



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

Flávia Maria da Silva Veiga

**Efeitos da ativação do ppar- β/δ sobre a lipogênese, beta-oxidação e
estresse do retículo endoplasmático hepático num modelo
experimental de obesidade**

Rio de Janeiro
2018

Flávia Maria da Silva Veiga

Efeitos da ativação do ppar- β/δ sobre a lipogênese, beta-oxidação e estresse do retículo endoplasmático hepático num modelo experimental de obesidade



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 Souza-Mello

Rio de Janeiro

2018

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

V426 Veiga, Flávia Maria da Silva.

Efeitos da ativação do PPAR- β/δ sobre a lipogênese, beta-oxidação e estresse do retículo endoplasmático num modelo experimental de obesidade / Flávia Maria da Silva Veiga. – 2018.
78 f.

Orientadora: 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. Obesidade - Teses. 2. Lipogênese. 3. Hepatopatia Gordurosa não Alcoólica. 4. Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo. I. Mello, Vanessa de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.391

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

Flávia Maria da Silva Veiga

Efeitos da ativação do ppar- β/δ sobre a lipogênese, beta-oxidação e estresse do retículo endoplasmático hepático num modelo experimental de obesidade

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 26 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Prof^a Dra Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a Dra Thereza Cristina Lonzetti Bargut

Universidade Federal Fluminense

Prof^a Dra Simone Nunes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo amor e carinho em todos os momentos da minha vida. Ao meu noivo, pelo apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

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

À minha mãe, Jacinéa, por estar comigo a cada dificuldade. Acompanhar-me pelos caminhos trilhados sempre com muito amor, paciência e zelo. Obrigada por cuidar de mim, sem você eu nada seria.

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

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa de Souza-Mello, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me acolher, mostrar caminhos, e me orientar na realização de um trabalho científico. Sempre disposta a me ajudar e colaborar, com muito carinho. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda pela oportunidade e confiança por abrir as portas do laboratório a mim.

Obrigada à Tamiris Rachid, por me auxiliar inúmeras vezes com carinho e atenção, pelas dúvidas tiradas e pelo conhecimento compartilhado.

Muito obrigada à Francielle Graus, por me ajudar no desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada pelos aprendizados, apoio e muita paciência! Por todo conhecimento e experiência que compartilhou comigo e pelo carinho. Que você tenha muito sucesso nessa nova fase da sua vida!!!

As técnicas Aline Penna e Michele Soares, pelos ensinamentos, assistência e ajuda durante o trabalho.

Obrigada a Pós-Doutoranda Fabiane Martins, por contribuir com os seus conhecimentos e atenção. A todos os companheiros do laboratório: Thatiany Marinho, Luana, Priscila, Tamiris Petito, Felipe Oliveira, Byanca, Celina..... por fazerem parte dessa árdua jornada.

A todos os professores do programa de pós-graduação BHEX pelas disciplinas ministradas e pelos ensinamentos repassados durante o mestrado.

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

A todos, familiares, amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram e/ou me motivaram para o meu desenvolvimento pessoal e científico.

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

Chico Xavier

RESUMO

VEIGA, Flávia Maria da Silva. *Efeitos da ativação do PPAR- β/δ sobre a lipogênese, beta-oxidação e estresse do retículo Endoplasmático hepático num modelo experimental de obesidade*. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Avaliar os efeitos da ativação do PPAR- β/δ (receptor ativado por proliferador peroxissomal), com a utilização do agonista GW0742, sobre o metabolismo energético hepático (carboidratos e lipídios) e o Estresse do Retículo Endoplasmático (ERE) hepático num modelo experimental de obesidade. Camundongos machos C57BL/6 (3 meses de idade) receberam uma dieta controle (C, 10% de lipídios, n = 20) ou uma dieta rica em gordura (HF, 50% de lipídios, n = 20) durante 10 semanas. Estes grupos foram subdivididos para receber o tratamento (n = 5 por grupo): C, C-B (agonista PPAR- β/δ , 1,0 mg / kg / dia incorporado à dieta controle), HF e HF-B (agonista de PPAR- β/δ , 1,0 mg / kg / dia incorporado à dieta HF) durante 4 semanas. Foram realizadas análises bioquímicas, western blotting, RT-qPCR, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O grupo HF apresentou maior massa corporal (MC) e insulinemia que o grupo C, além de aumento da expressão hepática das proteínas pró-inflamatórias (NF- κ B, TNF- α e IL-6). Em contraste, houve redução da expressão dos genes relacionados à beta-oxidação (PPAR- α e CPT-1a) paralelo ao aumento da expressão dos genes lipogênicos (FAS, SREBP-1c e PPAR- γ). Em adição, o grupo HF apresentou ERE, com modificações ultraestruturais e moleculares, levando a estímulos pró-apoptóticos. O tratamento com agonista PPAR- β/δ reverteu o sobrepeso e a resistência à insulina, reduziu a inflamação e a lipogênese hepática e favoreceu a beta-oxidação. Esses resultados estão de acordo com a melhora da ultraestrutura do RE (retículo endoplasmático), redução do ERE e da apoptose após o tratamento. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a ativação do PPAR- β/δ aliviou o ERE a partir da melhora da resistência à insulina e da maximização do metabolismo energético hepático com o favorecimento da beta-oxidação. A ativação do PPAR- β/δ pode ser uma ferramenta importante para evitar a progressão da DHGNA (doença hepática gordurosa não alcoólica) e de outras comorbidades da obesidade.

Palavras-chave: PPAR- β/δ . Obesidade. Lipogênese. Beta-oxidação. DHGNA; Estresse do retículo endoplasmático.

ABSTRACT

VEIGA, Flávia Maria da Silva. *Effects of PPAR- β / δ activation on lipogenesis, beta-oxidation and stress of the hepatic endoplasmic reticulum in an experimental model of obesity*. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The present study aimed to investigate the effects of the treatment with the PPAR- β/δ (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor) agonist GW0742 on hepatic energy metabolism and endoplasmic reticulum (ER) stress in diet-induced obese mice. Male C57BL/6 mice (3 months old) received a control diet (C, 10% of lipids, n = 20) or a high-fat diet (HF, 50% of lipids, n = 20) during 10 weeks. These groups were subdivided to receive the treatment (n = 5 per group): C, C-B (PPAR- β/δ agonist, 1.0 mg/kg/day mixed with the control diet), HF and HF-B group (PPAR- β/δ agonist, 1.0 mg/kg/day mixed with the HF diet). The treatment lasted 4 weeks. Were performed biochemical analyzes, western blotting, RT-qPCR, immunofluorescence and transmission electron microscopy (MET). The HF group showed greater body mass (BM) and insulinemia than C, besides an increased hepatic expression of proinflammatory proteins (NF- κ B, TNF- α , and IL-6). Conversely, the HF diet reduced the hepatic expression of beta-oxidation related genes (CPT-1a and PPAR- α), while it enhanced the expression of the lipogenic genes (PPAR- γ , FAS, and SREBP-1c). Obese animals showed ER stress, with ultrastructural and molecular alterations, leading to proapoptotic stimulus. The PPAR- β/δ activation by GW0742 rescued the overweight and the insulin resistance, tackled the hepatic inflammation and reduced the lipogenesis concomitant to a favored beta-oxidation. These results complied with the ameliorated ER ultrastructure, reduced ER stress and apoptosis after the treatment. **Conclusions:** Our results indicate that the PPAR- β/δ activation alleviated the ER stress by improving the insulin sensitivity and maximizing the hepatic energy metabolism with a shift towards beta-oxidation. PPAR- β/δ activation could be an essential tool to avoid the NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) progression and other obesity constraints.

Keywords: PPAR- β/δ . Obesity. Lipogenesis. Beta-oxidation. NAFLD. ER stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Obesidade e suas comorbidades associadas.....	19
Figura 2 -	Estágios evolutivos da DHGNA.....	22
Figura 3 -	Esquema representativo da ativação do ERE.....	28
Figura 4 -	Mecanismo de ação dos PPARs.....	29
Figura 5 -	Desenho experimental.....	34
Figura 6 -	Massa corporal dos animais nos períodos pré e pós tratamento.....	43
Figura 7 -	Curva glicêmica do teste oral de tolerância à glicose após o tratamento.....	44
Figura 8 -	Fotomicrografias representativas da estrutura hepática ao final do experimento.....	45
Figura 9 -	Níveis e RNAm do PPAR α e seu transcrito CPT-1 ^a	48
Figura 10 -	Níveis e RNAm do PPAR γ e seu transcrito SREBP-1c.....	49
Figura 11 -	Níveis e RNAm do PPAR β/δ e seu transcrito CD36.....	50
Figura 12 -	Níveis e RNAm dos genes pró-inflamatórios IL-6 e TNF α	51
Figura 13 -	Níveis de RNAm do gene do estresse do retículo endoplasmático.....	52
Figura 14 -	Níveis de RNAm do gene marcador de morte celular.....	53
Figura 15 -	Expressão proteica relacionada à inflamação e ao estresse do RE ao final do tratamento.....	55
Figura 16 -	Ultraestrutura dos hepatócitos ao final do experimento.....	57
Figura 17 -	Imunofluorescência para o método TUNEL (apoptose) no tecido hepático.....	58
Figura 18 -	Resumo gráfico das vias envolvidas com os principais efeitos da dieta HF na biologia molecular e ultraestrutura do fígado...	66
Figura 19 -	Resumo gráfico das vias envolvidas com os principais efeitos do tratamento com GW0742 em animais obesos na biologia molecular e ultraestrutura do fígado.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados no RT-qPCR.....	39
Tabela 2 - Ingestão alimentar, massa corporal, metabolismo de carboidratos, massa hepática e dosagens bioquímicas.....	47
Tabela 3 - Resumo dos resultados do ANOVA de duas vias.....	60

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
AGL	Ácido Graxo livre
AKT	Proteína quinase B
ALT/TGP	Alanina amino transferase
AST/TGO	Aspartato amino transferase
C	<i>standard chow</i> (dieta controle)
CHOP	<i>C/EBP-Homologous Protein</i>
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
DHGNA	Doença Hepática gordurosa não-alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2
eIF2a	Fator de iniciação eucariótico 2
ERAD	Degradação associada ao retículo endoplasmático
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular fosforilada
ERE	Estresse do Retículo Endoplasmático
FAS	Sintase de ácido graxo
FAT/CD36	Translocase de ácidos graxos
GLUT2	Transportador de Glicose 2
HF	<i>high fat</i> (dieta hiperlipídica)
IL-6	Interleucina 6
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
PERK	Quinase reticular endoplasmática semelhante à proteína quinase
PPAR	Receptor ativado por proliferação de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
RI	Resistência à Insulina
RNA _m	RNA mensageiro
RXR	Receptor do ácido retinóico
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
TAB	Tecido adiposo branco
TG	Triglicerídeo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TOTG

Teste oral de tolerância à glicose

UPR

Unfolded Protein Response

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Obesidade	17
1.2	Resistência à Insulina	19
1.3	Metabolismo hepático	21
1.4	Retículo Endoplasmático (RE) e o Estresse do Retículo Endoplasmático (ERE)	25
1.5	PPARs	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Animais e Dieta	33
3.2	Ingestão Alimentar e Massa Corporal (MC)	34
3.3	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	35
3.4	Eutanásia	35
3.5	Microscopia de luz	36
3.6	Análises Bioquímicas e QUICK	36
3.7	Western Blotting	37
3.8	PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	38
3.9	Imunofluorescência	40
3.10	Microscopia eletrônica de transmissão	40
3.11	Análise de dados	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Ingestão Alimentar, Energética e Massa corporal (MC)	42
4.2	Metabolismo de carboidratos	43
4.3	Histologia do fígado, massa hepática e dosagens bioquímicas	45
4.4	RT-qPCR	48
4.5	Western Blotting	53
4.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão Imunofluorescência	56

4.7	ANOVA de duas vias	58
5	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A - Comitê de ética	76
	ANEXO B - Artigo aceito	77
	ANEXO C - Artigo submetido	78

INTRODUÇÃO

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial e acomete diferentes grupos etários, além de ser a maior causa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Aasheim and Sovik (1). A patogênese da obesidade está relacionada ao excesso do consumo de energia, juntamente com o gasto energético reduzido. O conseqüente balanço energético positivo aumenta o reservatório de tecido adiposo branco (TAB), que modifica a liberação de adipocinas para um perfil pró-inflamatório (2, 3).

Além de provocar uma inflamação de baixo grau, a obesidade está associada ao desenvolvimento da resistência à insulina (RI), favorecendo a gênese do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (4). Inflamação e RI freqüentemente afetam o fígado, um órgão que é crucial para a regulação do metabolismo energético (5). A RI induz altas taxas de lipólise no TAB, reduzindo a capacidade de adipócitos para armazenar lipídios e aumentando a liberação de ácidos graxos livres (AGL) que são direcionados ao fígado (6, 7).

Além disso, a RI prejudica a beta-oxidação mitocondrial hepática e reduz a exportação hepática de lipoproteínas. Sempre que a síntese e/ou captação hepática de AGs excede a capacidade oxidativa e/ou de exportar lipoproteínas hepáticas, gotículas de gordura são depositadas no parênquima hepático, configurando a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (8). A DHGNA vem sendo apontada como a manifestação hepática da síndrome metabólica, mostrando prevalência crescente entre indivíduos de idades e estratos econômicos diversos (9).

A patogênese da DHGNA e o estresse do retículo endoplasmático (ERE) estão estreitamente entrelaçados com a RI, excesso de peso e inflamação, mostrando uma crescente prevalência em todo o mundo (9). O ERE é caracterizado pela formação de proteínas mal dobradas e desdobradas, produzindo um desequilíbrio entre a demanda celular de dobramento e maturação de proteínas, o que facilita o acúmulo de proteínas desdobradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) (10). As principais vias ativadas pelo ERE produzem um efeito pró-inflamatório através da ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB), ligado à resistência à insulina hepática, aumentando a transcrição de seus genes alvo: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (11).

O metabolismo hepático de ácidos graxos (AGs) parece ser fortemente influenciado pelos fatores de transcrição dos genes alvo do receptor ativador de proliferação de peroxissoma (PPAR), que regulam a expressão de genes ligados à sinalização de insulina, absorção e transporte de AG nos hepatócitos (12, 13). Concomitantemente, o RE é altamente suscetível à nutrição e ao excesso de nutrientes celulares (14). Neste contexto, a ativação das isoformas de PPARs surge como uma ferramenta relevante para atenuar o ERE hepático, modulando o metabolismo energético e várias rotas metabólicas geralmente alteradas na obesidade. Porém, esses efeitos ainda precisam ser esclarecidos (15).

O presente estudo foi idealizado para investigar os efeitos do tratamento com o agonista PPAR- β/δ GW0742 sobre o metabolismo energético hepático e o ERE em um modelo de obesidade induzido por dieta em camundongos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica, cuja prevalência vem aumentando drasticamente, e configura como a maior causa de morbidade e mortalidade em todos os grupos e idades em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (1). O sobrepeso e a obesidade são decorrentes de diversos fatores, dentre os quais se destacam fatores endógenos como a hereditariedade, e/ou fatores exógenos, caracterizados por fatores ambientais, sedentarismo e os hábitos alimentares inadequados (16). As condições nutricionais e a atividade física influenciam fortemente a equação do balanço energético e são os principais fatores modificáveis (17).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o ganho de peso ocorre quando a ingestão energética é maior do que o gasto de energia durante um longo período de tempo, causando um balanço energético positivo (18). De fato, as dietas ricas em gorduras saturadas, densas em energia, e o estilo de vida sedentário são duas características fortemente associadas ao aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo (19).

No Brasil, a prevalência de obesidade na população adulta aumentou de forma alarmante. De acordo com Ministério da Saúde, na última década ocorreu aumento de 61,8% de casos de diabetes e 14,2% nos casos de hipertensão. Além disso, mais da metade da população está com sobrepeso e 18,9% dos brasileiros são obesos. No entanto, o Ministério da Saúde se comprometeu a desenvolver estratégias para reduzir a taxa de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis em 2% ao ano até 2022 no Brasil (20).

Estudos mostram que a presença da obesidade promove uma desregulação na homeostase corporal e desencadeia hipertrofia dos adipócitos brancos (21, 22). O TAB exerce um papel fundamental no armazenamento de lipídios para o fornecimento de energia. Porém, atualmente, este tecido não é considerado somente um armazenador de energia, mas também um órgão endócrino com função

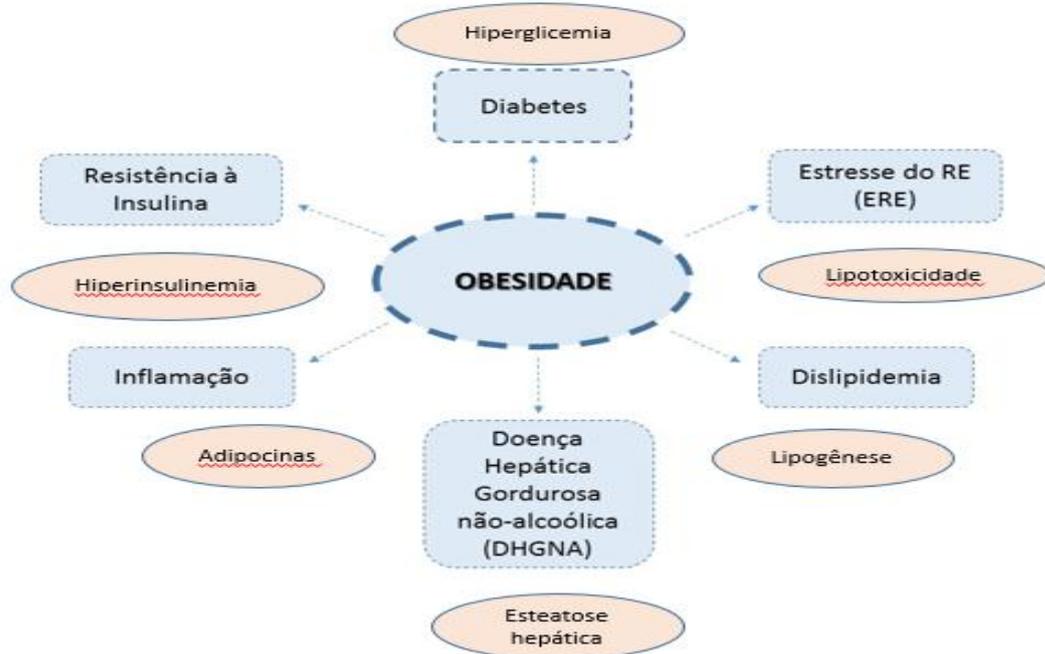
de sintetizar e liberar adipocinas, com ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, as quais podem influenciar profundamente os processos metabólicos (23).

No entanto, o aumento da expressão de citocinas, como o TNF- α e a IL-6, levam ao desenvolvimento de um estado inflamatório de baixo grau, induzindo de forma marcante o risco de comorbidades a ela associadas, tais como: RI, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, doença cardiovascular, DM2, e DHGNA (24). Essas desordens, quando associadas em um indivíduo, configuram síndrome metabólica (Figura 1) (25).

Por conseguinte, ocorre aumento dos níveis circulantes de AGs, aumentando a lipogênese, e maiores taxas de lipólise no TAB. Este excedente acarreta no acúmulo de gordura ectópica. Esse quadro amplifica diversos efeitos deletérios, como dislipidemias, esteatose hepática, falha na sinalização da insulina, ativação da gliconeogênese e hiperglicemia (26). Portanto, este quadro está inversamente relacionado com a sensibilidade à insulina, contribuindo para o declínio da função das células beta, um preditor da DM2 (25, 27).

Diante dos efeitos negativos da obesidade, provocados pelo excesso de lipídios na dieta, pesquisadores vêm tentando entender os mecanismos relacionados e como o tratamento pode influenciar nessa disfunção metabólica. A Figura 1 resume as principais comorbidades atreladas à obesidade.

Figura 1 – Obesidade e suas comorbidades associadas



Legenda: O desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto de energia, gera um balanço energético positivo, com acúmulo de gordura e obesidade. Essa desencadeia uma série de disfunções em diversos tecidos.

Fonte: A autora, 2018.

1.2 Resistência à Insulina

Como já descrito anteriormente, o consumo elevado de uma dieta rica em lipídios leva ao desenvolvimento da obesidade (19). A obesidade vem sendo apontada como um fator que contribui para induzir alterações intracelulares que promovem uma desregulação do metabolismo da glicose, desencadeando o quadro de RI. Este quadro pode prever o desenvolvimento do DM2 ao longo do tempo (28).

A insulina, um hormônio polipeptídico secretado pelas células betas das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose sanguínea pós-prandial, tem ação no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (29). Entre outras funções metabólicas da insulina, podemos destacar a captação de glicose pelo fígado para manter sua homeostase, aumentar a síntese de AGs, reduzir a produção hepática de glicose (gliconeogênese e glicogenólise) e a lipólise (30).

É o principal hormônio que estimula a expressão de genes lipogênicos no fígado e reduz a lipólise nos adipócitos. Estimula a lipogênese por aumentar a expressão do transportador de glicose (GLUT) e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade do piruvato para a síntese dos AGs (31).

A RI é uma disfunção metabólica que resulta em prejuízos na translocação de vesículas, que contém GLUT para a membrana, diminuindo a capacidade dos tecidos de captar glicose para as células levando a um estado hiperglicêmico (29, 31).

A captação de glicose no fígado é composta por várias etapas intracelulares, onde a insulina se liga ao seu receptor específico de membrana, uma proteína com atividade quinase. Após a ligação extracelular da insulina com o seu receptor ocorre fosforilação intracelular da subunidade beta do receptor em substratos de tirosina denominados IRS-1 e IRS-2 (32). A fosforilação de seus substratos desencadeia uma cascata intracelular que culmina na translocação de transportadores de glicose, denominados GLUT, que são direcionados em direção a membrana plasmática para a captação de glicose (33, 34).

Os GLUTs são membros de uma família de proteínas integrais de membrana transportadoras de glicose. Diferentes tecidos expressam diferentes subtipos de GLUT. O fígado e o pâncreas expressam GLUT2 (35). O GLUT2 promove a rápida saída e entrada de glicose no fígado e nas células beta do pâncreas. Portanto, esses transportadores de glicose exercem importante função no controle das alterações na secreção de insulina estimulada pela glicose (32).

Os mecanismos para o desenvolvimento da RI, relacionados à obesidade, são caracterizados por alterações em certas etapas na sinalização da insulina, apresentando redução nas proteínas IRS-1 e Akt2, que influenciam diretamente a captação e translocação de glicose (GLUT2) por dependência de insulina (36).

O excesso de AGL no plasma, induzido por dieta hiperlipídica, afeta o metabolismo celular, favorecendo o desenvolvimento da RI (37). Os AGL aumentam a expressão e induzem a ativação de TLR-4 (receptor de proteína de membrana-toll like 4), desencadeando a ativação de vias inflamatórias que vão influenciar na captação de glicose pela sinalização de insulina (38).

Ao se ligarem no receptor TLR-4, ativam iKK (quinase inibidora do fator nuclear kB). A ativação de iKK pode prejudicar a sinalização de insulina de duas formas: 1) Fosforilar IRS-1 em resíduos de serina, atenuando a atividade de

tirosinas; 2) Ativação de iKK leva a fosforilação de I κ B, que é um fator de transcrição kB (NF-kB) (31, 38).

Com a degradação de iKK, ocorre aumento da expressão de NF-kB que vai agir no núcleo celular se ligando ao DNA e portanto, induz a transcrição gênica de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-6, culminando no desenvolvimento de RI (31, 39).

O mecanismo pelo qual o TNF- α induz o desenvolvimento de RI está na ligação do TNF- α aos seus receptores de membrana plasmática TNFR1 e TNFR2 sendo capaz também de ativar as proteínas inflamatórias iKK e JNK (quinase c-JUN n-terminal) e assim dando início na resposta inflamatória causada por estas moléculas (31, 39, 40).

1.3 Metabolismo hepático

O fígado é um órgão que apresenta um papel central na regulação da homeostase do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas de acordo com o estado nutricional do organismo (41).

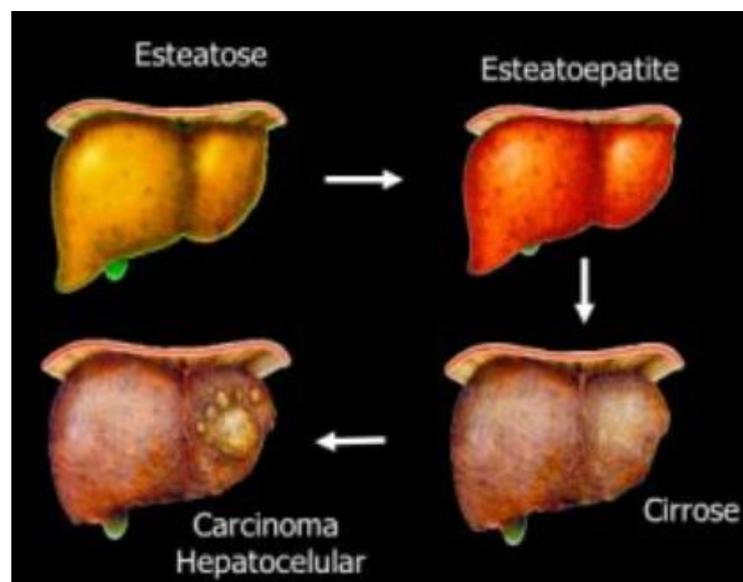
Em condições normais, no fígado, a glicose é convertida em AGs que são utilizados para a síntese de triacilgliceróis (TAG), que é a principal fonte de estoque energético (42). Os hepatócitos oxidam os AGs nos peroxissomas, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, para sintetizar glicose (41).

Quando os níveis de glicose ou lipídios hepáticos excedem as necessidades energéticas, sua capacidade oxidativa e/ou de exportar lipoproteínas hepáticas é excedida, então, lipídios na forma de AGL são depositadas no parênquima hepático (43).

A DHGNA é um termo utilizado para designar a presença de esteatose hepática na ausência de um histórico significativo do uso de álcool ou outra doença hepática conhecida (44). É atualmente considerada como a manifestação hepática da síndrome metabólica e fator de risco para o desenvolvimento de doenças hepáticas mais nocivas. A esteatose hepática é assintomática e pode ser detectada inicialmente por meio de alterações nas enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT) (45).

Em alguns casos, esteatose hepática, quando não tratada, pode progredir para cirrose hepática ou hepatocarcinoma (Figura 2) (15). Porém, os mecanismos moleculares que causam a sua progressão para danos graves no fígado não são totalmente compreendidos. Um mecanismo sugerido envolve a disfunção mitocondrial exacerbada e aumento do dano oxidativo hepatocelular. Isso pode abranger o caminho para a inflamação e insuficiência hepática (46, 47).

Figura 2 - Estágios evolutivos da DHGNA



Fonte: SBH (<http://sbhepatologia.org.br/publicacoes/imprensa/releases/>), acesso em 15/01/2018.

A progressão da DHGNA simples pode levar a um quadro de esteatohepatite (EHNA), que envolve lesão hepatocelular e inflamação do fígado (48). A EHNA é caracterizada por um estado inflamatório devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), lipotoxicidade e aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (49). Estudos sugerem que a disfunção mitocondrial na EHNA pode ativar o ERE com a ativação da UPR, as quais culminam na indução da morte e inflamação dos hepatócitos pela via de sinalização dependente da proteína homóloga à proteína ligante estimuladora de CCAAT (CHOP) (50).

O aumento do acúmulo de colesterol mitocondrial também está relacionado com a progressão da esteatose para a EHNA. O colesterol elevado também demonstrou sensibilizar hepatócitos de camundongos para a apoptose induzida por TNF α e causar depleção mitocondrial (46, 47).

Os AGL surgem no fígado a partir de três fontes distintas: lipólise (a hidrólise de TAG em glicerol e AGL) no interior do tecido adiposo, fontes alimentares e da lipogênese *de novo*. A lipogênese *de novo* se caracteriza como uma via de conversão de fontes glicídicas para a síntese de AGs (51). Além da ingestão aumentada de lipídios, a lipogênese *de novo* também provoca um estado de lipotoxicidade, predispõe à RI e ao desenvolvimento de alterações hepáticas (12, 21). A lipogênese *de novo* é um processo modulado por fatores de transcrição ativado pela insulina, que é provavelmente o principal fator hormonal que aumenta e regula a expressão da proteína de ligação ao elemento de regulação dos esteróis 1c (SREBP-1c) (52).

SREBP-1c é um membro da família SREBP que controla a regulação transcricional de genes lipogênicos (53). A sua ativação leva à conversão do piruvato em AGL no fígado e a um aumento de genes que ativam a síntese e captação de colesterol, AGs, TAG e fosfolipídios (41). Já foi identificado o aumento da expressão de SREBP-1c em camundongos obesos em estudos prévios (54-56).

No fígado, a metabolização de AGs parece ser fortemente influenciada por genes alvos do PPAR- β/δ , que influenciam principais transportadores de membrana plasmática de AGL, incluindo a translocase de AGs (FAT/CD36) (57, 58). Essa proteína é transmembranar e desempenha um papel importante na absorção e translocação de AGs via difusão facilitada. O FAT/CD36 é expresso numa grande variedade de células incluindo macrófagos, miócitos, adipócitos, enterócitos e hepatócitos. A expressão hepática de CD36 foi correlacionada positivamente com os teores de TAG hepático em pacientes com DHGNA, ressaltando a importância deste transportador (59).

A beta-oxidação de AGs ocorre nas mitocôndrias para reduzir os AGs em acetil-CoA, sendo fortemente afetado pela RI. Em condições basais, para iniciar este processo a molécula de acil-CoA de cadeia longa (LC-CoA) é transportada para a membrana mitocondrial interna (MMI) via carnitina palmitoil transferase-1a (CPT-1a), onde é beta oxidada (41, 60).

Porém, na presença de concentrações elevadas de glicose e AGL, a CPT-1a é inibida pelo aumento de Malonil-CoA, intermediário na síntese de AGs. Por conseguinte, ocorre aumento da sintase de ácidos graxos (FAS), enzima limitante na biossíntese de AGs e catalisadora do último passo desta via. Quando este processo

é inibido, ocorre aumento na concentração de LC-CoA no citoplasma o que reduz a expressão de genes que podem retardar a beta-oxidação hepática (61, 62).

A mitocôndria se comunica dinamicamente com outras organelas celulares, como o RE. Logo, a exposição prolongada à AGL geram perturbações na mitocôndria, desencadeando estresse oxidativo e desordem na homeostase do RE (63). Nesse contexto, o estresse do retículo endoplasmático (ERE) estabelece uma ligação entre RI e inflamação, condições importantes para o estabelecimento e progressão da DHGNA (64).

As principais vias ativadas no ERE produzem efeito pró-inflamatório pela ativação da via do NF-KB, ligada à resistência hepática à insulina pelo aumento dos seus genes TNF- α e IL-6 (65). Tanto as enzimas envolvidas na oxidação hepática dos lipídios quanto a via NF-KB são reguladas por alguns fatores de transcrição, a partir de mecanismos de transativação ou transrepressão gênica. Dentre esses fatores de transcrição destacam-se os PPARs (66).

A RI induz altas taxas de lipólise concomitante à reduzida capacidade de oxidação de AGs pelos hepatócitos (26, 67).

Atualmente, ainda não existem marcadores bioquímicos com sensibilidade e especificidade suficiente que assegurem o diagnóstico DHGNA. Porém, algumas características moleculares nos permitem identificar alterações que indicam o início de uma possível lesão hepática, como a deposição de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, na forma de vacúolos microvesicular e/ou macrovesicular (26, 67).

Nesse contexto, um estudo recente sugeriu efeitos benéficos da ativação do PPAR- α , o qual contribuiu para melhorar a ultraestrutura hepática pelo aumento da atividade mitocondrial subjacente ao maior número de mitocôndrias por área de tecido hepático. Este fato favorece a beta-oxidação hepática e, conseqüentemente, reduz a deposição de gotículas lipídicas no parênquima hepático (68).

1.4 Retículo Endoplasmático (RE) e o Estresse do Retículo Endoplasmático (ERE)

O RE é uma organela citoplasmática que desempenha múltiplas funções celulares, como a síntese, maturação, dobramento e locomoção de proteínas (64). A

síntese e a concentração de proteínas no RE são extremamente altas, e todas as proteínas secretoras entram na via do RE e devem ser devidamente dobradas com o auxílio de chaperonas moleculares. Somente as proteínas dobradas são transportadas para o Complexo de Golgi (10).

As proteínas desdobradas ou mal formadas são retidas do RE, translocadas ao citoplasma pela maquinaria da degradação associada ao RE (ERAD) e degradadas pelos proteassomas. Desta forma, é de extrema importância que a homeostase do lúmen do RE seja mantida (10, 69).

No entanto, algumas condições fisiológicas tais como: obesidade, RI, DM2 e lipotoxicidade hepática, podem produzir um desequilíbrio entre a demanda celular, o dobramento das proteínas e a capacidade do RE para promover a maturação dessas proteínas (70).

Quando as células sintetizam proteínas secretoras em quantidades que excedem a capacidade do dobramento e da maquinaria do sistema de degradação associado ao RE (ERAD), as proteínas desdobradas são acumuladas no RE. Essa condição é denominada estresse do retículo endoplasmático (ERE) (10, 14).

Estudos mostraram que a RI é um potente indutor para o ERE. A hiperinsulinemia promove ERE, os quais podem desencadear a apoptose (70). A obesidade e uma dieta rica em lipídios podem desencadear uma resposta adaptativa conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR). O objetivo da ativação da UPR é reestabelecer a homeostase do RE em resposta a uma grande quantidade de proteínas imaturas no RE, e se caracteriza por: atenuar a taxa de tradução, aumentar a expressão de chaperonas e ativar o ERAD. Em conjunto, reduzem o risco de erros na montagem das proteínas (11, 69).

As principais proteínas de membrana que regulam o estímulo ao RE e estão envolvidas na indução da UPR são: PERK (*PKR)-like ER kinase*), IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) e ATF6 (*activating transcription fator 6*). No estado basal, estas proteínas são inibidas pela presença de uma chaperona (Figura 3) (69, 71).

PERK é uma proteína quinase que pertence à subfamília eIF2 α quinase (*Eukaryotic Translation Initiation factor 2, alpha subunit*) e está localizada na membrana do RE. A PERK é composta por um domínio citoplasmático e outro quinase. O domínio citoplasmático é acoplado a uma chaperona GRP78 sob condições livres de estresse. O domínio citoplasmático detecta a iniciação do ERE

no lúmen do RE e estimula a desassociação de GRP78 do domínio citoplasmático (Figura 3) (Liu, 2015).

Então, as moléculas de PERK são recrutadas, se dimerizam e induzem, por autofosforilação, a ativação de seu domínio quinase. A proteína alvo da PERK é o fator de iniciação eIF2 α (71).

O processo de inicialização da tradução envolve proteínas conhecidas com eIFs (fatores de iniciação eucarióticos); eIF2 α faz parte de um complexo ternário, que é composto por eIF2, GTP e tRNA carregado com a metionina inicial (MET-tRNA_i^{met}). Este complexo medeia a ligação do tRNA carregado com a metionina à subunidade ribossomal 40S. A ligação do GTP no complexo ternário é um passo limitante na formação desse complexo (11, 71).

Diferentes tipos de estresse reduzem a tradução por desencadear a fosforilação da subunidade α do eIF2 no resíduo serina 51. Isso inibe a troca de GDP por GTP no complexo eIF2 e previne a formação do complexo ternário, que é inativado quando fosforilado. Assim, o resultado da ativação da PERK na UPR é a inibição generalizada da tradução de mRNAs, e consequente redução do aporte de proteínas no RE. PERK, por fosforilação de eIF2 α , atenua a tradução de proteínas, o que permite que essas proteínas sejam corrigidas (11, 72).

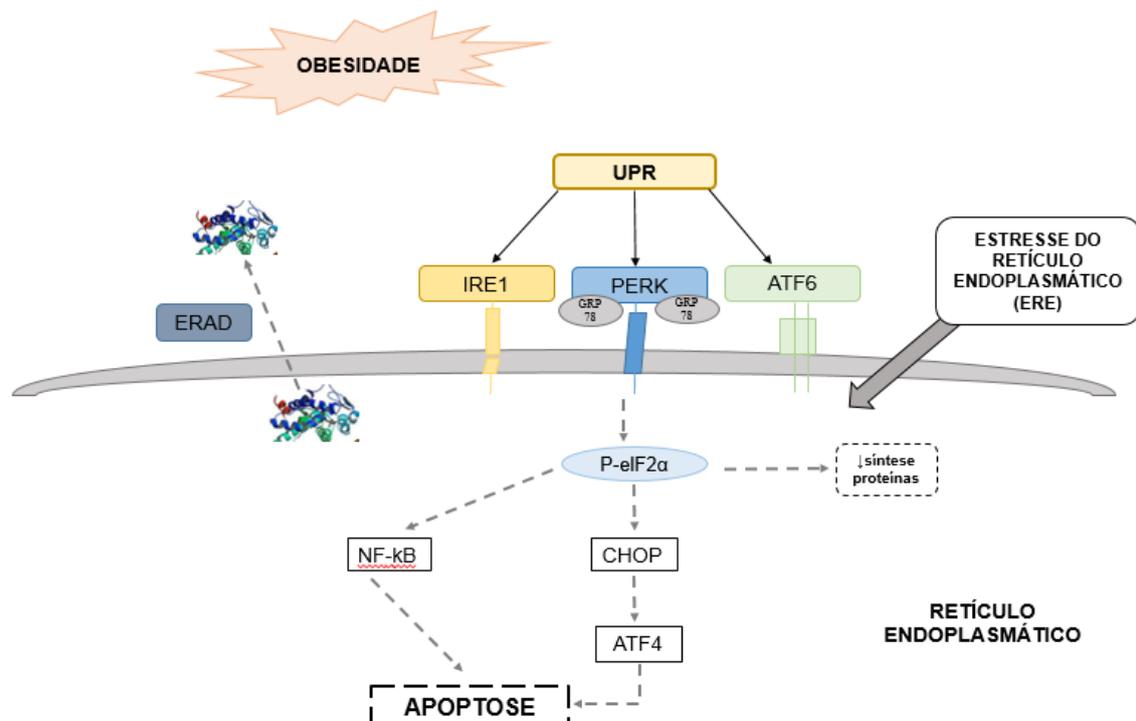
Entretanto, a ativação de PERK pela autofosforilação do seu domínio quinase resulta na promoção da tradução de mRNAs, mais notavelmente, o ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) mRNA, resultando num aumento da produção do fator de transcrição ATF4 que regula a região promotora de vários genes relacionados à UPR (Hummasi S, 2010).

O fator de transcrição ATF4 ativa então chaperonas e o fator de transcrição CHOP (*C/EBP-Homologous Protein*), que participa de várias funções corretivas durante o ERE. CHOP é um fator de transcrição, cuja expressão é induzida pelas vias ATF6 e PERK após ERE. CHOP é um indutor chave da apoptose por reter o ciclo celular, o que resultará na morte celular com o objetivo de proteger as células dos efeitos tóxicos desencadeados pela ação das proteínas desdobradas (50, 70, 73).

A PERK também pode aumentar a sinalização de NF- κ B e induzir outros mediadores inflamatórios associados à doença metabólica. Fato este que contribui com a hipótese de que o ERE pode ser um fator contribuinte para a inflamação de baixo grau observada na obesidade (Hummasi S 2010).

Assim, quando a ativação sucessiva das vias PERK, ATF6 e IRE1 não podem suprimir o ERE, ocorre a indução de uma via apoptótica desencadeando vários caminhos para a morte celular, com o objetivo de garantir a sobrevivência do organismo (69, 71).

Figura 3 – Esquema representativo da ativação do ERE



Legenda: Mecanismo de ativação da via do ERE ativado por obesidade podendo culminar em apoptose. Todos os 3 ramos da UPR podem ativar diretamente vias inflamatórias através da ativação da sinalização NF-κB. Abreviações: ATF4 – fator de transcrição ativado 4; ATF6 – fator de transcrição ativado 6; CHOP – proteína homóloga C/EBP; eIF2α – subunidade alfa do fator de iniciação de tradução eucariótica 2); ERAD – maquinaria de degradação associada ao retículo endoplasmático; IRE1 – enzima 1 dependente de inositol; NF-κB – Fator nuclear kappa-beta; UPR – resposta à proteínas desdobradas; PERK – quinase reticular endoplasmática semelhante à proteína quinase.

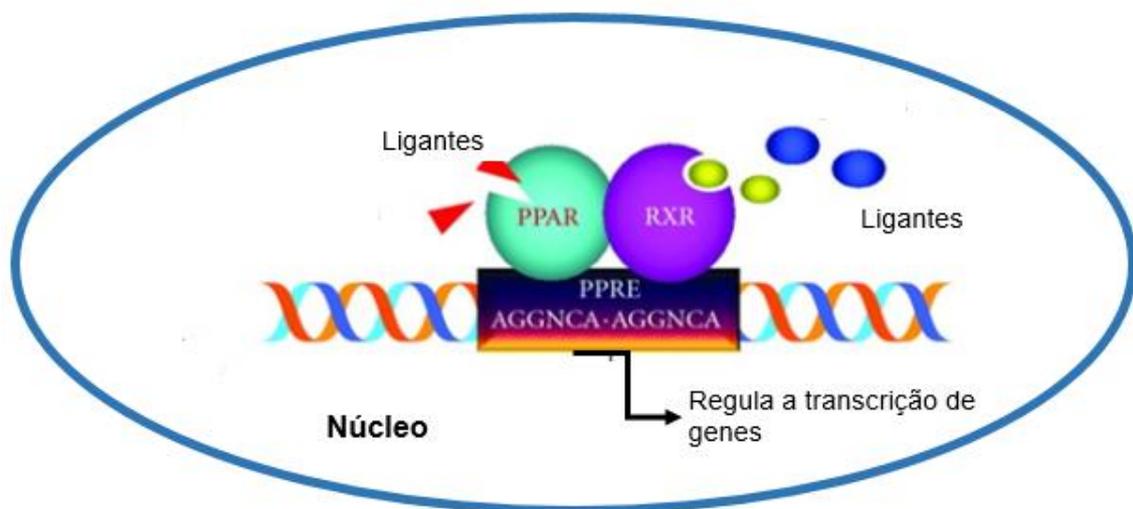
Fonte: A autora, 2018.

1.5 PPARs

Os PPARs pertencem à família de receptores nucleares. Possuem três isoformas já descritas na literatura: PPAR- α (alfa), PPAR- β/δ (beta/delta) e PPAR- γ (gama). Estão envolvidos na regulação da diferenciação celular, desenvolvimento e na regulação da expressão de genes do metabolismo de carboidratos e lipídios (58).

A regulação transcricional realizada pelos PPARs se dá através da heterodimerização dos isotopos com o receptor retinóico X (RXR) e, como tal, podem regular a expressão gênica quer em ligação de PPAR quer em RXR. Os heterodímeros PPAR / RXR se ligam a elementos responsivos de proliferação peroxissomal (PPREs). Os PPREs são formados no DNA alvo por repetições diretas com a seqüência AGGTCA, com espaçamento de um nucleotídeo entre as duas metades (74, 75). A figura 4 ilustra o mecanismo de ação dos PPARs.

Figura 4 – Mecanismo de ação dos PPARs



Legenda: Ligação do PPAR ao RXR e PPRE codificando a transcrição de genes alvo.

Fonte: Adaptado de (76).

As estruturas de domínio dos PPARs são semelhantes aos outros membros da família de receptores nucleares de reguladores de transcrição. Cada PPAR possui um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de ligação ao ligante

(LBD). Tanto o DBD quanto o LBD são altamente conservados entre os três PPARs. O LBD dos PPAR pode acomodar uma variedade de lipídios endógenos que incluem AGs, eicosanóides, derivados do ácido linoleico (ácido graxo essencial), bem como AGs oxidados. Já foi demonstrado que cada um desses tipos de lipídios se liga a PPARs (12, 77, 78).

Os PPARs são considerados sensores de lipídios capazes de promover alterações nos padrões de lipídios e AGs estimulando a síntese ou degradação. A diversidade de funções desempenhadas por esses receptores está relacionada a capacidade de acomodar diferentes tipos de ligantes em seu sítio de ligação. Dessa forma, os três isotipos são capazes de se ligar a um ligante endógeno como os AGs (79, 80). Após a interação do PPARs ao seu ligante, há uma mudança conformacional no complexo que facilita um co-repressor para a troca complexa do co-ativador e a ativação transcricional dos genes alvo (78).

A isoforma PPAR- β/δ é expressa na maioria dos tecidos, embora sua expressão seja relativamente mais baixa no fígado em comparação ao PPAR- α ou PPAR- γ (81). No entanto, sua ativação promove uma regulação positiva na oxidação de AGs mitocondriais, consumo de energia e termogênese. Estudos em camundongos e humanos revelaram que o PPAR- β/δ é um regulador metabólico chave e tem potencial para ser um alvo terapêutico no tratamento da síndrome metabólica (77).

Estudos têm demonstrado resultados satisfatórios com a ativação da isoforma PPAR- β/δ . O GW501516, um agonista PPAR- β/δ , foi capaz de inibir a inflamação no TAB e reverter o quadro de RI induzida por dieta rica em frutose em camundongos. Ainda, esse agonista foi capaz de estimular a β -oxidação hepática e reduzir a lipogênese (82).

Igualmente, o GW0742 mostrou-se eficaz em atenuar as citocinas inflamatórias (TNF α e IL-6), assim revertendo a esteatose hepática e reduzindo os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em camundongos alimentados com dieta HF (83).

Devido ao potencial terapêutico dos agonistas PPARs no tratamento de desordens metabólicas, diferentes classes de ligantes sintéticos para PPAR têm sido desenvolvidas, bem como há uma constante busca por ligantes de origem natural capazes de interagir com esta família de receptores nucleares (84). A primeira classe de fármacos reconhecidos como ligantes de PPAR foram os fibratos. O

mecanismo de ação dos mesmos já é consolidado, e são utilizados para tratamento de dislipidemia através da ativação do PPAR- α (22, 85, 86).

Ao contrário do PPAR- α e PPAR- γ , que vem sendo utilizado no tratamento de dislipidemias e DM2, o agonista PPAR- β/δ não está atualmente em uso clínico (58). No fígado, a metabolização de AGs parece ser fortemente influenciada por genes alvo do PPAR- β/δ , que é um fator de transcrição envolvido também na regulação da expressão de genes ligados à sinalização da insulina e transporte de AGs nos hepatócitos (13, 66). Considerando que mudanças no estilo de vida nem sempre conseguem reverter os danos hepáticos causados pela obesidade, o uso de fármacos adjuvantes é indicado fortemente. Nesse contexto, a ativação dos PPARs emerge como uma proposta pertinente para tratar a DHGNA a partir da modulação de diversas rotas metabólicas alteradas na obesidade (48, 87).

À luz do exposto, hipotetizamos no presente trabalho que a ativação do PPAR- β/δ , por ativar a transcrição de genes ligados à sinalização da glicose e a metabolização de lipídios no hepatócito, alivia a esteatose hepática e a resistência à insulina. Esses achados podem ter relação com o alívio do estresse do retículo endoplasmático dos hepatócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ativação do PPAR- β/δ , com a utilização do agonista GW0742, sobre o metabolismo energético hepático (carboidratos e lipídios) e o ERE hepático num modelo experimental de obesidade.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos do tratamento com agonista PPAR- β/δ sobre a massa corporal dos animais que receberam dieta controle ou hiperlipídica;
- b) Avaliar os efeitos do tratamento com agonista do PPAR- β/δ sobre a tolerância oral à glicose, enzimas hepáticas e insulinemia;
- c) Estudar os efeitos do tratamento com agonista do PPAR- β/δ sobre os níveis de colesterol hepático e a ultraestrutura hepática, com ênfase nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático;
- d) Determinar a expressão gênica de fatores implicados no metabolismo energético dos hepatócitos e no estresse do retículo endoplasmático após o tratamento com PPAR- β/δ após o tratamento;
- e) Determinar a expressão de proteínas implicadas nas mesmas vias descritas anteriormente após o tratamento com PPAR- β/δ após o tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

No presente estudo foram utilizados quarenta (40) camundongos C57BL/6 com 3 meses de idade, machos, mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à água e dieta, em caixas *patogen-free* (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA). Os animais foram mantidos em ambiente submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo de experimentação foi submetido ao Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEUA) do Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ, foi aprovado e registrado com o nº 53/2016.

Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente, em dois grupos: um grupo recebeu dieta padrão para roedores - C (Controle) – 14% da energia das proteínas, 10% de energia de lipídios e 76% da energia de carboidratos (energia total 3800 kcal / kg), e outro grupo recebeu dieta hiperlipídica para indução da obesidade - HF (*High-Fat*) – 14% da energia de proteínas, 50% de energia de lipídios e 36% de energia de carboidratos (energia total 5000 kcal / kg). Ambos os grupos receberam suas respectivas dietas por um período de dez semanas. Após esse período, os grupos C e HF foram subdivididos (n = 10 por grupo) para iniciar o tratamento com agonista PPAR- β/δ (GW0742, dose 1mg/Kg MC, Cayman Chemical, Michigan, EUA) durante 4 semanas, formando os seguintes grupos:

- a) C, animais que receberam dieta padrão ao longo de todo o experimento (n=10);
- b) HF, animais que receberam dieta hiperlipídica ao longo de todo o experimento (n=10);
- c) C-B, animais que receberam o agonista PPAR- β/δ (GW0742) incorporado à dieta controle (n=10);

- d) HF-B, animais que receberam o agonista PPAR- β/δ (GW0742) incorporado à dieta hiperlipídica (n=10).

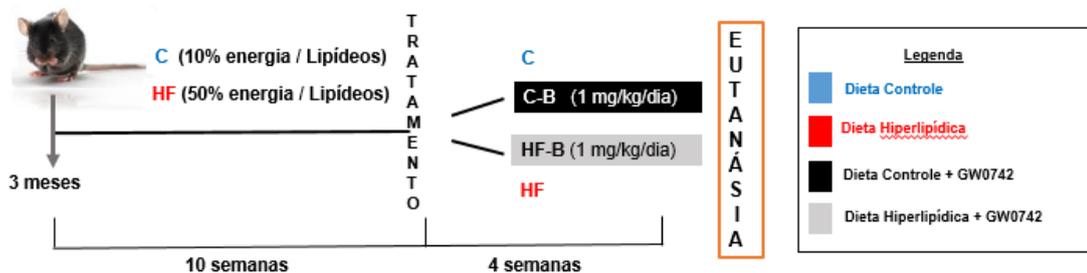
O protocolo experimental foi realizado no período total de 14 semanas e encontra-se ilustrado na Figura 5. As dietas experimentais foram produzidas pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) (88). Cabe mencionar que a referida dose do GW0742 foi previamente descrita como capaz de ativar a isoforma PPAR- β/δ (89).

Figura 5 – Desenho experimental

Metodologia

(CEUA) nº 53/2016

Desenho Experimental



Legenda: Desenho representativo dos grupos experimentais. Abreviações: controle (C); dieta hiperlipídica (grupo High-Fat - HF); controle beta (C-B) HF beta (HF-B).

Fonte: A autora, 2018.

3.2 Ingestão Alimentar e Massa Corporal (MC)

O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente (a quantidade fornecida foi subtraída pela sobra do dia anterior), sendo o resto descartado. A ingestão energética foi calculada, como o produto do consumo alimentar (g) pela energia ofertada por 1 g de cada dieta (kcal). Durante todo o período experimental, a

MC foi medida em balança digital de modelo BL-3200H (precisão 0,01g) semanalmente.

3.3 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Ao final do experimento, uma semana antes da eutanásia, foi realizado o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) nos animais. No dia da aferição, os camundongos foram mantidos em jejum de 6 horas. Após esse período, foi administrada por gavagem orogástrica uma solução glicosada (1g / kg) na dosagem de 1g/kg MC de cada camundongo. O sangue dos animais foi obtido da veia caudal e aferido nos tempos 0 (jejum), 15, 30, 60 e 120 minutos. A glicemia foi mensurada com glicosímetro manual (Glucometer Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

3.4 Eutanásia

Na 14^a semana do experimento, os camundongos foram mantidos em jejum por 6 horas e, após, anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (180 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). O sangue foi coletado por punção cardíaca, e centrifugado (120 g por 15 minutos). As amostras de sangue foram mantidas no freezer -80°C até a realização das análises bioquímicas (glicose, colesterol total e ELISA). O fígado foi cuidadosamente dissecado, pesado e fixado por imersão em formaldeído durante 48 horas para microscopia óptica, depois do processamento foi incorporado em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Fragmentos do fígado (1 mm³) foram fixados em uma solução de glutaraldeído para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e outros fragmentos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e depois armazenados à (-80° C) para a realização de análises moleculares, assim como determinação dos níveis hepáticos de colesterol.

3.5 Microscopia de luz

Fragmentos do fígado foram fixados por imersão em formaldeído e posteriormente desidratados, diafanizados, incluídos em paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cortados com 5 µm de espessura, e corados com hematoxilina e eosina. Diversos cortes foram obtidos de cada fragmento do órgão. As imagens digitais foram obtidas no microscópio de luz (Olympus BX51, Olympus America Inc., Miami, EUA) no formato TIFF, cor de 36 bits, 1280 × 1024 pixels. As imagens obtidas foram representativas dos grupos experimentais.

3.6 Análises Bioquímicas e QUICK

As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), aspartato aminotransferase (AST / TGO), alanina aminotransferase (ALT / TGP) e glicose em jejum foram medidas por espectrofotômetro semiautomático usando um kit de métodos enzimáticos com base nas instruções do fabricante (Biogen System, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil - K083 / K117-2 / K082). Os níveis de colesterol hepático foram medidos em amostras de fígado congeladas. Resumidamente, o tecido foi colocado num processador ultra-sônico com 1 mL de isopropanol e o homogeneizado centrifugado a 2000 g. O sobrenadante (5 µL) foi analisado utilizando o kit comercial disponível para colesterol (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil) (90). A concentração de insulina plasmática foi analisada usando o kit Millipore (kit ELISA de Rat / Mouse Insígnem # EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA) usando o Thermoplate TP-READER para ler os resultados (Bio Tek Instruments, Inc Highland Park, EUA). Os dados de glicose e insulina foram utilizados para calcular QUICKI (índice quantitativo de sensibilidade à insulina), sendo aplicados à seguinte fórmula: $1 / (\log (\text{insulina em jejum } \mu\text{U} / \text{mL}) + \log (\text{glicemia de jejum mg} / \text{dL}))$ (91).

3.7 Western Blotting

As proteínas hepáticas totais foram extraídas em tampão de homogeneização contendo inibidores de protease. Os homogeneizados foram centrifugados e a concentração de proteína foi determinada usando o kit de análise de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As proteínas totais foram ressuspensas em tampão de amostra contendo SDS e aquecidas. Após a desnaturação, as proteínas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada por incubação com leite desnatado. Anticorpos contra as seguintes proteínas foram avaliados nos lisados dos fígados: GLUT2 (anti-coelho, transportador de glicose 2, 07-1402, 1: 500/57 kDa, Merk Millipore, Massachusetts, EUA); NF- κ B (anti-coelho, fator nuclear kappa b, SC109, 1: 500/65 kDa, Santa Cruz Biotechnology); ERK $\frac{1}{2}$ (anti-camundongo, cinase regulada por sinal extracelular $\frac{1}{2}$, SC135900, 1: 500 / 42-44 kDa, Santa Cruz Biotechnology); PERK $\frac{1}{2}$ (anti-rato, cinase regulada por sinal extracelular fosforilada $\frac{1}{2}$, SC81492, 1: 500 / 42-44 kDa, Biotechnology Santa Cruz); eIF2 α (anti-coelho, subunidade alfa do fator 2 de iniciação eucariótica, AHO1182, 1: 200/36 kDa, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA Avenue); p-eIF2a (anti-coelho, fosforilado-eIF2 a (Ser52), 44-728G, 1: 200/36 kDa, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA Avenue). A membrana foi desenvolvida utilizando o reagente de detecção ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) e as imagens foram obtidas utilizando o sistema Molecular Imaging ChemiDoc XRS (Bio-Rad). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada usando o software ImageJ, versão 1.44 (NIH, imagej.nih.gov/ij). O complexo de ligação do anticorpo foi retirado e a membrana foi remarcada com beta-actina (SC-81178, anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology, 1: 1000/43 kDa), uma proteína constitutiva utilizada como um controle de carga para normalizar os dados obtidos pelo Western blot. Para o controle das proteínas pERK $\frac{1}{2}$ e p-eIF2 α , a correção foi feita com as proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e eIF2 α , respectivamente.

3.8 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão de mRNA dos genes relacionados ao metabolismo dos lipídios hepáticos nos fígados de camundongos. O RNA hepático total foi extraído utilizando uma solução de lise - Trizol (Invitrogen, CA, EUA) para extrair e isolar o RNAm. A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia usando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences) usando 1 ug de RNA e DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando oligonucleótidos Oligo (dT) para RNAm e transcriptase-reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e a mistura SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). Os iniciadores foram projetados usando o software on-line Primer 3web versão 4.0. O gene beta-actina foi utilizado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo. A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95° C), com 44 ciclos, cada um consistindo de 95° C para 10s e 60° C por 15s, seguido de uma curva de fusão (60 a 95° C, com aquecimento taxa de 0,1° C / s). Os controles negativos consistiam em poços em que o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) do mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde ΔC_t expressou a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes alvo e o controle endógeno. As seqüências de primers sensíveis e anti-sentido utilizadas para amplificação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências de primers utilizados no RT-qPCR

Gene	<i>Sequência dos primers</i>	
	5'-3'	3'-5'
PPAR- α	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
PPAR- β/δ	TGGAGCTCGATGACAGTGAC	GGTTGACCTGCAGATGGAAT
PPAR- γ	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
TNF- α	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
CPT-1a	GCAGAGCACGGCAAATGA	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
FAS	TCGAGGAAGGCACTACACCT	CACCCACTGGAAGCTGGTAT
SREBP-1c	AGCAGCCCCTAGAACAACA	TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
FAT/CD36	CCCTCCAGAATCCAGACAAC	TGCATTTGCCAATGTCTAGC
Beta-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
ATF4	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
CHOP	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA

Abreviações: Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), Carnitina palmitoil transferase I A (CPT-1a), Ácido Graxo sintase (FAS), Proteína de ligação ao elemento regulador de estero1 1c (SREBP-1c), Fator de necrose tumoral alfa (TNF α), Interleucina 6 (IL-6), Translocase de ácidos graxos / fator de diferenciação 36 (FAT/CD36), activating transcription factor 4 (ATF4) e CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP).

3.9 Imunofluorescência

O ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) foi realizado para avaliar a apoptose *in situ* utilizando a deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) para a detecção de células positivas com o Kit de detecção de apoptose *in situ* de fluorescência ApopTag® Plus (S7111, Millipore - EUA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As imagens de imunofluorescência foram capturadas usando microscópio confocal de varredura a laser (Nikon Confocal Laser Scanning Microscope, modelo C2, Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

O método de rotina para o preparo de amostras do fígado para microscopia eletrônica de transmissão foi empregado em pelo menos três animais em cada grupo. Fragmentos do tecido hepático (1 mm³) foram fixados em 2,5% de glutaraldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 2 h à temperatura ambiente. As amostras foram então pós fixadas em 1% de tetróxido de ósmio durante uma hora à temperatura ambiente e no escuro. Além disso, as amostras foram desidratadas em concentração crescentes de acetona e incorporadas em resina epóxi (48h a 60 / 70°C). Secções ultrafinas (60-80 nm de espessura) foram cortadas em um ultramicrotomo (Leica UltraCut ultramicrotome, Leica, Wetzlar, Alemanha), e as seções foram transferidas para grades. As grades foram contrastadas com 5% de acetato de uranila durante 30 min, e 2% de citrato de chumbo durante 3 min e depois examinadas usando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL / JEM - 1200 EX (Instituto Nacional de Bioquímica e Ciência e Tecnologia de Bioimagem - CENABIO - UFRJ). A observação da ultraestrutura hepática teve como objetivo verificar o arranjo ultraestrutural dos hepatócitos, a distribuição e padrão das gotículas de gordura intra-hepáticas e do retículo endoplasmático.

3.11 Análise de dados

Os valores são demonstrados como média e desvio padrão (DP). Nos casos em que confirmamos a homocedasticidade das variâncias, as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste t de Student (nas primeiras 10 semanas do experimento) ou ANOVA de uma via, seguido do teste post-hoc de Holm-Sidak (durante a fase de tratamento). As interações entre dieta e tratamento, bem como o efeito principal atribuído a cada uma das variáveis (dieta ou tratamento) sobre os defechos avaliados foram testadas usando a ANOVA de duas vias. Em todos os casos, utilizou-se o índice de significância $P < 0,05$, onde foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism versão 6.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

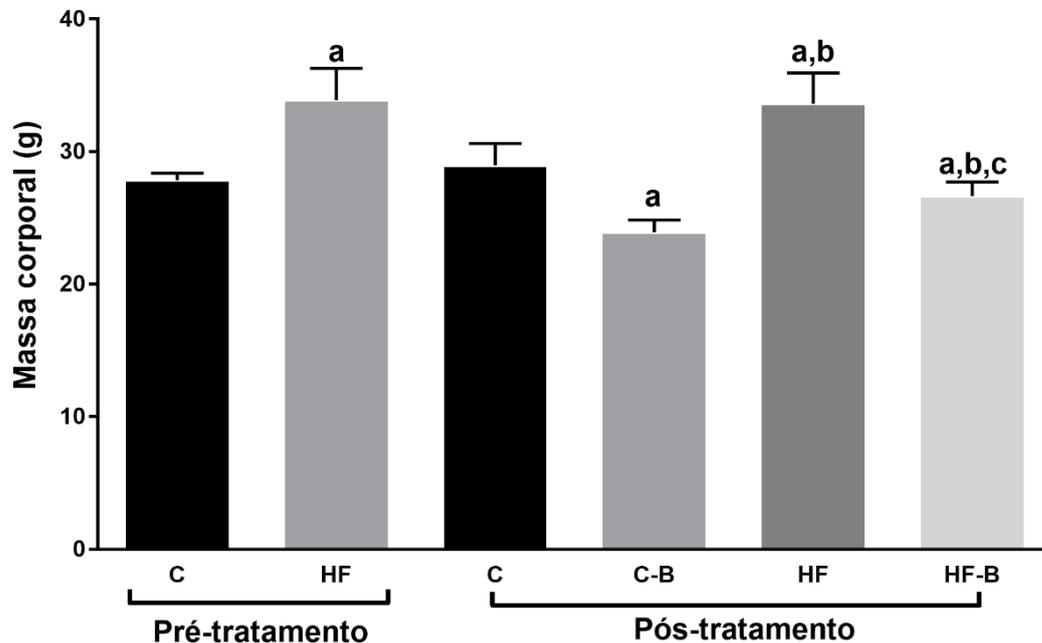
4 RESULTADOS

4.1 Ingestão Alimentar, Energética e Massa corporal (MC)

Os animais iniciaram o experimento sem diferença entre os grupos quanto à ingestão alimentar (g), o que foi mantido durante todo o experimento. Por outro lado, o grupo HF apresentou maior consumo de energia (Kcal) do que o grupo C (+ 43,66%, $P = 0,0018$). No entanto, o grupo HF-B mostrou uma ingestão energética semelhante ao grupo HF, assim como o grupo C-B quando comparado ao grupo C. Esses resultados descartam a necessidade de um grupo *pair-feeding* para isolar os efeitos do tratamento. Os resultados são detalhados na tabela 2.

Após dez semanas de ingestão da dieta, foi verificado sobrepeso no grupo HF em relação ao grupo C (+ 21,72%, $P = 0,0006$, Figura 6, pré-tratamento). Na semana 14, última semana de tratamento, o grupo HF manteve-se com sobrepeso quando comparado ao grupo C (+ 16,06%, $P = 0,0008$, Figura 1A, pós-tratamento), ao passo que os grupos C-B e HF-B mostraram redução da MC quando comparado ao grupo C e HF, respectivamente (-17,37%, $P = 0,0005$ para o grupo C-B em comparação ao C e -20,74%, $P < 0,0001$ para o grupo HF-B em comparação ao HF, Figura 6, pós-tratamento). Devido ao fato de que a ingestão de energia foi semelhante entre os grupos HF e HF-B, pode-se inferir que a redução da massa corporal foi um efeito isolado do tratamento com o agonista PPAR- β/δ GW0742.

Figura 6 – Massa corporal dos animais nos períodos pré e pós-tratamento



Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 10$ por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

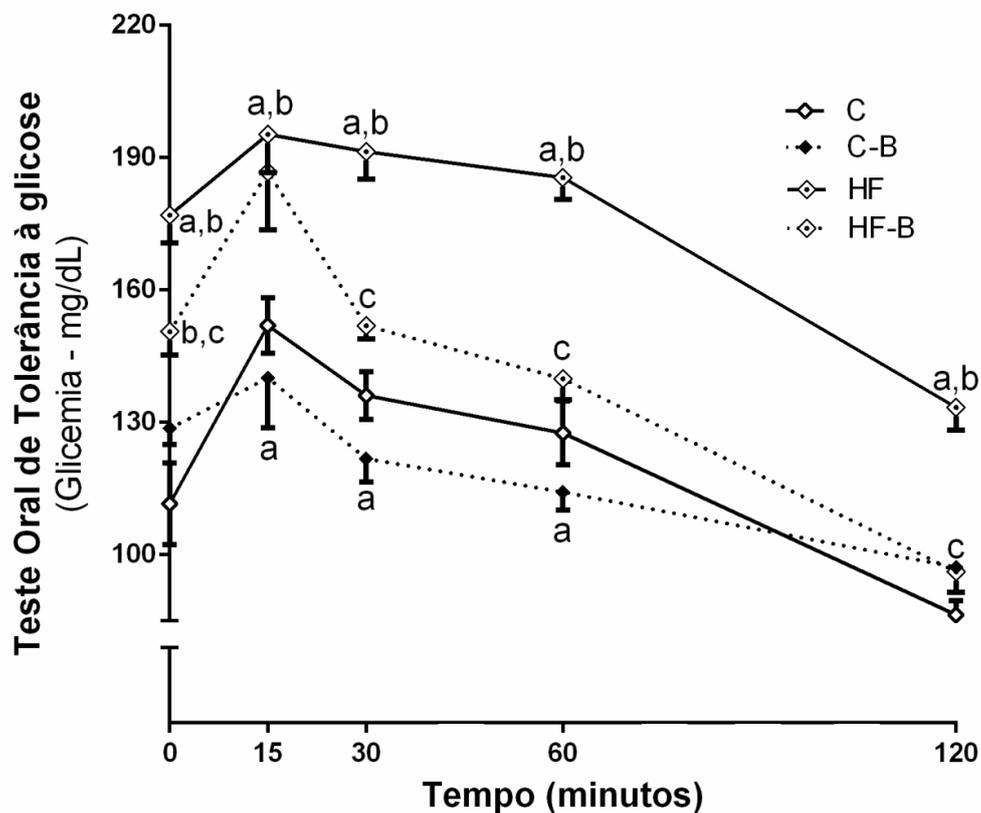
4.2 Metabolismo de carboidratos

A Figura 7 mostra a curva do TOTG, no qual o grupo HF apresentou aumento significativo da glicemia de jejum (T0) em relação ao grupo C. Essa diferença foi mantida até o final do teste (T120), indicando um atraso na normalização da glicemia após a sobrecarga de glicose. Em contraste, o grupo HF-B mostrou um pico de glicose semelhante ao grupo HF. Contudo, o tratamento com GW0742 promoveu o retorno rápido aos níveis basais de glicemia e o grupo HF-B não diferiu do grupo C nos períodos remanescentes de avaliação (T30, T60 e T120).

Conforme mostrado na tabela 2, a análise da área sob a curva (ASC) para TOTG não mostrou diferença entre os grupos C e C-B. No entanto, a ASC demonstrou intolerância oral à glicose no grupo HF, com valores maiores que o grupo C (+ 47,21%, $P < 0,0001$). O grupo HF-B, por outro lado, apresentou valores de ASC acentuadamente reduzidos em relação ao grupo HF (-24,12%, $P < 0,0001$).

Os dados do TOTG foram corroborados pelos resultados do QUICKI, nos quais o grupo HF apresentou RI, indicada pela redução do índice QUICKI quando comparado ao grupo C (-5,26%, $P = 0,033$). O tratamento aumentou significativamente o índice QUICKI, o que significa uma maior sensibilidade à insulina no grupo HF-B quando comparado ao grupo HF (+ 11,11%, $P = 0,0012$, tabela 2). Esses resultados sugerem que o GW0742 atenua a RI induzida pela ingestão de dieta HF em camundongos.

Figura 7 – Curva glicêmica do teste oral de tolerância à glicose após o tratamento

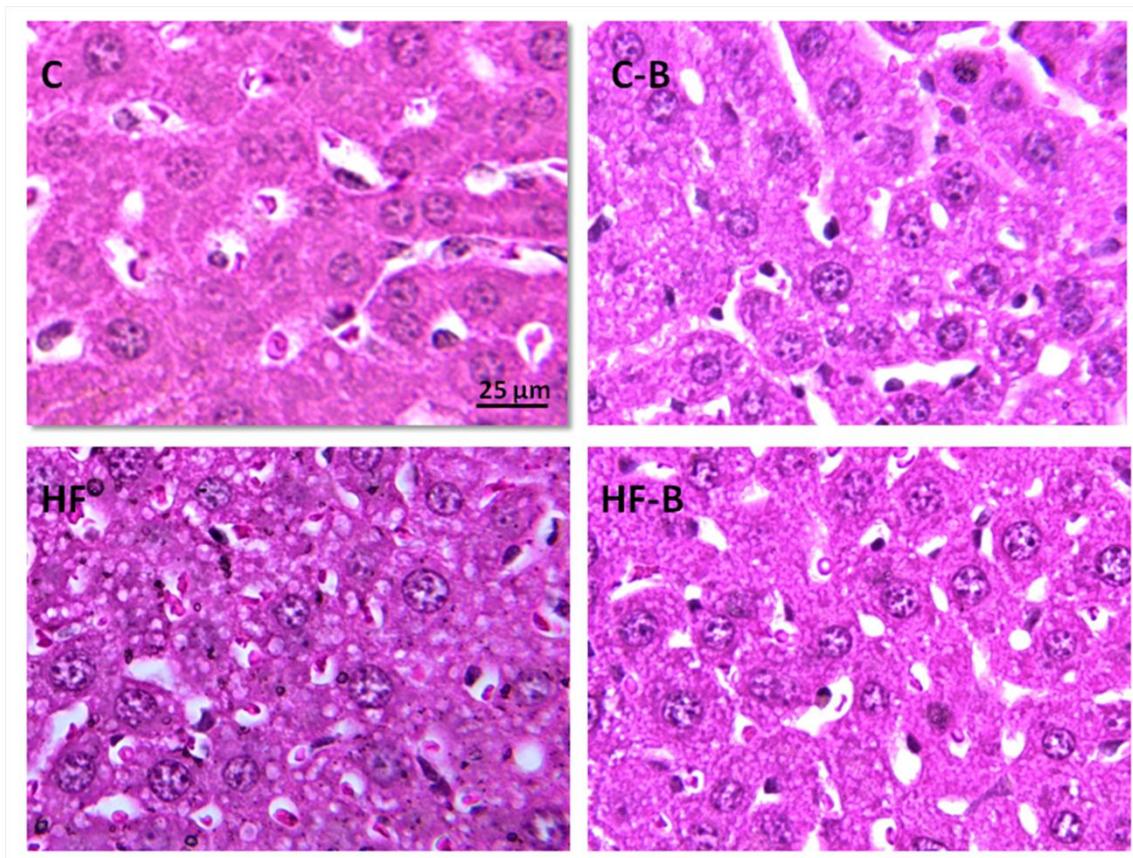


Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

4.3 Histologia do fígado, massa hepática e dosagens bioquímicas

A massa hepática aumentou significativamente no grupo HF quando comparada ao grupo C (+29,79%, $P = 0,002$). Esta condição foi resgatada pelo tratamento no grupo HF-B, pois esses animais apresentaram menor massa hepática quando comparados ao grupo HF (-11,47%, $P = 0,002$). Estes resultados são detalhados na tabela 2 e, provavelmente, estão associados à deposição de vesículas de gordura no tecido hepático, como observado nas fotomicrografias do grupo HF. Pelo contrário, as fotomicrografias do grupo HF-B são semelhantes as do grupo C, exibindo um parênquima hepático mais preservado com pequena quantidade de gotículas de gordura (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografias representativas da estrutura hepática ao final do experimento



Legenda: Fotomicrografia do tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (HE); Fotos de mesmo aumento representativas dos grupos experimentais, barra de calibração = 25µm. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR-β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR-β/δ (HF-B).

De acordo com a massa hepática, os níveis de ALT, um forte preditor da DHGNA em indivíduos obesos, foram elevados no grupo HF quando comparados ao grupo C (+ 87,5%, $P = 0,0037$). Por outro lado, o tratamento resgatou completamente os níveis de ALT no grupo HF-B, que foi marcadamente inferior ao grupo HF (-56,56%, $P = 0,0006$) e igual ao grupo C. Não houve alteração nos valores de AST.

Em relação aos níveis de colesterol plasmático, a dieta rica em lipídios elevou significativamente seus níveis no grupo HF quando comparado ao grupo C (+ 54,14%, $P < 0,0001$). No entanto, o GW0742 diminuiu eficientemente os níveis de colesterol plasmático no grupo HF-B em comparação com a sua contraparte (-13,18%, $P = 0,0132$).

Os níveis de colesterol hepático também foram aumentados no grupo HF quando comparados ao grupo C (+ 18,23%, $P < 0,0001$). O tratamento com GW0742 promoveu redução dos níveis de colesterol hepático no grupo HF-B quando comparado ao grupo HF (-7,88%, $P = 0,0069$). Os dados são descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Ingestão alimentar, massa corporal, metabolismo de carboidratos, massa hepática e dosagens bioquímicas

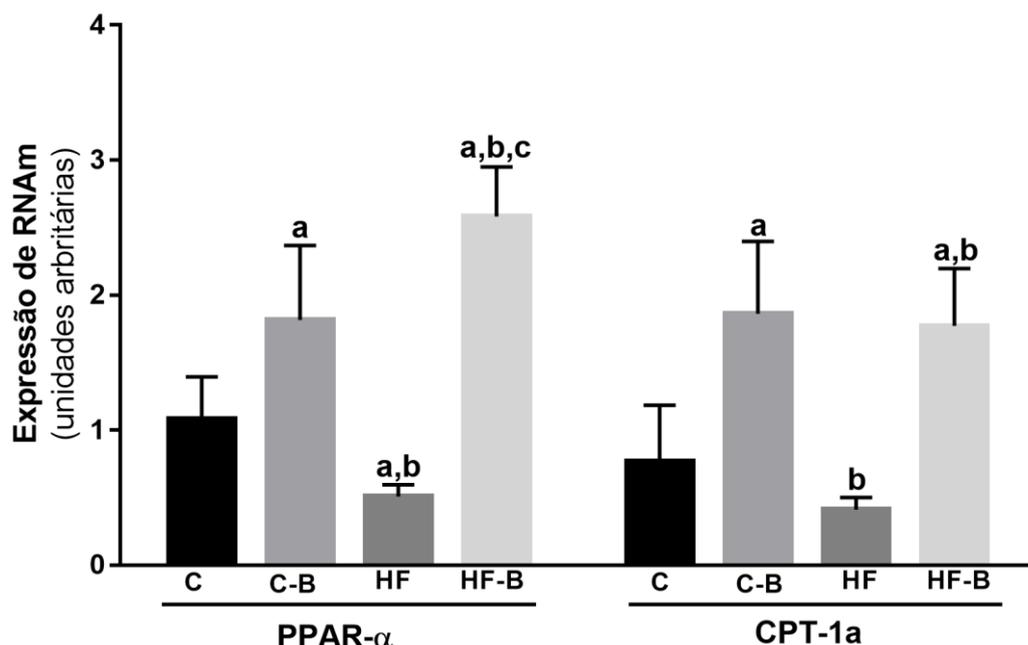
DADOS	C	C-B	HF	HF-B
Consumo alimentar				
Ingestão (g/semana/animal)	2,48±0,27	2,72±0,18	2,718±0,12	2,705±0,15
Energia (Kcal/semana/animal)	9,46±1,03	10,39±0,72	13,59±0,61 ^{a,b}	13,53±0,76 ^{a,b}
Metabolismo dos Carboidratos				
TOTG (AUC, a.u.)	14885±433	13751±271 ^a	21912±649 ^{a,b}	16622±321 ^{a,b,c}
Glicemia de jejum (mg/dL)	111,6±20,72	128,6±8,08	177,0±14,11 ^{a,b}	150,6±11,93 ^{b,c}
QUICK	0,19±0,005	0,21±0,008 ^a	0,18±0,002 ^{a,b}	0,20±0,009 ^c
Dosagens Hepáticas				
Massa Hepática (g)	0,47 ± 0,026	0,51 ± 0,016	0,61 ± 0,003 ^{a,b}	0,54 ± 0,001 ^{a,b}
AST (mg/dL)	118,8 ± 26,37	113,3 ± 29,19	110,7 ± 44,01	118,0 ± 37,20
ALT (mg/dL)	35,20 ± 5,40	30,40 ± 3,85	66,0 ± 20,46 ^{a,b}	28,67 ± 11,15 ^c
Colesterol plasmático (mg/dL)	92,06 ± 18,00	94,26 ± 15,48	141,9 ± 21,55 ^{a,b}	123,2 ± 17,32
Colesterol Hepático (mg/g tecido)	10,62 ± 0,31	11,56 ± 0,13 ^a	12,55 ± 0,29 ^{a,b}	11,56 ± 0,32 ^c

Legenda: Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média, n = 5 por grupo. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras (P<0,05): a ≠ C; b ≠ C-B; c ≠ HF e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR-β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR-β/δ (HF-B); aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

4.4 RT-qPCR

Entre os genes relacionados à beta-oxidação, o gene PPAR- α apresentou maior expressão no grupo C-B em relação ao grupo C (+ 67,68%, $P = 0,030$, Figura 9). Do mesmo modo, o grupo HF-B mostrou aumento da expressão do gene PPAR- α quando comparado ao grupo HF (+ 407,97%, $P < 0001$), enquanto o grupo HF apresentou menor expressão do que o grupo C (- 53,05%, $P = 0,035$). O gene CPT-1a (Figura 9), um transcrito do PPAR- α , também apresentou aumento no grupo C-B quando comparado ao grupo C (+ 142,80%, $P = 0,0057$) e no grupo HF-B quando comparado ao HF grupo (+ 330,31%, $P = 0,0004$). Não houve diferença estatística entre os grupos C-B e HF-B.

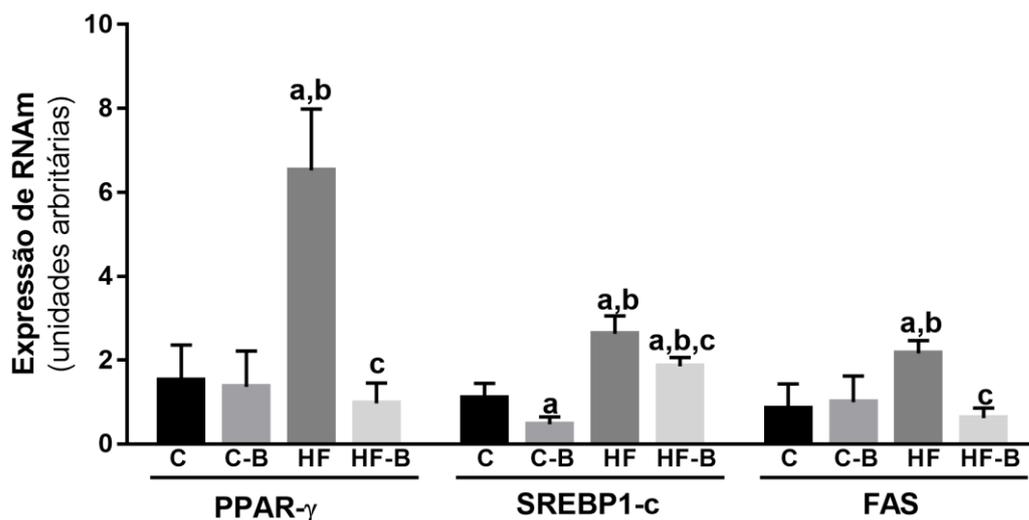
Figura 9 – Níveis de RNA mensageiro do PPAR- α e seu transcrito CPT-1a



Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

Em relação aos genes lipogênicos (Figura 10), o grupo HF apresentou maior expressão de PPAR- γ do que o grupo C (+ 328,45%, $P < .0001$), enquanto o grupo HF-B apresentou expressão reduzida quando comparado ao grupo HF (-85,08%, $P < .0001$). O gene SREBP-1c, um transcrito do PPAR- γ , foi amplamente aumentado no grupo HF em relação ao grupo C (+ 138,71%, $P = 0,0001$, Figura 10). Os grupos tratados tiveram uma expressão de SREBP-1c consideravelmente menor do que as suas contrapartes: C-B em relação a C (-57,37%, $P = 0,041$) e HF-B em relação à HF (-29,59%, $P = 0,0181$). Do mesmo modo, o gene FAS mostrou um aumento significativo no grupo HF em comparação ao grupo C (+ 153,91%, $P = 0,0092$, Figura 10). Mais uma vez, o grupo HF-B apresentou expressão do gene FAS reduzida quando comparado ao grupo HF (-71,19%, $P = 0,0088$), reforçando o papel do GW0742 na redução da lipogênese hepática. Os dados são sugestivos de que o GW0742 reduz a lipogênese hepática e melhora a expressão de genes relacionados com a beta-oxidação.

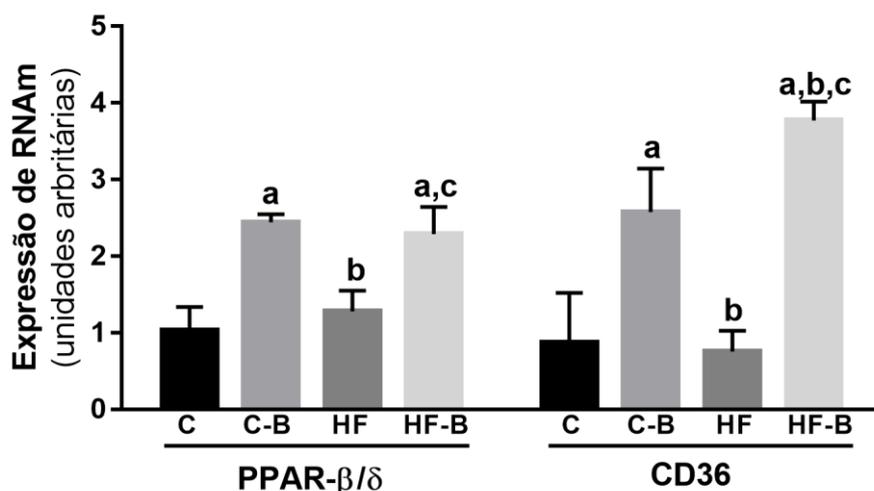
Figura 10 – Níveis de RNA mensageiro do PPAR- γ e seus transcritos SREBP1-c e FAS



Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

O gene PPAR- β/δ e seu transcrito, CD36 (Figura 11), mostraram aumento significativo nos grupos tratados quando comparados aos seus pares. O grupo C-B mostrou aumento de 136,82% e o grupo HF-B teve um aumento de 78,57% na expressão do PPAR- β/δ quando comparado ao grupo C ($P = 0,0003$) e HF ($P = 0,0037$), respectivamente. Da mesma forma, o grupo C-B aumentou a expressão de CD36 em 196,78% quando comparado ao grupo C ($P = 0,0007$), enquanto o grupo HF-B aumentou a expressão de CD36 em 397,49% em comparação com o grupo HF ($P < 0,0001$). A expressão de CD36 melhorada implica uma maior capacidade de transporte de AGs de cadeia longa para o interior do hepatócito e contribui com a maior demanda de combustível para a beta-oxidação nos grupos tratados.

Figura 11 – Níveis de RNA mensageiro do PPAR- β/δ e seu transcrito CD36

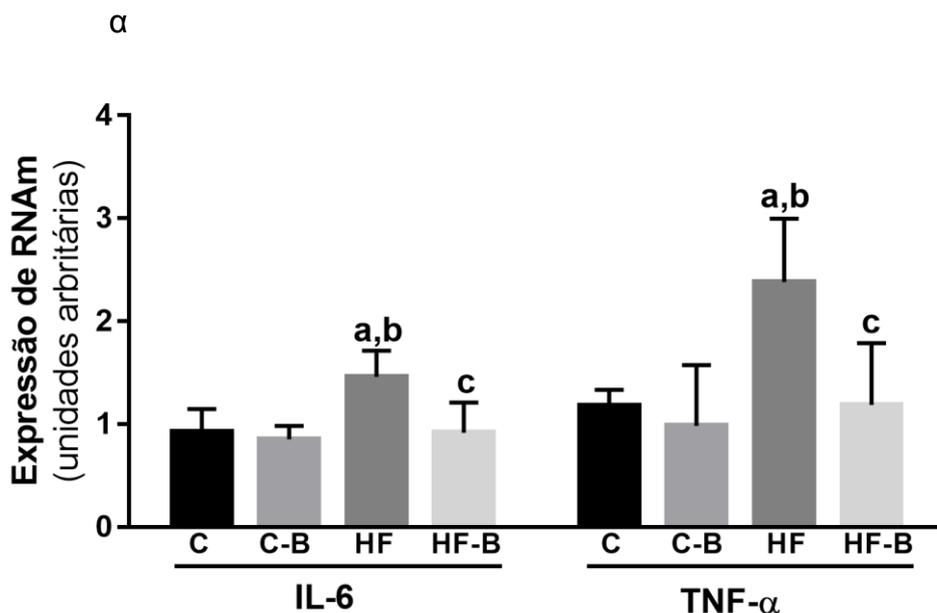


Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

Os genes pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α mostraram aumento significativo na expressão gênica no grupo HF em comparação ao grupo C (+ 58,22%, $P = 0,0043$ para a IL-6 e + 102,46%, $P = 0,0031$ para o TNF- α , Figura

12). Em contraste, o grupo HF-B apresentou redução na expressão desses genes quando comparado ao grupo HF (-37,08%, $P = 0,0032$ para a IL-6 e -50,19%, $P = 0,0030$ para o TNF- α , respectivamente), o que indica um importante papel anti-inflamatório do GW0742.

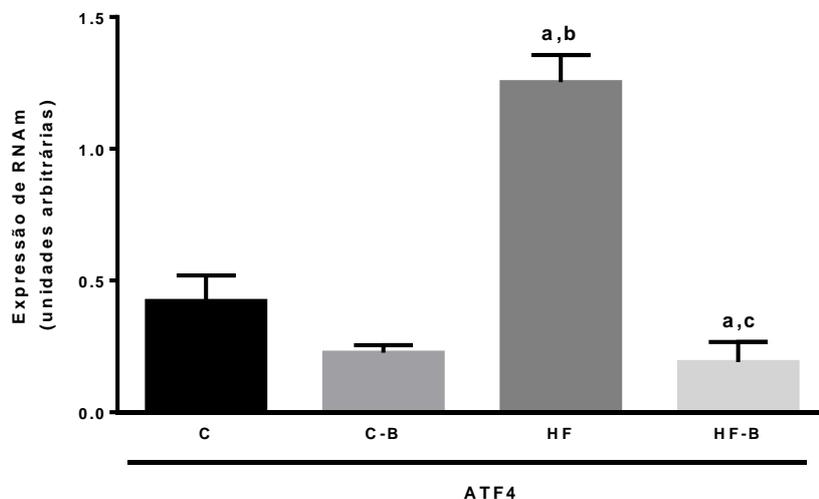
Figura 12 – Níveis de RNA mensageiro dos genes pró-inflamatórios IL-6 e TNF- α



Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

Em relação ao fator de transcrição envolvido na ativação do ERE, ATF4 (Figura 13), o grupo HF apresentou maior expressão do que o grupo C (+196%, $P < 0,0001$). Enquanto que os grupos tratados C-B e HF-B apresentaram suas expressões reduzidas quando comparados as suas contrapartes, (-46,45%, $P = 0,0086$ e -84,76%, $P < 0,0001$), respectivamente.

Figura 13 – Níveis de RNA mensageiro dos genes do estresse do retículo endoplasmático e morte celular

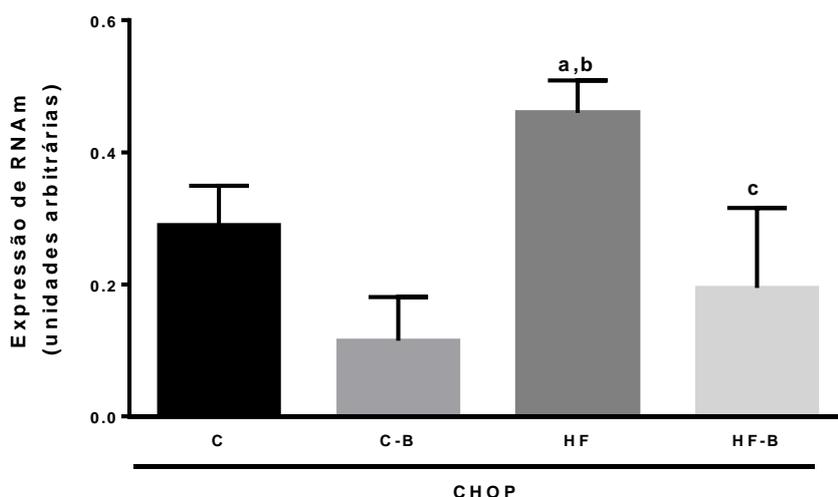


Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

Da mesma forma o gene CHOP, um fator de transcrição induzido pelo estresse celular que está envolvido na mediação da apoptose, foi aumentado no grupo HF em relação ao grupo C (+ 58,66%, $P = 0,0167$). Novamente, os grupos C-B e HF-B mostraram expressões reduzidas em relação as suas contrapartes (- 60,39%, $P = 0,0167$ e - 57,64%, $P = 0,0007$), respectivamente.

Os dados reforçam o papel do GW0742 em atenuar o ERE e melhorou a expressão de genes relacionados com a ativação da UPR e consequente indução da morte celular (Figura 14).

Figura 14 – Níveis de RNA mensageiro do gene marcador de morte celular



Legenda: Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média, $n = 5$ por grupo e os genes selecionados foram normalizados pela expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com as letras ($P < 0,05$): $a \neq C$; $b \neq C-B$; $c \neq HF$ e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

4.5 Western Blotting

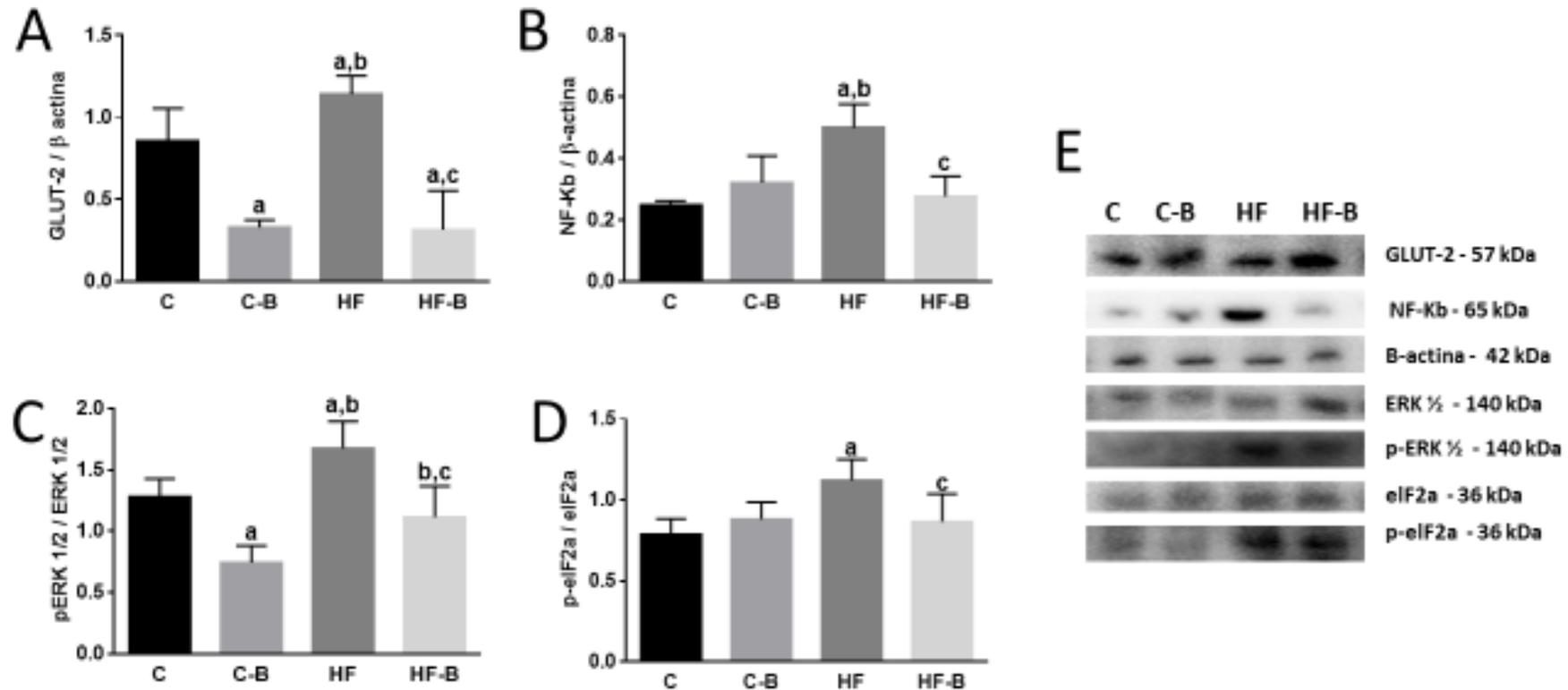
A expressão proteica de GLUT-2, o transportador de glicose hepático, foi maior no grupo HF do que no grupo C (+ 33,00%, $P = 0,0486$). No entanto, o grupo C-B e HF-B mostrou redução acentuada na expressão GLUT2 quando comparado ao grupo C e HF (- 61,75%, $P = 0,0004$ e - 72,32%, $P < 0,0001$, respectivamente na Figura 15A).

A expressão da proteína NF- κ B, um fator de transcrição responsável pela transcrição de TNF- α e IL-6, ambos envolvidos na inflamação, aumentou no grupo HF quando comparado ao grupo C (+ 101,83%, $P = 0,0001$). Uma redução notável na expressão de NF- κ B foi percebida no grupo HF-B em comparação ao grupo HF (- 44,54%, $P = 0,0004$, Figura 15B). Este resultado está em conformidade com a expressão dos genes TNF- α e IL-6, reduzidas significativamente após o tratamento com GW0742 no fígado dos animais HF-B.

A avaliação da expressão de ERK1/2 mostrou maior expressão de pERK1/2 / ERK1/2 no grupo HF que no grupo C (+ 30,81%, $P = 0,0174$). Por

outro lado, ambos C-B (- 42,06 %, P = 0,0019) e HF-B (- 33,45 %, P = 0,0011) apresentaram expressão reduzida de pERK1/2 / ERK1/2 quando comparados com suas contrapartes (Figura 15C). Na avaliação da expressão de p-eIF2a / eIF2a, um marcador da sinalização da UPR, foi observada expressão aumentada de p-eIF2a / eIF2a no grupo HF quando comparado ao grupo C (+ 42,50 %, P = 0,0123), enquanto o tratamento com GW0742 causou redução expressiva em seus níveis no grupo HF-B em comparação com o grupo HF (- 22,79 %, P = 0,0419, Figura 15D). O agonista PPAR- β/δ reduziu a expressão de proteínas associadas à inflamação e ao ERE hepático. A figura 15E ilustra as bandas correspondentes às proteínas avaliadas e à proteína constitutiva beta-actina, utilizada para a correção dos resultados obtidos.

Figura 15 – Expressão proteica relacionada à inflamação e ao ERE ao final do tratamento



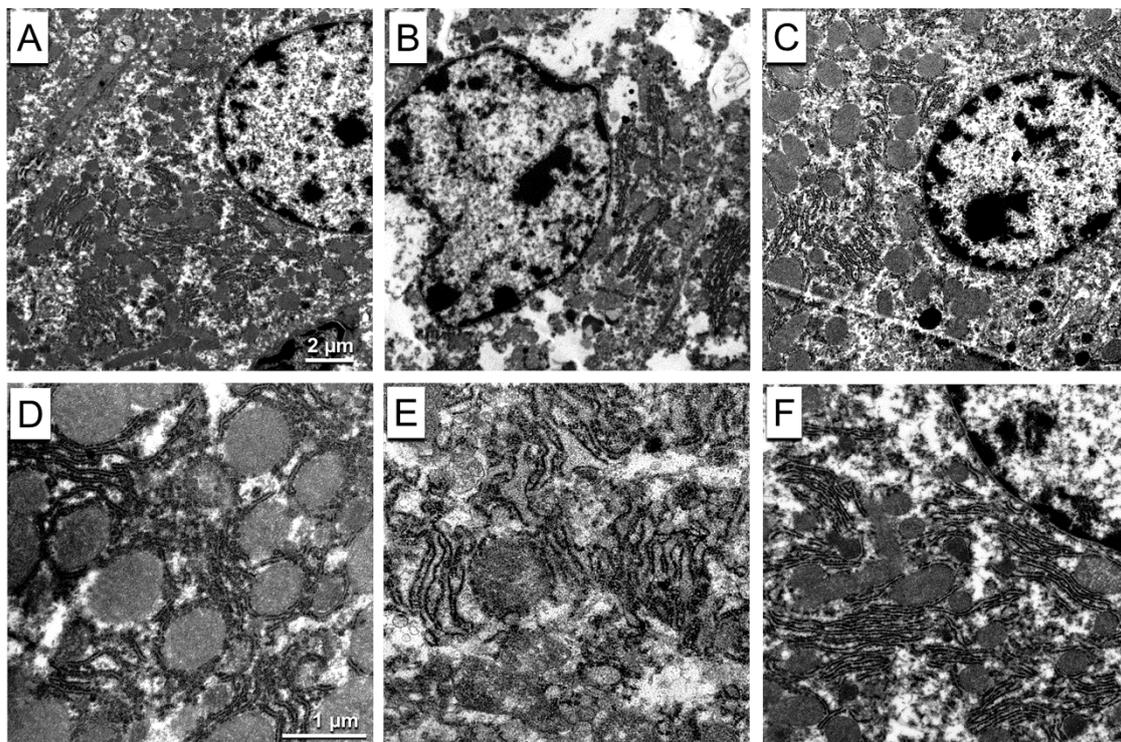
Legenda: Expressão proteica do GLUT2 (A), NF-Kb (B) e pERK / ERK total (C) e p-eIF2a / eIF2a total (D). Valores representados como média \pm DP, n = 5 por grupo. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas com os símbolos (P <0,05): a \neq C; b \neq C-B; c \neq HF e foram determinadas pelo teste ANOVA de uma via e pós-teste de Holm-Sidak. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B); transportador de glicose 2 (GLUT2); fator nuclear kappa b (NF-kB); cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2); cinase regulada por sinal extracelular fosforilada 1/2 (pERK 1/2); fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2a) e fator de iniciação eucariótico 2 fosforilado (p-eIF2a).

4.6 Microscopia Eletrônica de transmissão e imunofluorescência

A análise da microscopia eletrônica de transmissão visou correlacionar os achados moleculares com as alterações ultraestruturais dos hepatócitos. Os animais do grupo C apresentaram parênquima hepático preservado (figura 16A, sem alterações na morfologia nuclear ou do RE (figura 16D). Por outro lado, os animais HF apresentaram esteatose microvesicular marcante após a ingestão crônica de dieta HF (Figura 16B), a qual foi acompanhada por modificações estruturais do RE com fissão e cisternas dilatadas, caracterizando o ERE (Figura 16E). De forma importante, a avaliação da ultraestrutura do grupo HF-B revelou um parênquima hepático bem preservado com esteatose leve (Figura 16C), semelhante ao observado no grupo C (Figura 16A), juntamente com um maior número de mitocôndrias e cisternas contínuas de RE, sem fissão ou qualquer sinal de dilatação (Figura 16F). Essas observações estão de acordo com os resultados da expressão gênica e proteica, indicando que o GW0742 pode reverter o ERE neste modelo experimental.

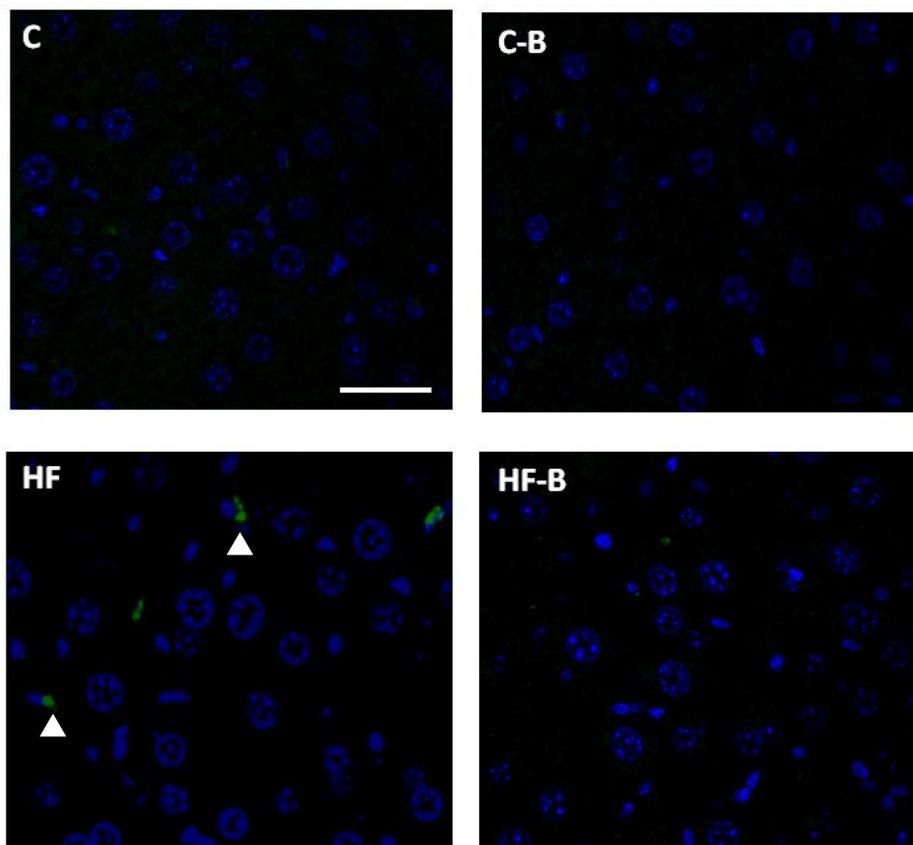
O ERE resulta em estímulo pró-apoptótico e nossos resultados mostram imunorreação positiva para o método TUNEL no fígado de camundongos alimentados com dieta HF. Os achados ultraestruturais confirmam essas observações e também corroboram com a expressão proteica aumentada de NF- κ B, pois é um importante preditor da apoptose. Pelo contrário, o tratamento reduziu a expressão de NF- κ B e a imunorreatividade ao método TUNEL; ambos indicam apoptose reduzida e confirmam que a morfologia do RE bem preservada protege a célula contra inflamação e apoptose (Figura 17).

Figura 16 – Ultraestrutura dos hepatócitos ao final do experimento



Legenda: Grupo C mostra hepatócitos bem preservados (A) com numerosas mitocôndrias e RE sem evidências de danos estruturais (D). Grupo HF mostra abundante esteatose microvesicular, mitocôndrias esparsas e núcleo de forma irregular (B), acompanhados por evidência de ERE pelo alargamento das cisternas do RE (E). A ativação do PPAR- β/δ produziu efeitos anti-esteatóticos no grupo HF-B, juntamente com aumento do número de mitocôndrias e format nuclear regular (C), sem sinais de ERE (F). Eletromicrografias com o mesmo aumento em cada linha (linha superior, barra de calibração=2 μm ; linha inferior, barra de calibração=1 μm). Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

Figura 17 – Imunofluorescência pelo método TUNEL (apoptose) no tecido hepático



Legenda: Imunomarcacão para o método TUNEL, o qual mostrou células apoptóticas positivas somente no grupo HF (marcação em verde). Mesmo aumento para todas as imagens, barra de calibração = 25 μ m. Abreviações: controle (C); high-fat (HF); Controle tratado com o agonista PPAR- β/δ (C-B) e High-fat tratado com agonista PPAR- β/δ (HF-B).

4.7 ANOVA de duas vias

O ANOVA de duas vias está detalhado na tabela 3. De forma sucinta, houve interação significativa entre dieta e tratamento sobre os seguintes parâmetros: massa hepática, colesterol hepático, níveis plasmáticos de ALT, expressão gênica de PPAR- α , PPAR- γ , CD36, SREBP1-c, FAS, IL-6, e TNF- α , e expressão proteica de NF- κ B e eIF2 α . O tratamento com GW0742 foi o fator que mais influenciou a variância da massa corporal final, QUICKI, expressão

gênica de PPAR- α , CPT-1a, PPAR- β/δ e CD36, e expressão proteica de GLUT2 e ERK1/2.

Tabela 3 – Resumo dos resultados do ANOVA de duas vias

PARÂMETROS	INTERAÇÃO		TRATAMENTO		DIETA	
	% da variância total	Valor P	% da variância total	Valor P	% da variância total	Valor P
Massa corporal final	--	--	61,49	<0,0001	23,13	<0,0001
Glicemia de jejum	--	--	15,33	0,004	62,17	<0,0001
QUICKI	--	--	62,58	<0,0001	15,64	0,0037
ALT	19,04	0,008	31,94	0,0001	15,21	0,016
Colesterol total	--	--	--	--	55,59	0,0002
Colesterol hepático	44,27	<0,0001	--	--	44,27	<0,0001
Massa hepática	28,86	<0,0001	2,146	<0,0001	68,92	<0,0001
Expressão gênica						
PPAR- β/δ	--	--	83,66	<0,0001	--	--
PPAR- α	15,71	0,0009	68,82	<0,0001	--	--
CPT1a	--	--	71,97	<0,0001	--	--
PPAR- γ	30,58	<0,0001	34,24	<0,0001	22,33	<0,0001
CD36	6,08	0,006	79,57	<0,0001	4,21	0,020
FAS	33,49	0,0010	22,97	0,0043	10,32	0,040
SREBP-1c	--	--	17,05	<0,0001	72,64	<0,0001
IL-6	13,61	0,037	22,48	0,009	21,86	0,010
TNF- α	11,88	0,049	22,72	0,009	23,38	0,008
ATF4	15,23	0,0235	32,63	0,0021	13,25	0,0329
CHOP	--	--	56,25	<0,0001	18,16	0,0027
Expressão proteica						
GLUT2	--	--	78,24	<0,0001	--	--
ERK $\frac{1}{2}$	--	--	52,97	<0,0001	25,83	0,0004
eIF2a	26,53	0,007	--	--	22,07	0,013
NF-kB	41,40	0,0002	10,56	0,024	20,56	0,003

Legenda: O fator que mais influenciou a variância total está em negrito. Abreviações: Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), Carnitina palmitoil transferase I A (CPT-1a), Sintase de ácido graxo (FAS), Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c), Fator de necrose tumoral alfa (TNF α), Interleucina 6 (IL-6), translocase de ácido graxo/cluster de diferenciação 36 (FAT/CD36), transportador de glicose 2 (GLUT2), quinase regulada por sinal extracelular $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$), fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2a), fator nuclear kappa b (NF-kB), alanina aminotransferas e (ALT), fator de transcrição ativado 4 (ATF4, proteína homóloga C/EBP

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a ingestão crônica de dieta hiperlipídica provocou aumento da MC, RI, aumento dos níveis de ALT e favorecimento da lipogênese hepática e redução da beta-oxidação. Tais alterações corroboram com os achados da ultraestrutura hepática danificada, com esteatose marcante, ERE e presença de núcleos apoptóticos. Por outro lado, nossos resultados fornecem novas evidências de que o tratamento com GW0742 (agonista PPAR- β/δ) normalizou os parâmetros bioquímicos, reduziu marcadamente a lipogênese hepática e aumentou consideravelmente a beta-oxidação. Como resultado, nos animais HF-B inflamação hepática foi revertida, não foi observada apoptose e apresentaram a ultraestrutura do RE comparável com os animais do grupo C. Esses achados confirmam os efeitos benéficos do agonista PPAR- β/δ nesse modelo experimental.

Conforme descrito anteriormente, a ingestão excessiva de gordura saturada prejudica a homeostase energética, contribuindo fortemente para o desenvolvimento da obesidade, que está intimamente relacionada à RI, hipertrofia de adipócitos, perfil pro-inflamatório de adipocinas, ERE e gênese da DHGNA (11, 92). Estes resultados estão de acordo com a RI, hiperglicemia e atraso na normalização dos níveis de glicose no sangue, como mostrado no resultado do TOTG, o que configura a intolerância oral à glicose nos animais HF. A ativação do PPAR- β/δ interveio em todas essas alterações, como anteriormente demonstrado em animais alimentados com dieta de HF, maximizando o uso de lipídios como combustível para o metabolismo energético celular, diminuindo o acúmulo de lipídios intracelulares e restaurando a sensibilidade à insulina dos tecidos (93).

Concomitantemente com alterações morfofisiológicas no tecido adiposo, o fígado também é altamente afetado pela obesidade. O GW0742 não recuperou completamente a massa hepática, porém, foi capaz de normalizar os níveis de colesterol hepático e os níveis de ALT, ambos considerados como marcadores da estrutura e função hepática danificada. A ingestão dietética de colesterol está em conformidade com os níveis de colesterol total e hepático nos animais HF (94). Os níveis mais elevados de colesterol hepático são um preditor importante da

inflamação hepática e EHNA. Esta condição torna o fígado mais susceptível a outros danos hepáticos, incluindo fibrose, cirrose e câncer de fígado (49, 95).

De acordo com estes achados, os animais HF apresentaram os maiores níveis de ALT, o que está fortemente correlacionado com o dano hepático decorrente da obesidade e doenças relacionadas (96, 97). Consideravelmente, o GW0742 superou todas estas alterações e normalizou os níveis de colesterol hepático, confirmando os seus efeitos benéficos. Estudos anteriores mostraram que níveis aumentados de colesterol hepático poderiam afetar a resposta transcricional do gene (95).

Desta forma, os animais obesos apresentaram valores aumentados de colesterol hepático, juntamente com maior expressão do gene PPAR- γ paralelo à redução da expressão gênica das outras duas isoformas de PPAR. Pelo contrário, a administração do agonista PPAR- β/δ modulou todas as isoformas de PPAR, levando ao aumento da expressão do gene PPAR- α e PPAR- β/δ paralelamente à expressão reduzida do gene PPAR- γ . Este padrão de expressão gênica pode desencadear efeitos benéficos, favorecendo a metabolização hepática de lipídios, atenuando os efeitos nocivos das comorbidades da obesidade (57, 68).

A ativação de PPAR- α é conhecida por atenuar ou conter a lipotoxicidade e a inflamação. A co-ativação e o aumento da expressão gênica do PPAR- α , estimulado pela administração de GW0742, ativaram a transcrição de seu gene alvo CPT-1a. Este achado prediz aumento da beta-oxidação, que ocorre nas mitocôndrias, desencadeando a degradação de TAG e, assim, contribuindo para a reversão da lipotoxicidade (68, 98). Recentemente, a ativação de PPAR- α pelo WY14643 aumentou a densidade numérica de mitocôndrias no fígado de camundongos alimentados com dieta HF, o que atenuou a progressão da DHGNA (68). A ativação de PPAR- β/δ , por sua vez, estimula a transcrição de FAT/CD36, um transportador de membrana que facilita a entrada de AGs de cadeia longa na célula e aumenta a disponibilidade dos mesmos para a beta-oxidação mitocondrial, maximizando a capacidade oxidativa (57). Estes resultados explicam a esteatose microvesicular leve observada após o tratamento quando comparada à esteatose microvesicular expressiva nos hepatócitos dos animais HF não tratados.

O PPAR- γ , também expresso pelo fígado, é o principal regulador de genes envolvidos na lipogênese *de novo*, como SREBP-1c e FAS, e sua expressão é mais característica na esteatose hepática. Este estudo mostrou que o tratamento com o

agonista PPAR- β/δ GW0742 foi capaz de reduzir expressivamente os níveis de RNAm da SREBP-1c, reduzindo a atividade lipogênica (99, 100). Além do papel da SREBP-1c na lipogênese hepática, a FAS é uma enzima limitante no passo final da biossíntese de AGs. O aumento da expressão gênica da FAS no grupo HF possivelmente representa o aumento hepático de malonil-CoA, o que inibe a beta-oxidação de AGs, maximizando a esteatose hepática (101).

O aumento da expressão de SREBP-1c e FAS hepático também está relacionado com a regulação de GLUT2, que tem papel na liberação de glicose na corrente sangüínea, levando a resistência à insulina hepática (102). A glicotoxicidade resultante pode impulsionar o ERE, uma vez que as principais funções do RE (síntese de proteínas, modificações pós-tradução e dobramento, sinalização de cálcio e biossíntese de lipídios) usam a glicose como principal combustível e a resistência à ação da insulina compromete a absorção de glicose e a metabolização pela célula (92). Nós fornecemos novas evidências sobre esta via, como o restabelecimento da expressão de GLUT2 hepática e redução expressiva da lipogênese hepática com o conseqüente decréscimo da expressão de SREBP-1C e FAS no fígado após o tratamento com GW0742. Estes resultados corroboram com a normalização da tolerância à glicose e da ultraestrutura do RE, ambas sem diferenças com o grupo C após o tratamento.

Na tentativa de controlar o ERE e restabelecer a homeostase no RE, muitas cascatas de transdução de sinal são ativadas e desencadeiam um mecanismo chamado UPR. Um ramo da via UPR tem a fosforilação de eIF2 α como o efetor principal (92). Desta forma, o aumento da fosforilação de ERK 1/2 é um indicador importante de que o consumo da dieta HF é crônico, pois parece ser mais um sinal de deterioração da RI do que um fator desencadeante. Portanto, o aumento de p-ERK1/2 implica o estado de glicotoxicidade, o que maximiza a UPR. A diminuição da fosforilação de ERK1/2, devido ao tratamento com agonista do PPAR- β/δ , está ligada à homeostase da glicose melhorada e à redução da MC, uma vez que aumenta o gasto energético (103).

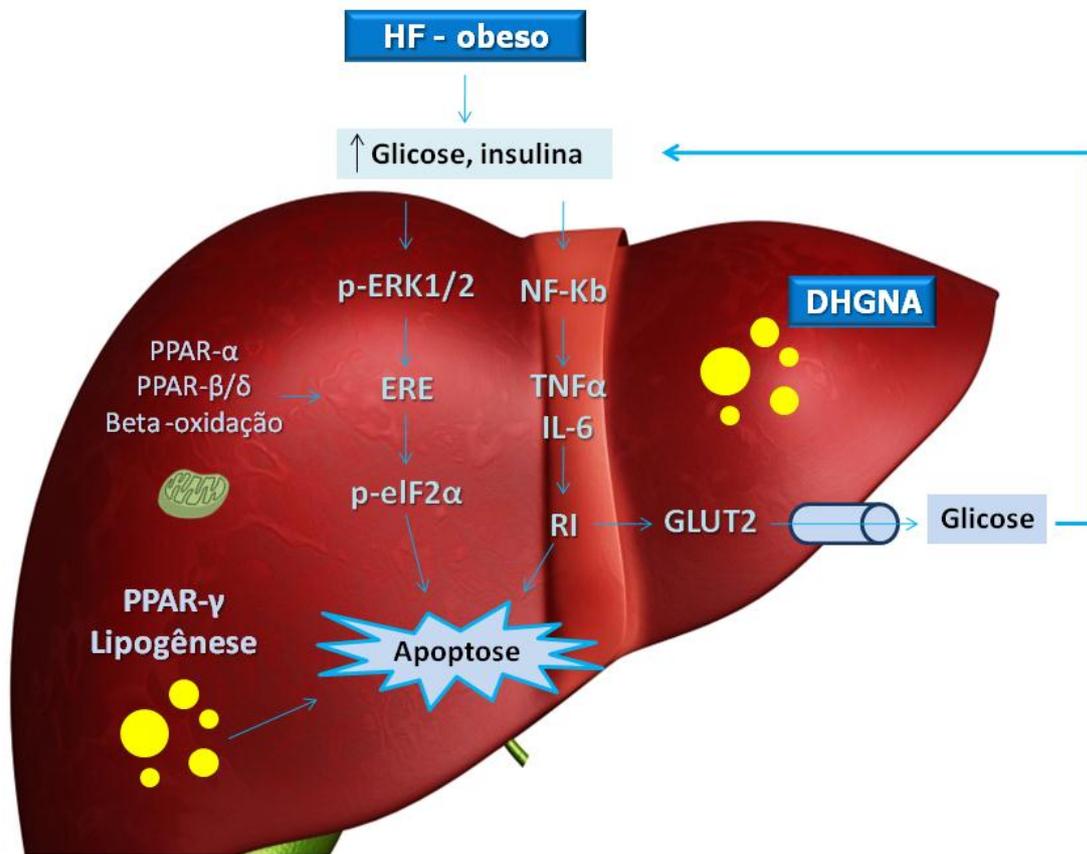
Nossos resultados mostraram que os fígados esteatóticos de animais HF exibiam a maior expressão p-ERK1/2, juntamente com a maior fosforilação da subunidade α da eIF2. Assim, as células reduzem a síntese de proteínas para tentar minimizar a carga de dobragem de proteínas na presença do ERE, uma vez que a p-eIF2 α também sinaliza a ativação de NF-kB (71, 92). A ativação de NF-kB no fígado

desencadeia a progressão de DHGNA para EHNA em animais alimentados com a dieta HF (104) e é considerada mais importante do que os efeitos de TNF- α para mediar a inflamação hepática (40).

Os genes alvo TNF- α e IL-6 estão mais relacionados ao comprometimento da sinalização da insulina, prejudicando a absorção de glicose e desencadeando a UPR (40, 92). Além disso, o TNF- α também está intimamente relacionado com a inibição da beta-oxidação, causando a glicolipototoxicidade, uma condição relacionada ao estímulo da apoptose (11, 105). Pode-se argumentar que, quando a ativação das vias UPR é persistente, o ERE desencadeia a morte celular pela lipoapoptose, que está relacionada à progressão para EHNA e à susceptibilidade aumentada do fígado a doenças mais nocivas (69, 106).

Entretanto, o GW0742 foi capaz de inibir a UPR e aliviar o ERE. O p-ERK 1/2 reduzido significa que a glicotoxicidade foi corrigida, o que corrobora a melhora da sensibilidade à insulina nos animais tratados. Junto com a expressão reduzida de p-ERK1/2, o resultado da reduzida expressão de p-eIF2 α corrobora com taxa de apoptose reduzida e a melhora na morfologia do RE revelada pela microscopia eletrônica. Propõe-se que a ativação do PPAR- β/δ desempenha um papel crucial nestes achados, uma vez que a melhora da beta-oxidação seguida da redução da lipogênese e da produção hepática de glicose (sustentada pela expressão de GLUT2 reduzida) interagem para resgatar o metabolismo energético hepático alterado, capaz de estressar a fisiologia do RE. Recentemente, foi demonstrado que a ativação isolada do PPAR- α não é capaz de recuperar o estresse RE, embora tenha contornado a esteatose hepática num modelo murino alimentado com excesso de frutose (107). Contudo, os resultados aqui apresentados sugerem que a modulação das três isoformas de PPARs (aumento da expressão das isoformas PPAR- α e PPAR- β/δ , paralelamente à redução da expressão de PPAR- γ) atenua a glicolipototoxicidade hepática e, portanto, os principais sinais que desencadeiam o ERE. As figuras 18 e 19 resumem os mecanismos envolvidos nos principais achados do presente estudo.

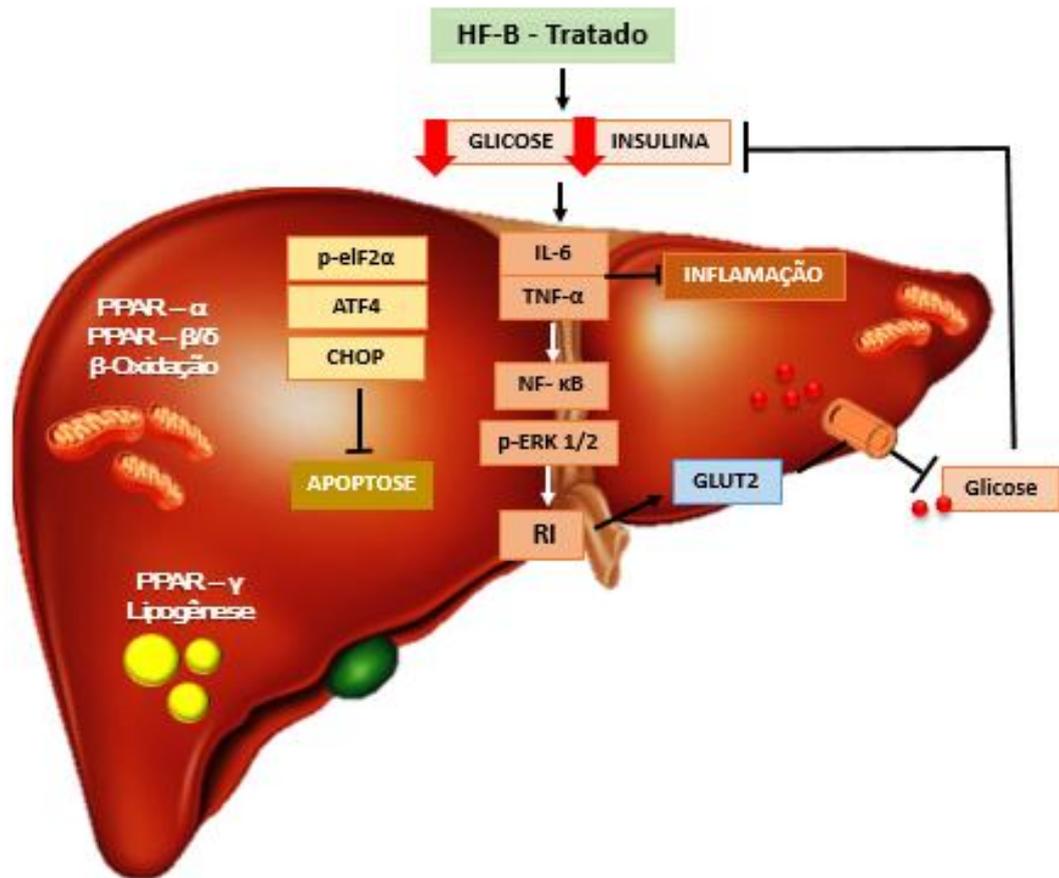
Figura 18 – Resumo gráfico das vias envolvidas com os principais efeitos da dieta HF na biologia molecular e ultraestrutura do fígado



Legenda: A obesidade induzida por dieta HF é seguida de hiperglicemia e resistência à insulina. Essas condições provocam estresse do retículo endoplasmático e inflamação hepática, que através da ativação da p-eIF2 α e do NF-kB (com transcrição de TNF- α e IL-6) conduzem à apoptose. A inflamação hepática agrava a resistência hepática à insulina, aumentando a produção hepática de glicose, que é liberada através do GLUT2. A obesidade também modificou a expressão de PPARs, favorecendo a lipogênese hepática sobre a beta-oxidação, o que contribui para uma maior deposição de gotículas lipídicas intra-hepáticas e desenvolvimento da DHGNA.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 19 – Resumo gráfico das vias envolvidas com os principais efeitos do tratamento com GW0742 em animais obesos na biologia molecular e ultraestrutura do fígado



Legenda: O tratamento com o agonista PPAR- β/δ GW0742 normalizou a massa corporal e a glicemia de jejum, revertendo a resistência à insulina. Essas condições inibiram a inflamação hepática e promoveram uma estrutura normal do retículo endoplasmático. A redução da expressão de NF- κ B e p-eIF2a inibiu a apoptose e exerceu efeitos antiinflamatórios no fígado, controlando a resistência hepática à insulina (com supressão da produção hepática de glicose). O GW0742 também provocou uma modulação benéfica das isoformas de PPAR, favorecendo a beta-oxidação sobre a lipogênese hepática e a consequente atenuação de DHGNA após o tratamento.

Fonte: A autora, 2018.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o tratamento com GW0742 (agonista PPAR- β/δ) minimizou os efeitos sobre os parâmetros metabólicos alterados após os animais serem submetidos à dieta hiperlipídica, sendo um importante coadjuvante em futuros tratamentos da obesidade. Após a administração de GW0742 ocorreu redução da massa corporal sem alterar a ingestão energética, diminuição do ERE e melhora da sensibilidade à insulina, maximizando o metabolismo energético hepático com favorecimento da beta-oxidação sobre a lipogênese. Além disso, o GW0742 pôde reduzir a expressão dos genes inflamatórios IL-6 e TNF- α , indicando controle da inflamação decorrente da obesidade. Pode-se argumentar que a modulação de PPAR é um importante mediador dos presentes achados e acreditamos que nosso estudo tem potencial translacional, uma vez que a ativação do PPAR- β/δ pode ser uma ferramenta importante para evitar a progressão da DHGNA e de outras comorbidades da obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Aasheim ET, Sovik TT. Global trends in body-mass index. *Lancet*. 2011;377(9781):1916-7; author reply 7-8.
2. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):193-200.
3. Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):27-35.
4. Seidel JC HJ. The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Ann Nutrition Metabolism*. 2015;66(2):7-12.
5. Gustafson B SU. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):27-35.
6. De Minicis S DC, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(29):5239-49.
7. Fan JG CH. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatology*. 2013;28(4):81-7.
8. Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition reviews*. 2014;65:57-63.
9. Saponaro C GM, Gastaldelli A. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: common pathophysiologic mechanisms. *Curr Diab Rep*. 2015;15(6):607.
10. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal*. 2007;274(3):630-58.
11. Umut Özcan; Qiong Cao EYA-HLNNIEÖ, Gürol Tuncman, Cem Görgun, Laurie H. Glimcher; Gökhan S. Hotamisligil. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*. 2004;306(15):457-61.
12. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(8):1012-9.
13. Peters JMHHEaGFJ. Role of peroxisome-proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) in gastrointestinal tract function and disease. *Clinical Science*. 2008;115(4):107-17.
14. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.

15. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28 Suppl 1:68-76.
16. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
17. Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. 2015;64(7):2361-8.
18. WHO. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. . 2000.
19. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
20. Brasil. *Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016*. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. p. 160.
21. Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2013;8(5):e64258.
22. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;402:86-94.
23. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *J Cell Physiol*. 2017;232(1):61-8.
24. Kirpich IA, Marsano LS, McClain CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*. 2015;48(13-14):923-30.
25. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
26. De Minicis S, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des*. 2013;19(29):5239-49.
27. Souza-Mello V, Gregorio BM, Relvas-Lucas B, da Silva Faria T, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Pancreas*. 2011;40(5):715-22.

28. Seghieri M, Trico D, Natali A. The impact of triglycerides on glucose tolerance: Lipotoxicity revisited. *Diabetes & metabolism*. 2017.
29. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 2008;7(2):95-6.
30. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(11):4387.
31. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1793-801.
32. Lernmark SERÅ. Hepatic Steatosis in Type 1 Diabetes The Review of DIABETIC STUDIES. 2012;8(4):454-67.
33. Regnell SE, Lernmark A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. The review of diabetic studies : RDS. 2011;8(4):454-67.
34. Lee YH WM. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Archives of Pharmacal Research*. 2004;27(4):361-70.
35. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341(4):248-57.
36. Gisele Castro MFCA, Lais Weissmanna, Paula G.F. Quaresma, Carlos K. Katashima,, Mario J.A. Saada POP. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open Bio*. 2013;11(3):443-9.
37. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1049-61.
38. Liu J, Zhuang ZJ, Bian DX, Ma XJ, Xun YH, Yang WJ, et al. Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41(7):482-8.
39. Liang H, Balas B, Tantiwong P, Dube J, Goodpaster BH, O'Doherty RM, et al. Whole body overexpression of PGC-1alpha has opposite effects on hepatic and muscle insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E945-54.
40. Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1663-74.
41. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and molecular hepatology*. 2013;19(3):210-5.

42. Liss KH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie*. 2017;136:65-74.
43. Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 2):S57-63.
44. Paniagua JA, Escandell-Morales JM, Gil-Contreras D, Berral de la Rosa FJ, Romero-Jimenez M, Gomez-Urbano A, et al. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. *Nutrition*. 2014;30(2):177-85.
45. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Seminars in liver disease*. 2008;28(4):386-95.
46. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(42):15539-48.
47. Simoes ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2017;95:93-9.
48. Detlef Schuppan JMS. Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Jornal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(1):68-76.
49. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lutjohann D, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008;48(2):474-86.
50. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):381-9.
51. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895-902.
52. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20314-26.
53. Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY, et al. Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem*. 2009;284(22):15071-83.
54. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11245-50.

55. Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008;582(1):68-73.
56. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 1999;274(42):30028-32.
57. Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V., Magliano, D'Angelo Carlo, Marinho, Aguila, Marcia Barbosa, Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. Singular effects of PPAR agonists on nonalcoholic fatty liver disease of diet-induced obese mice. Elsevier. 2015;127:73-81.
58. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(5):244-51.
59. Heeboll S, Poulsen MK, Ornstrup MJ, Kjaer TN, Pedersen SB, Nielsen S, et al. Circulating sCD36 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease and controls. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(2):262-7.
60. Schreurs M, Kuipers F, van der Leij FR. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2010;11(5):380-8.
61. Peeters A, Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Baes M. Hepatosteatosis in peroxisome deficient liver despite increased beta-oxidation capacity and impaired lipogenesis. *Biochimie.* 2011;93(10):1828-38.
62. Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(5):747-53.
63. Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Alegre F, Funes HA, Victor VM, Barrachina MD, et al. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *J Hepatol.* 2013;59(4):780-9.
64. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci.* 2014;137(1):26-35.
65. Salvado L, Barroso E, Gomez-Foix AM, Palomer X, Michalik L, Wahli W, et al. PPARbeta/delta prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia.* 2014;57(10):2126-35.
66. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015;7(8):1012-9.
67. Fan JG, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 4:81-7.

68. 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*. 2017;140:106-16.
69. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14(8):996-1007.
70. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res*. 2010;107(7):839-50.
71. Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, et al. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(22):4390-405.
72. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell*. 2008;15(6):829-40.
73. Galligan JJ, Smathers RL, Shearn CT, Fritz KS, Backos DS, Jiang H, et al. Oxidative Stress and the ER Stress Response in a Murine Model for Early-Stage Alcoholic Liver Disease. *J Toxicol*. 2012;2012:207594.
74. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000;405(6785):421-4.
75. Stienstra R, Duval C, Muller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*. 2007;2007:95974.
76. Lee JM, Kim SS, Cho YS. The Role of PPARgamma in Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinogenesis. *PPAR research*. 2012;2012:687570.
77. Shan W, Nicol CJ, Ito S, Bility MT, Kennett MJ, Ward JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice. *Hepatology*. 2008;47(1):225-35.
78. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):926-35.
79. Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;90(2):269-95.
80. Harrington WW, C SB, J GW, N OM, J GB, D CL, et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res*. 2007;2007:97125.

81. Salvado L, Serrano-Marco L, Barroso E, Palomer X, Vazquez-Carrera M. Targeting PPARbeta/delta for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(2):209-23.
82. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine*. 2015;50(2):355-67.
83. Di Paola R, Esposito E, Mazzone E, Paterniti I, Galuppo M, Cuzzocrea S. GW0742, a selective PPAR-beta/delta agonist, contributes to the resolution of inflammation after gut ischemia/reperfusion injury. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(2):291-301.
84. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(7):351-63.
85. Backes JM, Gibson CA, Ruisinger JF, Moriarty PM. Fibrates: what have we learned in the past 40 years? *Pharmacotherapy*. 2007;27(3):412-24.
86. Tenenbaum A, Fisman EZ. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovascular diabetology*. 2012;11:125.
87. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-61.
88. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
89. Takata Y, Liu J, Yin F, Collins AR, Lyon CJ, Lee CH, et al. PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(11):4277-82.
90. 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 Archiv : an international journal of pathology*. 2011;459(5):477-85.
91. Katz A NS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *Journal Clinical Endocrinol Metabolism*. 2000;85(7):2402-10.
92. Hummasti S HG. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation Research*. 2010;107(5):579-91.

93. He H, Yang D, Ma L, Luo Z, Ma S, Feng X, et al. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension*. 2010;55(4):869-79.
94. Souza-Mello V. Hepatic structural enhancement and insulin resistance amelioration due to AT1 receptor blockade. *World J Hepatol*. 2017;9(2):74-9.
95. Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lutjohann D, Kerksiek A, et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett*. 2010;584(5):1001-5.
96. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
97. Gerhard GS, Benotti P, Wood GC, Chu X, Argyropoulos G, Petrick A, et al. Identification of novel clinical factors associated with hepatic fat accumulation in extreme obesity. *Journal of obesity*. 2014;2014:368210.
98. Clemenz M, Frost N, Schupp M, Caron S, Foryst-Ludwig A, Bohm C, et al. Liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene regulation by the angiotensin type 1 receptor blocker telmisartan. *Diabetes*. 2008;57(5):1405-13.
99. 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)*. 2012;123(4):259-70.
100. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):1424-30.
101. Guoxun Chen GL, Jiafu Ou, Joseph L. Goldstein, Michael S. Brown. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc National Academy of Sciences of the USA*. 2004;101(31):11245-50.
102. Im SS, Kang SY, Kim SY, Kim HI, Kim JW, Kim KS, et al. Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes*. 2005;54(6):1684-91.
103. Jiao P, Feng B, Li Y, He Q, Xu H. Hepatic ERK activity plays a role in energy metabolism. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;375(1-2):157-66.
104. Larter CZ, Yeh MM, Haigh WG, Van Rooyen DM, Brooling J, Heydet D, et al. Dietary modification dampens liver inflammation and fibrosis in obesity-related fatty liver disease. *Obesity*. 2013;21(6):1189-99.

105. Ham JR, Lee HI, Choi RY, Sim MO, Seo KI, Lee MK. Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. *Food & function*. 2016;7(2):689-97.
106. Cazanave SC, Gores GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clinical lipidology*. 2010;5(1):71-85.
107. Chan SM, Sun RQ, Zeng XY, Choong ZH, Wang H, Watt MJ, et al. Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*. 2013;62(6):2095-105.

ANEXO A – Comitê de ética



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos singulares do PPAR- β/δ sobre o metabolismo energético e estresse do retículo endoplasmático hepático num modelo experimental de obesidade", registrada com o nº 53/2016, sob a responsabilidade de Vanessa de Souza Mello - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 29/11/2016.

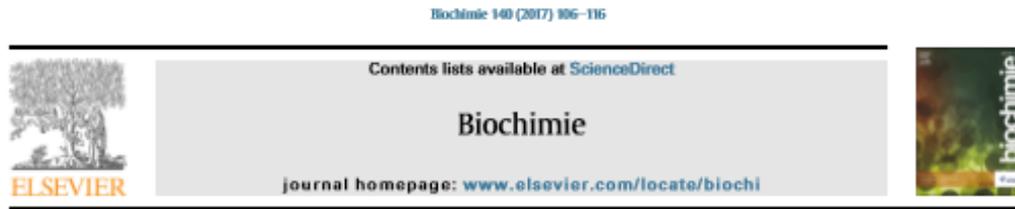
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/11/2020
Espécie/inhagem/raça	camundongos C57Bl/6
Nº de animais	40
Peso/idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 29 de Novembro de 2016.

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

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

ANEXO B – Artigo aceito



Research paper

Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR- α agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice



Flavia Maria Silva Veiga¹, Francielle Graus-Nunes¹, Tamiris Lima Rachid,
Aline Barcellos Barreto, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello*

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 April 2017
Accepted 30 July 2017
Available online 12 July 2017

Keywords:
NAFLD
Mitochondria
De novo lipogenesis
Gluconeogenesis
PPAR- α
Obesity

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) presents with growing prevalence worldwide, though its pharmacological treatment remains to be established. This study aimed to evaluate the effects of a PPAR- α agonist on liver tissue structure, ultrastructure, and metabolism, focusing on gene and protein expression of *de novo* lipogenesis and gluconeogenesis pathways, in diet-induced obese mice. Male C57BL/6 mice (three months old) received a control diet (C, 10% of lipids, $n = 10$) or a high-fat diet (HFD, 50% of lipids, $n = 10$) for ten weeks. These groups were subdivided to receive the treatment ($n = 5$ per group): C, C- α (PPAR- α agonist, 2.5 mg/kg/day mixed in the control diet), HFD and HFD- α group (PPAR- α agonist, 2.5 mg/kg/day mixed in the HFD). The effects were compared with biometrical, biochemical, molecular biology and transmission electron microscopy (TEM) analyses. HFD showed greater body mass (BM) and insulinemia than C, both of which were tackled by the treatment in the HFD- α group. Increased hepatic protein expression of glucose-6-phosphatase, CHREBP and gene expression of PEPCK in HFD points to increased gluconeogenesis. Treatment rescued these parameters in the HFD- α group, eliciting a reduced hepatic glucose output, confirmed by the smaller GLUT2 expression in HFD- α than in HFD. Conversely, favored *de novo* lipogenesis was found in the HFD group by the increased expression of PPAR- γ , and its target gene SREBP-1, FAS and GK when compared to C. The treatment yielded a marked reduction in the expression of all lipogenic factors. TEM analyses showed a greater numerical density of mitochondria per area of tissue in treated than in untreated groups, suggesting an increase in beta-oxidation and the consequent NAFLD control. PPAR- α activation reduced BM and treated insulin resistance (IR) and NAFLD by increasing the number of mitochondria and reducing hepatic gluconeogenesis and *de novo* lipogenesis protein and gene expressions in a murine obesity model.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBM). All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is the leading cause of morbidity and mortality in all groups and ages, in developed and underdeveloped countries [1]. In animal studies, the continued intake of a high-fat diet (HFD) causes

obesity, which is accompanied by a low-grade inflammation characterized by larger adipocytes with a proinflammatory adipokine release and insulin resistance (IR) [2,3]. HFD rich in saturated fatty acids is mainly related to decreased sensitivity to insulin, which is a paramount risk factor for liver abnormalities such as the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which has been extensively studied due to its harmful spectrum and silent evolution [4,5].

The liver presents with an integrative regulation of hepatic and lipid metabolism [6]. Insulin, at physiological levels, inhibits hepatic gluconeogenesis and reduces hepatic glucose production (HGP) [7]. Conversely, under an IR state, gluconeogenesis is stimulated, and the enhanced HGP intensifies IR, collaborating with

* Corresponding author. Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biológico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 ILS, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: souzamello.uesj@gmail.com (V. Souza-Mello).

URL: <http://www.lntrc.uerj.br>

¹ These authors collaborated equally for the manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.003>

0300-9084/© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBM). All rights reserved.

ANEXO C – Artigo submetido**Submission Confirmation**

1 mensagem

Molecular and Cellular Endocrinology <eesserver@eesmail.elsevier.com>21 de dezembro de
2017 12:09

Responder a: Molecular and Cellular Endocrinology <mce@elsevier.com>

Para: souzamello.uerj@gmail.com, v.souzamello@gmail.com

Dear Professor Vanessa Souza-Mello,

Your submission entitled "GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in diet-induced obese male mice" Research Paper has been received by Molecular and Cellular Endocrinology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/mce/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Molecular and Cellular Endocrinology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.