internet]. 16 de março de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28300213/
- 156.Guarda DS, de Moura EG, Carvalho JC, Reis AM dos, Soares PN, Lisboa PC, et al. Maternal flaxseed oil intake during lactation changes body fat, inflammatory markers and glucose homeostasis in the adult progeny: role of gender dimorphism. J Nutr Biochem. 1° de setembro de 2016;35:74–80.
- 157.Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. Eur J Pharmacol [Internet]. 2016 [citado 21 de novembro de 2023];785:44–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26632493/
- 158. Wang W, Lin Q, Lin R, Zhang J, Ren F, Zhang J, et al. PPARα agonist fenofibrate attenuates TNF-α-induced CD40 expression in 3T3-L1 adipocytes via the SIRT1dependent signaling pathway. Exp Cell Res [Internet]. 10 de junho de 2013 [citado 21 de novembro de 2023];319(10):1523–33. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23603572/
- 159.Jin L, Hua H, Ji Y, Jia Z, Peng M, Huang S. Anti-inflammatory role of fenofibrate in treating diseases. Biomolecules and Biomedicine [Internet]. 6 de junho de 2023 [citado 21 de novembro de 2023];23(3):376. Disponível em: /pmc/articles/PMC10171448/
- 160.Okopień B, Bułdak Ł, Bołdys A. Benefits and risks of the treatment with fibrates--a comprehensive summary. Expert Rev Clin Pharmacol [Internet]. 2 de novembro de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];11(11):1099–112. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30328735/
- 161. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz brasileira de dislipidemia e prevenção da aterosclerose . 2017.
- 162.Hassan GS, Georgey HH, Mohammed EZ, Omar FA. Anti-hepatitis-C virus activity and QSAR study of certain thiazolidinone and thiazolotriazine derivatives as potential NS5B

polymerase inhibitors. Eur J Med Chem [Internet]. 15 de dezembro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];184. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31604164/

- 163.Moorkoth S. Synthesis and Anti-cancer Activity of Novel Thiazolidinone Analogs of 6-Aminoflavone. Chem Pharm Bull (Tokyo) [Internet]. 1º de dezembro de 2015 [citado 21 de novembro de 2023];63(12):974–85. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26369709/
- 164.Hu J, Wang Y, Wei X, Wu X, Chen G, Cao G, et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. Eur J Med Chem [Internet]. 2013 [citado 21 de novembro de 2023];64:292–301. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23644212/
- 165.Liaras K, Fesatidou M, Geronikaki A. Thiazoles and Thiazolidinones as COX/LOX Inhibitors. Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry [Internet]. 2018 [citado 21 de novembro de 2023];23(3). Disponível em: /pmc/articles/PMC6017610/
- 166.Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. Bioorg Chem [Internet]. 1º de abril de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];77:548–67. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29475164/
- 167.Gale EAM. Lessons from the glitazones: A story of drug development. Lancet [Internet]. 9 de junho de 2001 [citado 21 de novembro de 2023];357(9271):1870–5. Disponível em: http://www.thelancet.com/article/S0140673600049606/fulltext
- 168.Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. Arch Intern Med [Internet]. 26 de julho de 2010 [citado 21 de novembro de 2023];170(14):1191–201. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/225844
- 169.Cusi K, Isaacs S, Barb D, Basu R, Caprio S, Garvey WT, et al. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care and Endocrinology Clinical Settings: Co-Sponsored by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Endocr Pract [Internet]. 1º de maio de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];28(5):528– 62. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35569886/
- 170.Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes DHGM. 2023.
- 171.de-Lima-Júnior JC, Rodovalho S, Van de Sande-Lee S, Monfort-Pires M, Rachid B, Cintra RM, et al. Effect of pioglitazone treatment on brown adipose tissue volume and activity and hypothalamic gliosis in patients with type 2 diabetes mellitus: a proof-ofconcept study. Acta Diabetol [Internet]. 1° de dezembro de 2019 [citado 21 de novembro de 2023];56(12):1333–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31506721/
- 172.Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinelli C, Boccuzzi G, et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. Br J Pharmacol [Internet]. 1° de agosto de 2010 [citado 21 de novembro de 2023];160(8):1892–902. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2010.00671.x
- 173. Yanai H, Adachi H. The Low-Dose (7.5 mg/day) Pioglitazone Therapy. J Clin Med Res [Internet]. 2017 [citado 21 de novembro de 2023];9(10):821. Disponível em: /pmc/articles/PMC5593428/

- 174.Gawrieh S, Noureddin M, Loo N, Mohseni R, Awasty V, Cusi K, et al. Saroglitazar, a PPAR-α/γ Agonist, for Treatment of NAFLD: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial. Hepatology [Internet]. 1° de outubro de 2021 [citado 21 de novembro de 2023];74(4):1809–24. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811367/
- 175.Siddiqui MS, Parmar D, Sheikh F, Sarin SK, Cisneros L, Gawrieh S, et al. Saroglitazar, a Dual PPAR α/γ Agonist, Improves Atherogenic Dyslipidemia in Patients With Non-Cirrhotic Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pooled Analysis. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 1º de setembro de 2023 [citado 21 de novembro de 2023];21(10):2597-2605.e2. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36731585/
- 176.Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R, et al. Dual PPARα/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. Liver International [Internet]. 1° de junho de 2018 [citado 21 de novembro de 2023];38(6):1084. Disponível em: /pmc/articles/PMC6001453/
- 177.Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr. GC. 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. novembro de 1993;123(11):1939–51.
- 178.Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alaghband-Zadeh J. A simple measure of insulin resistance. Lancet [Internet]. 8 de julho de 1995 [citado 19 de setembro de 2023];346(8967):120–1. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603193/
- 179.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 [Internet]. novembro de 2011 [citado 19 de setembro de 2023];459(5):477–85. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21901430/
- 180.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods [Internet]. 2001 [citado 19 de setembro de 2023];25(4):402–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/
- 181.Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Gene [Internet]. 30 de setembro de 1994 [citado 19 de setembro de 2023];147(2):157–60. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7926794/
- 182.Santana-Oliveira DA, Fernandes-Da-silva A, Miranda CS, Martins FF, Mandarim-Delacerda CA, Souza-Mello V. A PPAR-alpha agonist and DPP-4 inhibitor mitigate adipocyte dysfunction in obese mice. J Mol Endocrinol [Internet]. 1º de maio de 2022 [citado 21 de novembro de 2023];68(4):225–41. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35302950/
- 183.Dunnett CW. Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. J Am Stat Assoc. 1980;75(372):796–800.
- 184. Veiga FMS, Graus-Nunes F, Rachid TL, Barreto AB, Mandarim-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 [Internet]. 1º de setembro de 2017 [citado 21 de novembro de 2023];140:106–16. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28711683/
- 185.Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: Insulin resistance, fatty liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. J Clin

Biochem Nutr [Internet]. maio de 2010 [citado 25 de maio de 2021];46(3):212–23. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20490316/

- 186.Masuda T, Fu Y, Eguchi A, Czogalla J, Rose MA, Kuczkowski A, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor lowers PPARγ agonist-induced body weight gain by affecting food intake, fat mass, and beige/brown fat but not fluid retention. Am J Physiol Endocrinol Metab [Internet]. 2 de fevereiro de 2014 [citado 24 de setembro de 2023];306(4):E388. Disponível em: /pmc/articles/PMC3923087/
- 187.Pita J, Panadero A, Soriano-Guillén L, Rodríguez E, Rovira A. The insulin sensitizing effects of PPAR-γ agonist are associated to changes in adiponectin index and adiponectin receptors in Zucker fatty rats. Regul Pept [Internet]. 10 de fevereiro de 2012 [citado 24 de setembro de 2023];174(1–3):18–25. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120832/
- 188.de Mendonça M, dos Santos B de AC, de Sousa É, Rodrigues AC. Adiponectin is required for pioglitazone-induced improvements in hepatic steatosis in mice fed a highfat diet. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 24 de setembro de 2023];493. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176759/
- 189.Hiuge A, Tenenbaum A, Maeda N, Benderly M, Kumada M, Fisman EZ, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands, bezafibrate and fenofibrate, on adiponectin level. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. março de 2007 [citado 24 de setembro de 2023];27(3):635–41. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17194889/
- 190.Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, et al. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. Cells [Internet]. 1º de novembro de 2021 [citado 24 de setembro de 2023];10(11). Disponível em: /pmc/articles/PMC8619527/
- 191.Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, Orubu ESF. Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homoeostasis of energy metabolism. Br J Nutr [Internet]. 28 de maio de 2020 [citado 24 de setembro de 2023];123(10):1127–37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32008579/
- 192.Furuse M, Nakatsu D, Hempstock W, Sugioka S, Ishizuka N, Furuse K, et al. Reconstitution of functional tight junctions with individual claudin subtypes in epithelial cells. Cell Struct Funct [Internet]. 2023 [citado 24 de setembro de 2023];48(1):1–17. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36504093/
- 193.Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. J Histochem Cytochem [Internet]. agosto de 2006 [citado 24 de setembro de 2023];54(8):933–44. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16651389/
- 194.Dörfel MJ, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. J Biomed Biotechnol [Internet]. 2012 [citado 24 de setembro de 2023];2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315516/
- 195.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 [Internet]. 1º de outubro de 2016 [citado 24 de setembro de 2023];151(4):733-746.e12. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27342212/

- 196.Xie Y, Ding F, Di W, Lv Y, Xia F, Sheng Y, et al. Impact of a high-fat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middle-aged female mice. Mol Med Rep [Internet]. 2020 [citado 24 de setembro de 2023];21(3):1133–44. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32016468/
- 197.Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. Int J Mol Sci [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 24 de setembro de 2023];21(17):1–14. Disponível em: /pmc/articles/PMC7503654/
- 198.Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes [Internet]. julho de 2007 [citado 24 de setembro de 2023];56(7):1761–72. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456850/
- 199.Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. Exp Mol Med [Internet]. 2013 [citado 4 de dezembro de 2023];45(12). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24310172/
- 200.Gorman A, Golovanov AP. Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 1º de novembro de 2022 [citado 24 de setembro de 2023];180:289–307. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36272656/
- 201.Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 14 de outubro de 2005 [citado 24 de setembro de 2023];336(1):215–22. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125673/
- 202.Castillo-dela Cruz P, Wanek AG, Kumar P, An X, Elsegeiny W, Horne W, et al. Intestinal IL-17R Signaling Constrains IL-18-Driven Liver Inflammation by the Regulation of Microbiome-Derived Products. Cell Rep [Internet]. 19 de novembro de 2019 [citado 24 de setembro de 2023];29(8):2270-2283.e7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31747600/
- 203.Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasomemediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature [Internet]. 2 de fevereiro de 2012 [citado 24 de setembro de 2023];482(7384):179. Disponível em: /pmc/articles/PMC3276682/
- 204.Huang D, Zhao Q, Liu H, Guo Y, Xu H. PPAR-α Agonist WY-14643 Inhibits LPS-Induced Inflammation in Synovial Fibroblasts via NF-kB Pathway. J Mol Neurosci [Internet]. 1° de agosto de 2016 [citado 24 de setembro de 2023];59(4):544–53. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27339772/
- 205.Perdomo MC, Santos JE, Badinga L. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and the PPAR-γ agonist rosiglitazone attenuate lipopolysaccharide-induced TNF-α production by bovine immune cells. Domest Anim Endocrinol [Internet]. outubro de 2011 [citado 24 de setembro de 2023];41(3):118–25. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798687/
- 206.Francis MR, El-Sheakh AR, Suddek GM. Saroglitazar, a dual PPAR-α/γ agonist, alleviates LPS-induced hepatic and renal injury in rats. Int Immunopharmacol [Internet].
 1º de fevereiro de 2023 [citado 24 de setembro de 2023];115. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36681027/
- 207.Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic

fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. Clin Sci (Lond) [Internet]. agosto de 2012 [citado 8 de agosto de 2023];123(4):259–70. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22420611/

- 208.Pawlak M, Baugé E, Bourguet W, De Bosscher K, Lalloyer F, Tailleux A, et al. The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. Hepatology [Internet]. 1º de novembro de 2014 [citado 24 de setembro de 2023];60(5):1593–606. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24995693/
- 209.Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song BJ. PPARalpha expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. J Nutr [Internet]. 1° de abril de 2011 [citado 24 de setembro de 2023];141(4):603–10. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346097/
- 210.Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. Ann Intern Med [Internet]. 6 de setembro de 2016 [citado 24 de setembro de 2023];165(5):305–15. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27322798/
- 211. Kumar DP, Caffrey R, Marioneaux J, Santhekadur PK, Bhat M, Alonso C, et al. The PPAR α/γ Agonist Saroglitazar Improves Insulin Resistance and Steatohepatitis in a Diet Induced Animal Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Sci Rep [Internet]. 1º de dezembro de 2020 [citado 24 de setembro de 2023];10(1). Disponível em: /pmc/articles/PMC7283326/
- 212.Raza S, Rajak S, Upadhyay A, Tewari A, Sinha RA. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. Front Biosci (Landmark Ed) [Internet]. 1° de janeiro de 2021 [citado 4 de dezembro de 2023];26(2):206–37. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33049668/
- 213.Luo X, Li H, Ma L, Zhou J, Guo X, Woo SL, et al. Expression of STING Is Increased in Liver Tissues From Patients With NAFLD and Promotes Macrophage-Mediated Hepatic Inflammation and Fibrosis in Mice. Gastroenterology [Internet]. 1º de dezembro de 2018 [citado 24 de setembro de 2023];155(6):1971-1984.e4. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30213555/
- 214.Barreby E, Chen P, Aouadi M. Macrophage functional diversity in NAFLD more than inflammation. Nature Reviews Endocrinology 2022 18:8 [Internet]. 9 de maio de 2022 [citado 4 de dezembro de 2023];18(8):461–72. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41574-022-00675-6
- 215.Nasiri-Ansari N, Nikolopoulou C, Papoutsi K, Kyrou I, Mantzoros CS, Kyriakopoulos G, et al. Empagliflozin Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in High Fat Diet Fed ApoE(-/-) Mice by Activating Autophagy and Reducing ER Stress and Apoptosis. Int J Mol Sci [Internet]. 2 de janeiro de 2021 [citado 24 de setembro de 2023];22(2):1–21. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467546/



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Agonistas duo ppar-alfa/gama na modulação do eixo adipoinsular, secreção de insulina e remodelamento das ilhotas pancreáticas" registrado com o nº 020/2022, 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 09/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/08/2026
Espécie / linhagem / raça	Camundongos da linhagem C57BL/6
N° de animais	120
Peso / Idade	20 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 09 de agosto de 2022.

ado fam

Dr. Claudio C. Filgueiras Professor Associado Matr. 33080-3 Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

al abun Villaco

Dra. Yael A. Villaça Professora Associada Matr. 35066-0 Vice Coordenadora CEUA/IBRAG/UERJ

http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO B – Comprovação de submissão do artigo científico

em	Molecular and Cellular Endoci	Vanessa Souza-Mello 🗸						
	Home Main Menu Submit a Manuscript About 🗸 Help 🗸							
	← Submissions Being Processed for Author ① Page: 1 of 1 (<u>1 total submissions</u>) Results per page 10 ✓							
	Action 🗖 🖓	Manuscript Number ▲	Title 🔺	Initial Date Submitted ▲	Status Date ▲	Current Status 🔺		
	View Submission View Reference Checking Results Send E-mail	MCE- D-23-00731	Anti-steatotic effects of PPAR- alpha and gamma involve gut-liver axis modulation in high-fat diet-fed mice	Dec 07, 2023	Jan 16, 2024	Required Reviews Completed		
	Page: 1 of 1 (<u>1 total submissions</u>) Results per page 10 V							

ANEXO C – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do mestrado



Applied nutritional investigation

PPAR α/γ synergism activates UCP1-dependent and -independent thermogenesis and improves mitochondrial dynamics in the beige adipocytes of high-fat fed mice



Carolline Santos Miranda^a, Flávia Maria Silva-Veiga^a, Daiana Araujo Santana-Oliveira^a, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro^a, Julio Beltrame Daleprane^b, Vanessa Souza-Mello^{a,*}

* Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil b 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 24 July 2023 Received in revised form 11 September 2023 Accepted 29 September 2023

Keywords: UCP1 Thermogenesis Browning PPAR Obesity Mitochondria

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activation (single PPARa or PPARa, and dual PPARa/y) on UCP1-dependent and -independent thermogenic pathways and mitochondrial metabolism in the subcutaneous white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. Methods: Male C57BL/6 mice received either a control diet (10% lipids) or a high-fat diet (HF; 50% lipids) for 12 wk. The HF group was divided to receive the treatments for 4 wk: HFy (pioglitazone, 10 mg/kg), HFa (WY-14643, 3.5 mg/kg), and HFα/γ (tesaglitazar, 4 mg/kg). Results: The HF group was overweight, insulin resistant, and had subcutaneous white adipocyte dysfunction. Treatment with PPARa and PPARa/y reduced body mass, mitigated insulin resistance, and induced browning with increased UCP1-dependent and -independent thermogenesis activation and improved mitochondrial metabolism to support the beige adipocyte phenotype. Conclusion: PPARa and dual PPARa/y activation recruited UCP1+ beige adipocytes and favored UCP1-independent thermogenesis, yielding body mass and insulin sensitivity normalization. Preserved mitochondrial metabolism emerges as a potential target for obesity treatment using PPAR agonists, with possible clinical applications

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Beige adipocytes show an intermediate UCP1 expression between the white and the brown adipocytes [1]. UCP1 is pivotal for nonshivering thermogenesis in the brown adipose tissue. However, UCP1-independent pathways may have a role in the nonshivering thermogenesis and metabolic homeostasis linked to the presence of browning [2]. The creatine futile cycle enhances mitochondrial respiration when ADP is limiting in beige adipocytes [3]. The sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ -ATPase (SERCA-2b) calcium cycling is selective to beige adipocytes and an adenosine triphos-

Mitochondria are at the center of glucose and lipid metabolism and act as a signaling site to orchestrate integrated physiologic responses to maintain cellular homeostasis. Beige adipocytes exhibit a higher mitochondrial content than white adipocytes [5]. High-saturated fat diet-induced obesity causes white adipose tissue (WAT) dysfunction, with decreased browning and a 21% increase in the saturated fatty acids content (mainly palmitic acid, 16:0) [6]. Hence, WAT shows altered mitochondrial dynamics and function, with defective mitophagy and unbalanced mitochondrial fission and fusion [7]

Mitochondrial fission is crucial for UCP1-dependent thermo-

ANEXO D – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do mestrado



Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: Focus on the adipose tissue, liver, and pancreas

Henrique Souza-Tavares, Carolline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Cristian Sandoval, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Flavia Maria Silva-Veiga, Aline Fernandes-da-Silva, Vanessa Souza-Mello

Specialty type: Biochemistry and molecular biology

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 Grade C (Good): C Grade D (Fair): 0 Grade E (Poor): 0

P-Reviewer: Morozov S, Russia; Wu QN, China

Received: April 21, 2023 Peer-review started: April 21, 2023 First decision: May 15, 2023 Revised: May 26, 2023 Accepted: June 13, 2023 Article in press: June 13, 2023 Published online: July 14, 2023



Henrique Souza-Tavares, Carolline Santos Miranda, Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Daiana Araujo Santana-Oliveira, Flavia Maria Silva-Veiga, Aline Fernandes-da-Silva, Vanessa Souza-Mello, Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

Cristian Sandoval, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Salud, Universidad Santo Tomás, Osorno 5310431, Chile

Cristian Sandoval, Departamento de Ciencias Preclínicas, Universidad de la Frontera, Temuco 4780000, Chile

Corresponding author: Vanessa Souza-Mello, PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Blvd. 28 de setembro 87, fundos, Rio de Janeiro 20551030, Brazil. souzamello.uerj@gmail.com

Abstract

The world is experiencing reflections of the intersection of two pandemics: Obesity and coronavirus disease 2019. The prevalence of obesity has tripled since 1975 worldwide, representing substantial public health costs due to its comorbidities. The adipose tissue is the initial site of obesity impairments. During excessive energy intake, it undergoes hyperplasia and hypertrophy until overt inflammation and insulin resistance turn adipocytes into dysfunctional cells that send lipotoxic signals to other organs. The pancreas is one of the organs most affected by obesity. Once lipotoxicity becomes chronic, there is an increase in insulin secretion by pancreatic beta cells, a surrogate for type 2 diabetes mellitus (T2DM). These alterations threaten the survival of the pancreatic islets, which tend to become dysfunctional, reaching exhaustion in the long term. As for the liver, lipotoxicity favors lipogenesis and impairs beta-oxidation, resulting in hepatic steatosis. This silent disease affects around 30% of the worldwide population and can evolve into end-stage liver disease. Although therapy for hepatic steatosis remains to be defined, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) activation copes with T2DM management. Peroxisome PPARs are transcription factors found at the intersection of several metabolic pathways, leading to insulin resistance relief, improved thermogenesis, and expressive

ANEXO E – Artigo científico aceito em colaboração durante o período do mestrado



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, Carolline 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: Dziegielewska-Gesiak 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, Carolline 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.uerj@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 highfat 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