

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**Diabetes e obesidade ativam vias pró-inflamatórias
associadas com a progressão da Doença Hepática
Gordurosa Não Alcoólica: Estudo translacional**

Fábio Cangeri Di Naso

Porto Alegre – RS, 2013.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**Diabetes e obesidade ativam vias pró-inflamatórias
associadas com a progressão da Doença Hepática
Gordurosa Não Alcoólica: Estudo translacional**

*Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Anair Possa Marroni

Porto Alegre – RS, 2013.

Isto sabemos,
todas as coisas estão ligadas
como o sangue
que une uma família.
Tudo o que acontece com a Terra,
acontece com os filhos e filhas da Terra.
O homem não tece a teia da vida;
ele é apenas um fio.
Tudo o que faz à teia,
ele faz a si mesmo.

TED PERRY, inspirado no Chefe Seattle

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Juliana Saraiva Pereira, meu principal incentivo e exemplo de companheira, amiga e mulher, dedico este trabalho.

Ao meu pai e maior mestre, Basílio Di Naso, que, apesar de ter passado pouco tempo comigo, conseguiu me ensinar os valores essenciais da vida.

À minha mãe, Rosmary Cangeri Di Naso, e a meu irmão, Bruno Cangeri Di Naso, pelo carinho de terem sempre me ajudado e me incentivado a continuar batalhando.

Aos meus colegas de Laboratório de Hepatologia Experimental e do Laboratório Fisiologia Celular, sem o auxílio dos quais não teria iniciado nem finalizado esta pesquisa, agradeço muito pelo companheirismo e auxílio no decorrer do trabalho.

Aos meus mestres e amigos, Alexandre Simões Dias, Adriane Dal Bosco, Henrique Sarubi Fillmann e Paulo Ivo Homem de Bittencourt, que me ensinaram valores maiores do que a ciência e que, acreditando em mim, me ajudaram muito, agradeço os ensinamentos essenciais à minha formação.

À querida professora e orientadora, Norma Possa Marroni, muito obrigado pela oportunidade proporcionada. Agradeço os incentivos, as críticas e, acima de tudo, o carinho demonstrado por mim e pelos demais alunos.

LISTA DE ABREVIATURAS

α – alfa	GFAT - glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase
β – beta	GPx—enzima glutaciona peroxidase
γ – gama	GRd- enzima glutaciona redutase
μ L – microlitro	GSH – glutaciona reduzida
μ mol – micromolar	GSSG – glutaciona oxidada
ADA – <i>American Diabetes Association</i>	H ⁺ - íons hidrogênio
AGE – produtos finais de glicação avançada	H ₂ O – água
ALT - alanina aminotransferase	H ₂ O ₂ - peróxido de hidrogênio
AST - aspartato aminotransferase	HAS – hipertensão arterial sistêmica
° C – graus Celsius	HGT- hemoglicoteste
CAT – enzima catalase	HSP- Proteína de choque térmico
Cdc42 - ciclo de divisão celular 42	HSF – Fator de transcrição das proteínas de choque térmico
cm – centímetros	ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1
CO – controle	i.p. – intraperitoneal
CO+AG – controle +	IL- interleucina
COX-2 – Ciclo-oxigenase - 2	IMC – índice de massa corpórea
Aminoguanidina	iNOS- óxido nítrico sintase induzível
CML – n(carboximetil)lisina	IKK - inibidor do κ B cinase
CuZn-SOD – superóxido dismutase cobre-zinco	KCl- cloreto de potássio
DAG - diacilglicerol	KDa- kilodaltons
DM – <i>Diabetes mellitus</i>	K _m – constante de Michaelis
DM II - <i>Diabetes mellitus tipo II</i>	Kg- kilogramas
DNA – ácido desoxirribonucléico	LPO- lipoperoxidação
DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	MAP - proteína de ativação mitogênica
DP – desvio padrão	MAPK - proteína cinase de ativação mitogênica
EHNA – esteatohepatite não alcoólica	mg- miligramas
ERKs - cinase reguladora de sinal extracelular	nmol- nanomol
ERN- espécies reativas de oxigênio	Mn-SOD- enzima superóxido dismutase manganês
ERO – espécies reativas de oxigênio	Na ⁺ /K ⁺ ATPase – bomba sódio potássio ATPase dependente
EDTA – ácido etinodiaminotetracético	NaCl- cloreto de sódio
eNOS- óxido nítrico sintase endotelial	NAD- nicotinamida adenina dinucleotídeo
Fe – Ferro	NADPH- forma reduzida do nicotinamida adenina dinucleotídeo
g – gramas	NaHCO ₃ - bicarbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio
NF-κB – fator de transcrição nuclear kappa B
nm - nanômetro
NO – óxido nítrico
NO₂⁻ – nitritos
NO₃⁻ – nitratos
NOS – enzima óxido nítrico sintase
¹O₂ – oxigênio singlet
PGE₂ – prostaglandina E₂
PBS – tampão salina-sulfato
PMSF – fluoreto de fenil metilsulfonila
PKA – proteína cinase A
PKC – proteína cinase C
pmoles – picomoles
PLA₂ – fosfolipase A₂
RAGE – receptor dos produtos finais de glicação avançada
RE – retículo endoplasmático
ROOH – hidroperóxido alquil
rpm – rotações por minuto
SDS – solução de dodecil sulfato de sódio
SH - esteatohepatite
SOD – enzima superóxido dismutase
ST - esteatose
STZ – estreptozotocina

O⁻ - ânion radical superóxido
·OH – radical hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻ - peroxinitrito
OPT – optaldeído
PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio
TBARS – substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TBE – tris-ácidoclórico EDTA
t-BOOH – hidroperóxido de tert-butila
TCA – ácido tricloroacético
TE – tampão tris EDTA
TEMED – tertametil-etilclorodimida
TRIS – pó trisma, tampão de extração
TGF β - fator de crescimento transformante β
TNF-α – fator de necrose tumoral alfa
U/mL – unidade por milimolar
V- volts
VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1
VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO	12
1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1 Diabetes Mellitus.....	14
1.2 Obesidade	19
1.3 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	21
1.4 Diabetes Mellitus e estresse oxidativo.....	26
1.5 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	30
1.6 Vias de sinalização pró-inflamatórias ativadas na obesidade	35
1.7 Ativação da JNK e proteínas de choque térmico	39
2. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos	44
2.2.1 Artigo 1:	44
2.2.2 Artigo 2:	44
3- MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Artigo 1	46
3.1.1 Delineamento do estudo:	46
3.1.2 Animais e protocolo experimental	46
3.1.3 Preparo dos homogeneizados de fígado.....	47
3.1.4 Dosagem de proteínas	48
3.1.5 Medida das Substâncias que Reagem ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS)	48
3.1.6 Western blot	49
3.1.7 Análise Estatística	50
3.2 Artigo 2.....	51
3.2.1 Delineamento do estudo:	51
3.2.2 Pacientes.....	51
3.2.3 Estudo histológico	52
3.2.4 Detecção das HSPs através da imunofluorescência	53
3.2.5 Análises bioquímicas de estresse oxidativo	54
3.2.6 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	54
3.2.7 Western blot	55
3.2.8 Análise Estatística	56

4. RESULTADOS.....	57
4.1 Artigo 1.....	57
4.2 Artigo 2.....	62
5. DISCUSSÃO	97
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO I.....	124
ANEXO II.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos dos Produtos Finais da Glicação Avançada	16
Figura 2: Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO ⁴⁸	24
Figura 3: As principais vias de aumento na geração do anion radical superóxido estão relacionadas com as vias que levam as complicações crônicas do DM.....	27
Figura 4: Esquema da progressão da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	31
Figura 5: Fisiopatologia da da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica: ...	32
Figura 6: Aspectos pró-inflamatórios relacionados com a obesidade e resistência insulínica.	36
Figura 7: Obesidade e hiperlipidemia aumentam níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e ativam JNK nos hepatócitos.....	40
Figura 8: Expressão das proteínas de choque térmico (HSPs).....	41

RESUMO

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é uma doença de alta incidência e difícil diagnóstico relacionada principalmente com a obesidade e o diabetes. Pode se manifestar desde uma forma de esteatose simples progredindo para a esteatohepatite, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório e até mesmo para formas mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Apesar do envolvimento da obesidade e do diabetes no desenvolvimento da DHGNA, ainda não estão claros os fatores que contribuem para a progressão da doença.

O estudo experimental tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo e nitrosativo hepático em um modelo experimental de diabetes. O estudo clínico tem como objetivo avaliar marcadores de estresse oxidativo e o envolvimento das proteínas de choque térmico na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica.

Foi utilizado um modelo de diabetes experimental em ratos wistar (21) induzidos através de estreptozotocina. Foi avaliado o estresse oxidativo hepático através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o estresse nitrosativo hepático através da expressão da iNOS e nitrotirosina pelo método Western Blot. Também foi avaliada a expressão da p65 representando a ativação do NFκB hepático no modelo. No estudo em humanos, foram avaliados pacientes com obesidade grave (95) e diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica diagnosticada através de biópsia hepática no trans-operatório da cirurgia bariátrica. Os pacientes foram divididos nos grupos esteatose (ST), esteatohepatite (SH) e esteatohepatite + fibrose (SH+F) através de análise da biópsia por um patologista cegado. Foram avaliados marcadores metabólicos e antropométricos, assim como provas de função hepática. O estresse oxidativo sistêmico foi avaliado através do TBARS e atividade da SOD plasmática. A expressão das proteínas HSP70, HSF-1, JNK1, JNK2, p-JNK1 e p-JNK 2 foram avaliadas no fígado e tecido adiposo dos pacientes através do método Western Blot. A expressão e distribuição da HSF-

1 e HSP70 também foram avaliadas no tecido hepático através da imunofluorescência.

No modelo experimental de diabetes, foi observado um aumento da lipoperoxidação e da expressão da iNOS, nitrotirosina e p65 no fígado do grupo de animais diabéticos. No estudo clínico, foi observado um aumento significativo do estresse oxidativo sistêmico dos pacientes e na resistência insulínica do grupo SH e SH+F quando comparados ao grupo ST. A expressão da HSP70 e HSF-1 foi menor com a progressão da doença enquanto a ativação da JNK foi maior.

A obesidade e o diabetes promovem aumento do estresse oxidativo hepático e deprimem a via anti-inflamatória HSP70 contribuindo para a progressão da DHGNA.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a disease of high incidence and difficult diagnosis mainly related to obesity and diabetes. Can manifest from a form of simple steatosis to steatohepatitis, characterized by the presence of inflammatory infiltrate, and even more severe forms, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Despite the involvement of obesity and diabetes in the development of NAFLD, are still not clear the factors that contribute to disease progression.

The experimental study aims to evaluate the hepatic oxidative and nitrosative stress in an experimental model of diabetes. The clinical study aims to evaluate oxidative stress markers and the involvement of heat shock proteins in the progression of nonalcoholic fatty liver disease.

We used a model of experimental diabetes in Wistar rats (21) induced by streptozotocin. We evaluated the hepatic oxidative stress by measuring substances that react with thiobarbituric acid TBARS and nitrosative stress through the hepatic expression of iNOS and nitrotyrosine by western blot method. We also analyzed the expression of p65 representing NFkB activation. In the clinical study, was evaluated patients with severe obesity (95) and diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease diagnosed by liver biopsy obtained during bariatric surgery. Patients were divided into steatosis group (ST), steatohepatitis (SH) and steatohepatitis and fibrosis (SH + F) through analysis of biopsy by a blinded pathologist. Were evaluated metabolic markers, anthropometric data and liver function tests. The systemic oxidative stress was evaluated by TBARS and SOD activity in plasma. The expression of proteins HSP70, HSF-1, JNK1, JNK1, p-JNK1 and p-JNK2 were evaluated in the liver and adipose tissue of patients using the western blot method. The expression and distribution of HSF-1 and HSP70 were also assessed in the liver by immunofluorescence.

In experimental diabetes, we observed an increase in lipid peroxidation and expression of iNOS, nitrotyrosine and p65 in the liver of the group of diabetic animals. In the clinical study, there was a significant increase in

systemic oxidative stress of patients and insulin resistance in the group SH and SH + F when compared with ST. The expression of HSP70 and HSF-1 was lower with the progression of the disease while JNK activation was greater. Obesity and diabetes promote increased hepatic oxidative stress and depress the anti-inflammatory HSP70 pathway that contributes to the progression of NAFLD.

INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade aumenta de forma alarmante nos últimos anos no ocidente, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, estando relacionada principalmente ao estilo de vida sedentário e a hábitos alimentares inapropriados¹. No Brasil, o número de indivíduos obesos cresceu significativamente nos últimos anos. Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), quase metade da população adulta (48,1%) está acima do peso e 15% são obesos. Se for considerada somente a população masculina, mais da metade dos homens está acima do peso (52,1%). Entre as mulheres, a porcentagem de sobrepeso é de 44,3%. Associado a elevada prevalência de sobrepeso e obesidade, o coeficiente de prevalência padronizado de diabetes elevou-se de 2,9% em 1998 para 4,3% em 2009². Com isso, várias co-morbidades associadas à obesidade também têm apresentado aumento na sua incidência, dentre elas a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)^{3, 4}. A DHGNA é uma condição clínico-patológica que abrange a esteatose, a esteatohepatite e formas mais graves da doença hepática como cirrose e carcinoma hepatocelular⁵. A DHGNA compõe a síndrome metabólica, juntamente a hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, obesidade central, hiperglicemia e diminuição de lipoproteínas de alta densidade⁶⁻⁸. Obesidade, diabetes mellitus tipo II (DM II) e dislipidemia são as co-morbidades mais comumente associadas à DHGNA, doença que afeta qualquer faixa etária ou grupo racial. Em pacientes com DHGNA, a prevalência da obesidade relatada em vários estudos é de 30 a 100%, DM II de 10-75% e dislipidemia de 20 a 92%⁹. Pacientes obesos têm um aumento de 4,6 vezes na prevalência de DHGNA, quando comparados a indivíduos não obesos saudáveis. A resistência à insulina parece desempenhar um papel fundamental na patogênese destas condições, e por isso tem sido sugerido que a DHGNA (esteatose e esteato-hepatite) seja considerada como mais um critério no diagnóstico da síndrome metabólica⁸.

Apesar do envolvimento da obesidade e do diabetes no desenvolvimento da DHGNA, ainda não estão claros os fatores que contribuem para a progressão da doença. O tecido adiposo atuando como um sinalizador inflamatório e o estresse oxidativo atualmente aparecem como os principais responsáveis para a progressão da doença da esteatose hepática para a forma inflamatória da doença, a esteatohepatite¹⁰. No entanto, estes marcadores demonstraram evidência na progressão da doença em estudos experimentais e *in vitro*, e ainda possuem pouca validade clínica reconhecida.

Pesquisas translacionais pré-clínicas são frequentemente estabelecidas através do uso de modelos animais, culturas de tecidos, amostras de células humanas e animais ou através de sistemas experimentais tais como o estudo de moléculas biológicas, incluindo o DNA, RNA e as proteínas. O segundo domínio translacional reúne os resultados dos estudos básicos e os aplica na prática clínica, na tentativa de melhorar a saúde da população e facilitar a adoção das melhores práticas pela comunidade. Esta relação entre a pesquisa experimental e a pesquisa clínica é fundamental para que descobertas recentes já se tornem procedimentos aplicados, reduzindo o tempo destinado para que os primeiros benefícios para sociedade sejam estabelecidos. Portanto, a presente tese de defesa de doutorado tem o objetivo de analisar marcadores moleculares hepáticos em um modelo experimental de diabetes mellitus e em pacientes com DHGNA, além de relacionar estes marcadores com a progressão da doença.

1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas que apresenta uma característica em comum, a hiperglicemia. A hiperglicemia no diabetes ocorre devido a defeitos na secreção e na ação da insulina. Em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, urbanização, aumento da prevalência de obesidade e inatividade física cresce cada vez mais o número de diabéticos em todo o mundo ¹¹.

A classificação clássica do diabetes mellitus está fundamentada nos sinais clínicos apresentados pelos pacientes que são enquadrados, na maioria dos casos, em duas grandes categorias¹². O diabetes do tipo 1 (DM I) é caracterizado por uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição das células β -pancreáticas relacionada com múltiplas predisposições genéticas e fatores ambientais, ou de etiologias desconhecidas, denominada diabetes idiopática ¹³. O diabetes do tipo 2 (DM II) é causado por uma combinação de resistência periférica à insulina e uma resposta secretora inadequada das células β . Aproximadamente 80% a 90% apresentam diabetes do tipo 2 ¹⁴. A nova classificação do DM foi redefinida em publicação da *American Diabetes Association* (ADA) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2006. As últimas diretrizes nacionais e internacionais recomendam a classificação do DM em quatro categorias: DM tipo 1 (DM I), DM tipo 2 (DM II), Outros tipos e Diabete Gestacional¹⁵.

O DM não-controlado apresenta conseqüências agudas como a hiperglicemia com cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não-cetótica. Os sintomas característicos de hiperglicemia são poliúria, polidipsia, perda de peso corporal, muitas vezes com hiperfagia e visão turva. A hiperglicemia crônica pode acarretar em retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e neuropatia

autonômica ¹⁴. Adicionalmente, entre pacientes com diabetes há elevada incidência de aterosclerose, doença arterial periférica e doença cerebrovascular ¹⁵.

A atual pandemia de DM tem estimulado a realização de pesquisas para elucidar a intrincada fisiopatologia da doença, a fim de que haja melhora na detecção, na prevenção e no tratamento das complicações associadas. Existem quatro hipóteses principais que explicam como a hiperglicemia resulta nas complicações diabéticas. Estas hipóteses são o aumento da formação de produtos finais da glicação avançada (do inglês, *Advanced Glycated End-Products* AGEs), o aumento no fluxo da via dos polióis, a ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC) e o aumento no fluxo da via da hexosamina ¹⁶. A hiperglicemia também é a causa principal do aumento na geração do ânion radical superóxido e o estresse oxidativo é aceito como principal fator desencadeante no desenvolvimento das complicações crônicas do DM ¹⁶.

Apesar de complicações do DM apresentarem origem multifatorial, o processo bioquímico de glicação avançada é acelerado devido à hiperglicemia crônica e ao estresse oxidativo. A glicação avançada envolve a geração de um grupo heterogêneo de substâncias químicas conhecidas como produtos finais da glicação avançada (AGEs). A geração desses produtos resulta de reação não enzimática da glicose com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos ¹⁷. A maior parte dos AGEs *in vivo* são formados a partir de níveis elevados de intermediários reativos dos grupos carbonilas conhecidos como α -dicarbonilas ou oxoaldeídos. Uma das melhores caracterizações químicas dos AGEs em humanos inclui a pentosidina e a N(carboximetil)lisina (CML) ¹⁸. Os AGEs geralmente se acumulam no meio intracelular e ativam vias de sinalização celular ou modificam a função de proteínas (Figura 1). Seus efeitos no diabetes podem ser classificados como independentes ou dependentes de receptores, podendo atuar de maneira intracelular ou através de ligação com a superfície celular por intermédio de receptores, como o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) ¹⁹.

A glicação avançada ocorre após período prolongado e afeta proteínas de longa vida. Os componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo e, em particular, os componentes da membrana basal, como o colágeno do tipo IV, são os alvos principais. Outras proteínas de vida longa também são afetadas,

incluindo a mielina, a tubulina, o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e o fibrinogênio²⁰. As proteínas da matriz extracelular são suscetíveis a alterações dos AGEs, devido às suas baixas taxas de renovação¹⁸.

A formação de ligações inter e intramoleculares com o colágeno, resultantes do processo de glicação, leva a alterações estruturais. Pode ocorrer aumento de rigidez, aumento da resistência à digestão proteolítica, aumento de proteínas da matriz extracelular (incluindo a fibronectina, colágeno tipo III, IV e VI e laminina) e *up-regulation* de citocinas como o TGF- β ²¹⁻²³.

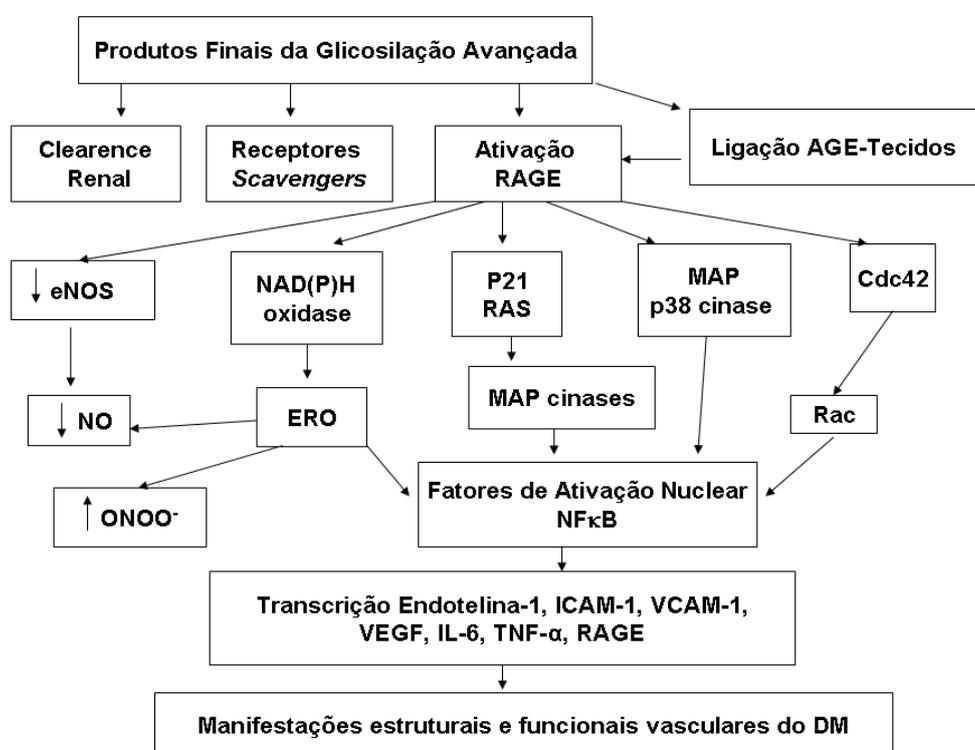


Figura 1: Efeitos dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada

Legenda: Cdc42 Ciclo de divisão celular 42, MAP proteína de ativação mitogênica, ERO espécies reativas de oxigênio, ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1, VCAM-1 molécula de adesão celular vascular-1, VEGF fator de crescimento do endotélio vascular, IL-6 interleucina-6, TNF- α fator de necrose tumoral- α , ONOO⁻-peroxinitrito, RAGE receptor dos produtos finais de glicação avançada, eNOS óxido nítrico sintase endotelial, NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida¹⁶.

Os efeitos receptor-dependentes dos AGEs são mediados via interação com diversas proteínas que se demonstram ligantes com essas estruturas complexas. O receptor mais estudado é o RAGE, no entanto, outras proteínas ligantes já foram estudadas. O receptor dos produtos finais de glicação

avançada (RAGE) é um membro da superfamília das imunoglobulinas da superfície celular. Ao interagir com seu receptor, os AGEs ativam a via de transdução de sinais secundários, como a proteína cinase C (PKC). O alvo chave da sinalização dos AGEs é o NF- κ B, que é translocado para o núcleo, ativa a transcrição de numerosas proteínas celulares, incluindo as moléculas de adesão celular-1 (ICAM-1), E-selectina, endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias²⁴⁻²⁶. A região promotora do receptor contém elementos de ligação funcional para o NF- κ B²⁷, e uma das consequências de sua translocação é a própria *up-regulation* do RAGE. Esse receptor pode ligar-se a outros peptídeos e proteínas não glicosilados, incluindo a isoforma S100 e a anfoterina, que é um ligante implicado na lesão progressiva vascular. Nas células endoteliais, a interação dos AGE-RAGE pode provocar distúrbios na função celular, além de vias envolvendo NAD(P)H oxidase, geradoras de espécies reativas de oxigênio, e proteína cinases de ativação mitogênica (MAPKs)²⁸.

O RAGE solúvel endógeno (sRAGE) é uma porção variante do receptor completo e é detetável no plasma. O sRAGE não possui o terminal COOH nem domínios transmembrana, pode competir com outros ligantes e prevenir sua interação com a superfície celular do receptor, bloqueando a sinalização celular. O potencial terapêutico do RAGE solúvel foi observado em modelos experimentais de nefropatia e aterosclerose em ratos diabéticos^{29,30}.

Em pacientes com diabetes do tipo 2, que não apresentam complicações micro ou macrovasculares, os níveis circulantes de sRAGE são significativamente menores do que em sujeitos sem a doença. Além disso, correlacionam-se inversamente com marcadores de estresse oxidativo. Esses achados sugerem que os níveis de sRAGE podem servir como biomarcador e protetor endógeno nas complicações decorrentes ao estresse oxidativo no DM e em outras doenças³¹.

Outra via importante induzida pelo aumento da concentração de glicose intracelular é a via dos polióis. Esta via apresenta a enzima aldose redutase como elemento chave em suas reações. A enzima possui baixa afinidade com glicose (alto Km), e concentrações normais de glicose representam baixa atividade desta via. A aldose redutase normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos na célula em alcoóis inativos, porém, quando a concentração

de glicose aumenta (como no diabetes), ela também reduz a molécula a sorbitol, que posteriormente é oxidado à frutose. Neste processo, a enzima aldose redutase consome o cofator NADPH, que é essencial no processo de regeneração do antioxidante glutathiona reduzida. Por reduzir a quantidade de antioxidante intracelular, a via dos polióis aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo. Além de o aumento no fluxo desta via contribuir para redução das defesas antioxidantes celulares, outras alterações na homeostase celular são resultantes do acúmulo de sorbitol, incluem o estresse osmótico, pelo fato de sorbitol apresentar baixa difusibilidade e redução na atividade da bomba ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase. Estudos experimentais demonstraram redução na disfunção da condução nervosa periférica de cães diabéticos, quando tratados com inibidores da aldose redutase ³².

A hiperglicemia também aumenta a síntese de diacilglicerol (DAG) no meio intracelular, o que contribui na ativação crítica de cofatores para a forma clássica da PKC (α , β e γ). Esse aumento pode resultar da hidrólise de fosfatidilinosítídeos, do metabolismo da fosfatidilcolina através da fosfolipase-C ou da síntese *de novo* de DAG, a partir de intermediários glicolíticos. Quando a PKC é ativada pela hiperglicemia ocorre uma variedade de efeitos na expressão de genes ³³. Na ativação da PKC, a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é diminuída, enquanto as expressões da endotelina-1, TGF- β e PAI-1 aumentam, representando alterações no fluxo sanguíneo. O tratamento com um inibidor específico para PKC β reduziu significativamente sua ativação na retina e no glomérulo renal de animais diabéticos, e isso ocasionou melhoras funcionais nessas estruturas ³⁴.

1.2 Obesidade

A epidemia de obesidade é uma indesejada consequência dos avanços econômicos, sociais e tecnológicos conquistados durante as últimas décadas. O fornecimento de alimentos de baixo custo, abundantes e palatáveis resulta em um consumo diário com alta densidade calórica. Além disso, os avanços tecnológicos reduziram em muito a quantidade de atividade física e o gasto energético nas atividades de vida diária ¹.

As contribuições dos fatores genéticos e ambientais para a etiologia da obesidade têm sido avaliadas em vários estudos ³⁵. Os estudos apresentam que de 30% a 40% da variância no índice de massa corpórea (IMC) pode ser atribuída à genética e 60% de 70% ao meio ambiente. A interação entre genética e ambiente também é importante ³⁶. Em uma dada população, algumas pessoas são geneticamente predispostas a desenvolver obesidade, mas este genótipo pode ser expresso apenas em condições ambientais com dietas ricas em gordura e sedentarismo. Nos Estados Unidos, bem como em outros países ocidentais, um maior número de pessoas são expostos a estas condições ambientais e, conseqüentemente, a porcentagem de pessoas expressando o genótipo da obesidade aumenta ³⁵.

No Brasil, o número de indivíduos obesos cresceu significativamente nos últimos anos. Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), quase metade da população adulta (48,1%) está acima do peso e 15% são obesos. Se for considerada somente a população masculina, mais da metade dos homens está acima do peso (52,1%). Entre as mulheres, a porcentagem de sobrepeso é de 44,3%. Associado a elevada prevalência de sobrepeso e obesidade, o coeficiente de prevalência padronizado de diabetes elevou-se de 2,9% em 1998 para 4,3% em 2009 ².

A prevalência padronizada por gênero e idade de diabetes, tendo como

referência a população mundial de 2010 e as projeções para 2030 em diversos países do mundo, entre eles o Brasil indicam que entre 2010 e 2030, haverá um aumento de 69,0% no número de adultos, na faixa etária de 20-79 anos, com diabetes nos países em desenvolvimento; e um aumento de 20,0% nos países desenvolvidos. Em 2010, a prevalência estimada de diabetes, padronizada por gênero e idade e tendo como referência a população mundial, foi de 6,4% no Brasil. Essa prevalência foi menor do que aquela estimada para os Estados Unidos da América (10,3%), o Canadá (9,2%) e o México (10,8%); contudo, foi superior à estimada para o Japão (5,0%), a Argentina (5,7%) e o Chile (5,7%)³⁷.

O rápido aumento da prevalência da obesidade é um problema de saúde global. Suas complicações resultam em um aumento do risco de morte de 20% a 40% em indivíduos com excesso de peso, e de 2 a 3 vezes em indivíduos obesos em comparação com indivíduos sem sobrepeso, mesmo que a força de associação entre o índice de massa corporal e eventos de insuficiência cardíaca diminui com a idade³⁸.

A obesidade é um conhecido fator de risco para a Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica (esteatose hepática)⁸, hipertensão, acidente vascular cerebral, doença da vesícula biliar, osteoartrite, apnéia obstrutiva do sono e outros problemas respiratórios, bem como algumas formas de câncer (mama, colorretal, endometrial e rim). O Diabetes e a obesidade estão interligados, a obesidade é conhecida por exacerbar o diabetes tipo 2 e mais de 60% dos diabéticos são obesos³⁹. Estes dados justificam a realização de estudos com indução do diabetes experimental que relacionem o modelo com a doença em humanos.

1.3 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Para que o metabolismo celular ocorra, faz-se necessário o uso de energia derivada da oxidação dos nutrientes, a qual é dirigida para a formação de compostos fosfatados de alta energia, dentre os quais o mais importante é o adenosina trifosfato (ATP). Para a realização de exercícios, a energia é fornecida quimicamente pela hidrólise da molécula de ATP. As espécies reativas de oxigênio (ERO) formam-se principalmente durante a redução dessa molécula em água na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial⁴⁰.

Nas membranas mitocondriais, estão situadas as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio em água durante o processo da respiração celular. Essa redução requer quatro sucessivas transferências de um elétron cada uma. A teoria foi proposta por Michaelis (1946) e denominada de redução univalente. Dois dos intermediários das reações são chamados de radicais livres, sendo eles: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet})^{41, 42}.

A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) recebe quatro elétrons de uma só vez, pelo sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO)⁴³.

O termo radical livre (RL) é usado quando uma espécie química, que pode ser um átomo como o hidrogênio ou o cloro, um metal de transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital⁴⁴.

O elétron não pareado neste orbital confere alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para este orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Quantidades aumentadas de

metabólitos oxidados dessas moléculas têm sido detectadas em pacientes com variedade significativa de doenças ⁴⁵.

Quando um RL reage com um composto não radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais se consome uma espécie intermediária, os reativos se convertem em produtos, e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece. São etapas do processo de LPO : iniciação, propagação e terminação ⁴⁶.

A iniciação é o primeiro passo das reações em cadeia, é necessário que o RL ataque uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Na LPO, o RL é geralmente o radical hidroxila, e o grupamento químico é um metileno pertencente a um ácido graxo poliinsaturado da membrana ⁴⁷.

A retirada de um átomo de hidrogênio do grupamento metileno leva à formação de um radical centrado no carbono (-•CH-), o qual tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Este, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz o radical peroxil. .

No estágio de propagação, os radicais peroxil são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, ou seja, de um ácido graxo adjacente. O radical peroxil pode também se combinar com o átomo de hidrogênio que ele abstraiu, produzindo um lipídio hidroperóxido. Os lipídios hidroperóxidos se decompõem em reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído, hidrocarbonetos voláteis (como o gás pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente ⁴². Sugeriu-se que as reações de degradação que ocorrem durante a LPO podem originar oxigênio singlet, acelerando esse processo ⁴².

Na etapa de terminação, dois radicais peroxil reagiriam entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet (¹O₂) e carbonilas excitadas, que retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível.

Além da perda da fluidez da membrana há também desarranjo dos receptores e potenciação da lise celular. O dano dos RL a enzimas que contêm

enxofre e outras proteínas culmina em sua inativação, ligações cruzadas e desnaturação ⁴⁸.

As ERO, quando formadas, ao reagirem com biomoléculas, causam diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular. Os organismos aeróbios desenvolveram diferentes tipos de defesas antioxidantes - enzimáticas e não enzimáticas - prevenindo a formação de ERO, bem como, mecanismos para reparar os danos causados pelos mesmos.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato - enzimático ou não enzimático ⁴².

A defesa do organismo contra as ERO atua na prevenção da formação delas, na interceptação dos radicais formados e no reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe e Cu), os quelantes. A presença de proteínas quelantes é de vital importância aos seres vivos, pois previnem as células dos processos oxidativos catalisados por íons metálicos. Pigmentos especializados previnem a ação da radiação ultravioleta: a melanina e os carotenoides impedem a ação do oxigênio *singlet*. As enzimas que controlam os níveis de ERO são a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Figura 2) . A interceptação é a desativação das ERO, quando elas são destruídas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A desativação final de um composto radical consiste na formação de um outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, as quais reagirão com RL iniciais, tais como radicais peroxil (ROO•) e, posteriormente, interagir com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração. Estes transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial, são chamados “**scavengers**” de RL. A combinação de uma substância com um RL leva à formação de um não radical ou um radical menos lesivo, como, por exemplo, tocoferóis e carotenóides. Substâncias que funcionam como “**quenchers**” de oxigênio singlet são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam em forma de calor ou movimento.

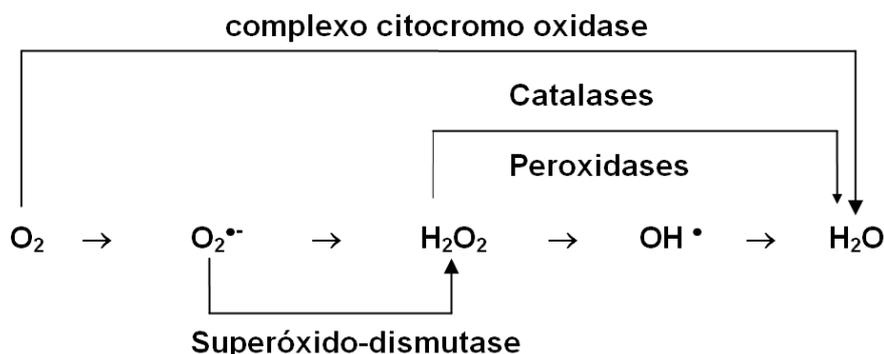


Figura 2: Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO ⁴⁹.

A mais importante reação envolvendo o superóxido, a qual ocorre espontaneamente, é sua própria dismutação para H₂O₂ e O₂ ⁴⁹. Entretanto, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), a dismutação do superóxido pode ser aumentada intracelularmente em 10⁴ vezes ⁵⁰. Existem várias formas de SOD. Uma, contendo manganês, é encontrada na matriz mitocondrial (Mn-SOD), e outra, contendo cobre e zinco, é encontrada no citosol (CuZn-SOD). Uma superóxido dismutase, contendo ferro, existe em algumas bactérias e plantas. Tem sido sugerido que os três diferentes tipos da enzima SOD apresentam papel fisiológico diferente.

A enzima CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A maioria das CAT possui um grupo heme (Fe³⁺-protoporfirina) e ligado a cada subunidade uma molécula de NADPH, que auxilia na estabilização da enzima.

A enzima GPx é uma peroxidase que utiliza doadores de e⁻ para reduzir o peróxido de hidrogênio em água. A mais importante peroxidase é a glutathione peroxidase que utiliza selênio (Se) no sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione (γ-glutamil-cisteil-glicina) (Glu-Cys-Gly) (GSH) como doador de elétron para a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, tais como os lipoperóxidos provenientes da LPO, impedindo, assim, a fase de propagação deste processo.

Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH. Em células normais, ocorre a presença de enzimas acessórias. A glutathione

redutase (GR) utiliza elétrons do NADPH para a redução de pontes dissulfeto da GSSG e reestabelece os níveis intracelulares de GSH ⁵¹.

A distribuição das enzimas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de ERO e elas estão em maior quantidade em locais particularmente expostos as ERO, como nos compartimentos celulares ou no líquido extracelular ⁴².

1.4 Diabetes Mellitus e estresse oxidativo

A hiperglicemia também ativa um mecanismo comum às quatro vias patogênicas anteriormente descritas que é o aumento na produção do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O estresse oxidativo é aceito como fator chave na mediação do desenvolvimento e progressão do diabetes e de suas complicações (Figura 3) ⁵²⁻⁵⁶. A mitocôndria é a principal fonte de ERO da célula que são gerados a partir de um pareamento imperfeito no transporte de elétrons ⁵⁷. O piruvato derivado da glicólise é transportado para o interior da mitocôndria onde é oxidado nas reações existentes no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Os elétrons que derivam da oxidação de substratos são transportados por carreadores redox da cadeia respiratória (complexos I, III e IV) para o acceptor final de elétrons, o oxigênio molecular. O oxigênio é convertido em água a partir da redução tetravalente. No entanto, durante o metabolismo normal, formas reativas de oxigênio incompletas são produzidas, como o superóxido. Normalmente, 0,1% do consumo total de oxigênio gera as ERO e o fator primordial para este desvio é o estado redox da cadeia respiratória ⁵⁸. A hiperglicemia induz aumento nos doadores de elétrons (NADH e FADH₂) aumentando o fluxo de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial. Consequentemente, ocorre um aumento na relação ATP/ADP e uma hiperpolarização no potencial de membrana mitocondrial. Esta alta diferença de potencial eletroquímico gerada pelo gradiente de prótons leva a uma inibição parcial no complexo III do transporte de elétrons, resultando no acúmulo de elétrons na coenzima Q. Isto levaria a uma redução parcial de O₂ e a geração do radical livre superóxido ⁵⁹.

O aumento das espécies reativas de oxigênio pode ser prevenido por um inibidor do complexo II da cadeia de transporte de elétrons e pela enzima manganês superóxido dismutase ⁶⁰. A normalização dos níveis de espécies reativas de oxigênio pela ação destes dois agentes previne a ativação induzida

pela glicose da PKC, a formação de AGEs, o acúmulo de sorbitol e a ativação de NFκB em células endoteliais aórticas bovinas expostas à hiperglicemia⁶⁰.

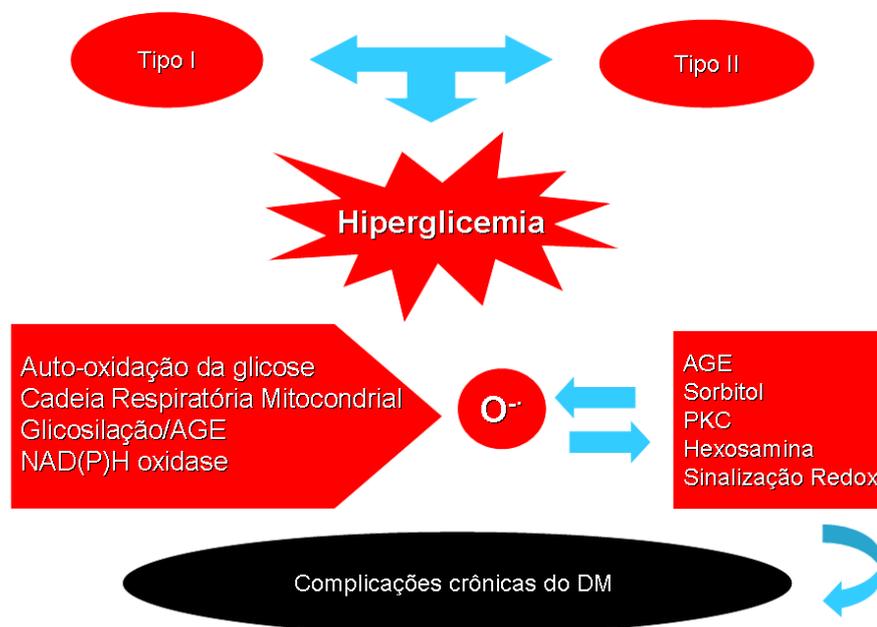


Figura 3: Independente do tipo do DM, a hiperglicemia é a principal via patogênica. As principais vias de aumento na geração do anion radical superóxido estão relacionadas com as vias que levam as complicações crônicas do DM. AGE: Produtos Finais de Glicação Avançada, PKC: Proteína cinase C.

A utilização de antioxidantes exógenos pode ser uma alternativa na terapêutica do DM. Estudos experimentais demonstram resultados favoráveis de melhora na atividade de enzimas antioxidantes e na redução do estresse oxidativo hepático após a utilização de antioxidantes⁶¹⁻⁶³. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou as alterações hepáticas em um modelo experimental de DM e o envolvimento de vias de transcrição nuclear redox-dependentes, como o fator de transcrição nuclear NF-κB. A hiperglicemia crônica estabelecida pelo modelo resultou na ativação do NF-κB, aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e lipoperoxidação no fígado⁶². A hiperglicemia estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é acompanhada pelo aumento da geração de NO. O NO reage com o $O_2^{\cdot-}$, formando o potente oxidante peroxinitrito, aumentando assim a peroxidação dos lipídios, alterando o metabolismo das

proteínas, a oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL) e afetando as vias de sinalização e transdução celular⁶⁴

Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa foi avaliado o potencial antioxidante do extrato aquoso de *Agaricus blazei* Murril, também conhecido como “cogumelo do sol”. O estudo avaliou o potencial *in vitro* do extrato e também a utilização como tratamento em um modelo crônico de DM induzido por estreptozotocina. Este estudo demonstrou que o *Agaricus blazei*, por possuir um efeito antioxidante, reduz o dano tecidual pulmonar dos ratos diabéticos e melhora os parâmetros metabólicos lipêmicos⁶⁵. Em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, avaliamos o estresse oxidativo hepático em um modelo de diabetes experimental crônico induzido por estreptozotocina. Neste estudo, ficou evidenciado um aumento significativo da expressão hepática da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear NFκB e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos animais diabéticos, além do estresse oxidativo no fígado gerado por um período de hiperglicemia crônica⁶⁶.

iNOS, IL-6 e TNF-α são fortemente estimulados pelo Fator Nuclear κB (NF-κB)⁶⁷, um fator de transcrição originalmente descoberto em linfócitos B, essencial para diversas sinalizações da resposta inflamatória, função imune, ativação de células endoteliais e controle do crescimento celular⁶⁸. O NF-κB é normalmente localizado no citoplasma ligado a uma proteína inibitória da família IκB. Uma variedade de estímulos inflamatórios podem utilizar um caminho de sinalização específica, capaz de desligar os IκB do fator κB, através da fosforilação dos IκB por enzimas na família das IκB cinases (IKK), induzindo sua degradação. Desta forma, o NF-κB é liberado, possibilitando sua translocação ao núcleo e consequente ligação ao DNA, onde é efetivamente responsável pela expressão de genes inflamatórios⁶⁹. Os genes alvo incluem os da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), da óxido-nítrico sintase induzível (iNOS), de diversas citocinas inflamatórias e quimiotáticas, receptores de citocinas, moléculas de adesão celular, assim como genes virais⁶⁹. O NF-κB é ativado pelo complexo IKK, responsável por fosforilar IκBα (inibidor do NF-κB), induzindo sua degradação. IKK e NF-κB, estão diretamente envolvidos na inativação do receptor de insulina, sendo a obesidade um fator positivamente correlacionado, onde no fígado de diferentes modelos animais de obesidade

tais como HFD, camundongos *ob/ob* ou ratos *fa/fa*, a atividade do IKK- β e NF- κ B está aumentada ⁷⁰.

Estes estudos experimentais corroboram a hipótese de que o diabetes possui um efeito lesivo no fígado e a hiperglicemia crônica pode contribuir para a progressão inflamatória da DHGNA em pacientes.

1.5 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende um amplo espectro de lesões hepáticas que vão desde simples esteatose, evoluindo para esteatohepatite (ou esteatohepatite não alcoólica- EHNA), até um quadro de fibrose avançada e cirrose (Figura 4) ⁷¹. Este quadro lembra a injúria hepática induzida pelo álcool, no entanto ocorre em pacientes sem história de abuso desta substância. As implicações clínicas da DHGNA têm repercussão devido a sua prevalência cada vez maior na população geral. A DHGNA deve ser diferenciada de esteatose com ou sem hepatite de causa secundária, uma vez que elas têm patogênese e prognóstico distintos ⁷².

A prevalência da DHGNA varia de 10 a 51%, dependendo da população estudada e da metodologia utilizada (séries clínicas de imagens, ou autópsia estudos e rastreamento na população geral) com um consenso de 20-30% para os países Ocidentais ^{10, 73}. Estudos que têm contado com alteração nos marcadores séricos da função hepática para determinar a prevalência de NAFLD ⁷⁴ apresentam números mais baixos do que os estudos mais recentes que utilizaram ultra-som ou ressonância magnética para diagnosticar esteatose hepática ⁷⁵. Com base em estimativas, a prevalência de EHNA na população em geral de Países ocidentais é cerca de 2 a 3% ⁷³. Muito pouca informação está disponível sobre a incidência de DHGNA, no entanto, os resultados de 10 anos de acompanhamento de uma coorte de indivíduos mostraram que 20% deles apresentaram esteatose hepática, correspondendo a uma incidência de 2% ao ano ⁷⁶.

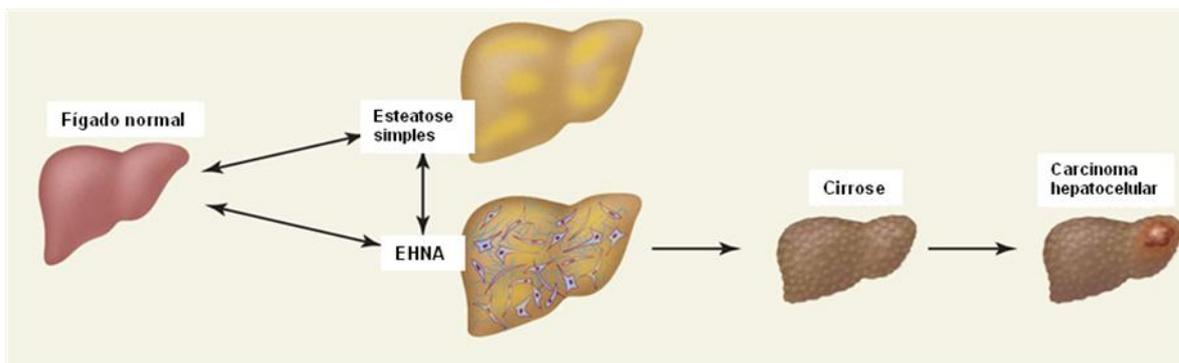


Figura 4: Esquema da progressão da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Ângulo, 2002⁷².

A DHGNA pode compor a síndrome metabólica, juntamente a hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, obesidade central, hiperglicemia e diminuição de lipoproteínas de alta densidade⁶⁻⁸. Obesidade, diabetes mellitus tipo II (DM II) e dislipidemia são as co-morbidades mais comumente associadas à DHGNA, doença que afeta qualquer faixa etária ou grupo racial. Em pacientes com DHGNA, a prevalência da obesidade relatada em várias séries é de 30 a 100%, DM II de 10-75% e dislipidemia de 20 a 92%⁹. Pacientes obesos têm um aumento de 4,6 vezes na prevalência de DHGNA, quando comparados a indivíduos não obesos saudáveis. Pacientes diabéticos tipo II, independentemente do índice de massa corporal (IMC), têm aumento significativo na prevalência e gravidade da DHGNA. Metade dos pacientes dislipidêmicos apresentaram sinais compatíveis com DHGNA em um estudo no qual avaliação por ultrassom abdominal foi utilizada⁷⁷.

A patogênese da DHGNA é pouco conhecida e a razão pela qual alguns pacientes desenvolvem somente esteatose, enquanto outros evoluem para esteatohepatite, fibrose e posteriormente para cirrose hepática, não está completamente esclarecida. As razões para diferentes desfechos da mesma doença parecem sofrer influência de fatores agravantes, como idade avançada, IMC e presença de DM II, além de diferenças na distribuição de gordura ou nos sistemas oxidativos influenciados pela predisposição genética⁷⁸. O surgimento da DHGNA decorre da retenção de lipídios dentro dos hepatócitos, principalmente na forma de triglicérides. Pacientes com DHGNA apresentam

níveis aumentados de ácidos graxos circulantes, este aumento está associado ao aumento dos níveis séricos de glicose e triglicérides ⁷⁹. Estes ácidos graxos livres, além de substrato para a síntese de triglicérides pelos hepatócitos são também fonte de energia para outros tecidos, diminuindo, a demanda por energia ao fígado, produzindo um balanço positivo e levando ao acúmulo de triglicérides. Diferentemente do glicogênio, que possui um limite de acúmulo, triglicérides se acumulam em gotas que podem aumentar em tamanho e ocupar grande parte do citoplasma do hepatócito ⁸⁰. A resistência à insulina leva ao acúmulo de gordura nos hepatócitos em consequência de lipólise e hiperinsulinemia ^{81, 82}. Este aumento nos níveis intra-hepáticos de ácidos graxos é fonte de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, mediados pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e endotoxinas. A peroxidação lipídica está associada à ativação das células hepáticas estreladas e à síntese do colágeno tipo I, presente no tecido fibrótico hepático ^{83, 84}.

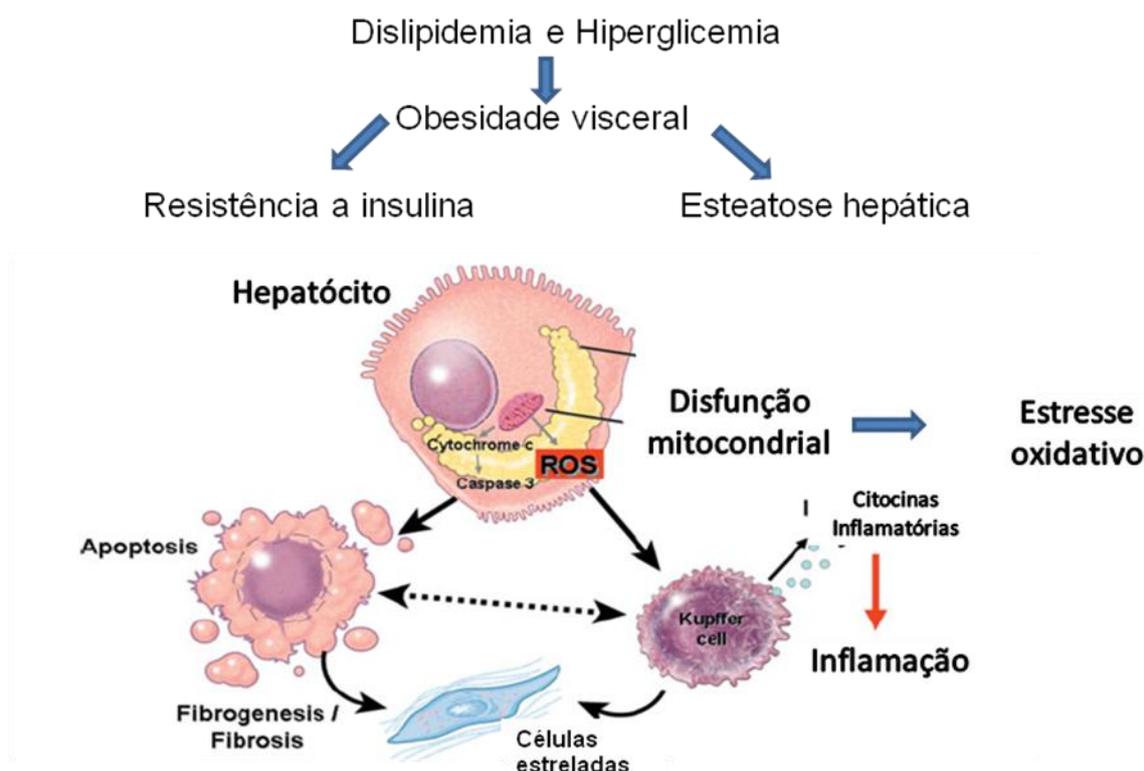


Figura 5: Fisiopatologia da da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica: Adipócitos podem atuar como sinalizadores imunológicos resultando em um estado de infamação crônica e na progressão da DHGNA com inflamação e fibrose. Adaptado de Grattagliano, 2008⁸⁵.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou as alterações hepáticas em um modelo experimental de DM e o envolvimento de vias de transcrição nuclear redox-dependentes, como o fator de transcrição nuclear NF- κ B. A hiperglicemia crônica estabelecida pelo modelo resultou na ativação do NF- κ B, aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e lipoperoxidação no fígado ⁶².

O tecido adiposo parece contribuir para a doença hepática, como depósito de triglicérides e ácidos graxos livres, liberados em resposta à demanda energética. Também age como um órgão regulador do equilíbrio energético e como um órgão endócrino, secretando inúmeras adipocinas biologicamente ativas, como adiposina, adiponectina, leptina, fator inibidor do ativador do plasminogênio 1, resistina e TNF- α . Estas adipocinas estão envolvidas na gênese e evolução da DHGNA, destacando-se a adiponectina e a leptina ⁸⁶.

A maior parte dos pacientes com DHGNA não apresentam sintomas ou sinais clínicos de doença hepática no diagnóstico inicial, porém alguns pacientes podem referir queixas inespecíficas de fadiga, mal-estar e sensação de plenitude ou desconforto no abdômen superior direito. Hepatomegalia é o único sinal ao exame físico em muitos pacientes. A presença de estigmas de doença hepática crônica e diminuição do número de plaquetas sugerem doença avançada com cirrose estabelecida. Uma grande proporção de pacientes com diagnóstico de cirrose criptogênica no passado apresentava vários sinais clínicos e características demográficas, sugerindo DHGNA como provável causa da cirrose ⁸⁷.

A anormalidade laboratorial mais comumente encontrada na DHGNA é a elevação discreta a moderada de alanina aminotransferase (ALT) e/ou aspartato aminotransferase (AST) sérica, sendo o aumento da ALT até 3 vezes o valor de referência. A relação AST/ALT é geralmente menor que 1, aumentando proporcionalmente com o aumento da fibrose hepática, até a fase de cirrose quando esta relação perde sua eficácia diagnóstica. Fosfatase alcalina e/ou gamaglutamil transpeptidase (GGT) estão acima do limite normal em muitos pacientes, não sendo, porém, tão elevadas quanto na hepatite alcoólica ⁸⁸.

A DHGNA é histologicamente indistinguível da doença hepática causada pelo álcool. A biópsia hepática pode mostrar alterações como esteatose, infiltração inflamatória celular mista, balonização de hepatócitos, necrose, núcleo de glicogênio, corpúsculos hialinos de Mallory e fibrose. A esteatose apresenta-se, predominantemente, como gordura macrovesicular e, quando discreta, está tipicamente concentrada na zona acinar três, sendo de distribuição difusa quando moderada ou grave. O infiltrado inflamatório usualmente consiste de neutrófilos e linfócitos, predominando na zona três. A balonização é resultante do acúmulo intracelular de fluidos, levando a edema celular. Corpúsculos hialinos de Mallory são encontrados nos hepatócitos balonizados da zona três, não sendo este achado específico de DHGNA. A presença de fibrose na DHGNA sugere doença mais avançada com dano hepático grave. Uma revisão de vários estudos, compreendendo um total de 673 biópsias hepáticas, mostrou que até 66% dos pacientes no momento do diagnóstico apresentam algum grau de fibrose, sendo esta estágio 3 em 25% e cirrose em 14% ⁷². O arranjo da fibrose é uma das características da DHGNA. Certas características, como dano histológico no momento do diagnóstico da DHGNA e sua evolução, têm grande valor no prognóstico desta doença. A análise de diferentes séries envolvendo pacientes que foram submetidos à biópsias de fígado e que foram seguidos num período que variou de 3,5 a 11 anos, mostrou que 28% destes pacientes apresentou progressão da lesão hepática, 59% permaneceu essencialmente igual e 13% mostrou melhora ou resolução da lesão hepática. Casos em que se verificam esteatose pura à biópsia inicial parecem ter o melhor prognóstico dentro do espectro da DHGNA, enquanto esteato-hepatite ou fibrose avançada é associada ao pior prognóstico ⁸⁹. A progressão para fibrose hepática observa-se apenas em pacientes com processo de necrose inflamatória à primeira biópsia hepática. Pacientes com esteatohepatite exibiram alto índice de mortalidade relacionada à doença hepática, o que pode ser explicado pelo aumento da prevalência de cirrose entre estes pacientes ^{7, 90}.

1.6 Vias de sinalização pró-inflamatórias ativadas na obesidade

O tecido adiposo já foi considerado uma massa inerte de energia armazenada com propriedades de isolamento térmico e de apoio mecânico⁹¹. Recentemente, ele emergiu como um regulador mestre da homeostase energética do corpo^{92, 93}. Em 1990, Hotamisligil e colaboradores evidenciaram que adipócitos podem liberar uma enorme quantidade de TNF- α . Este trabalho resultou em interesse no estudo do potencial inflamatório de tecido adiposo⁹³. A partir destes estudos descobriu-se que adipócitos podem liberar uma multiplicidade de adipocitocinas que sinalizam para hepatócitos e células musculares esqueléticas, iniciando a resistência à insulina⁹⁴. O tecido adiposo é o principal responsável pela resposta do organismo à insulina. A redução da expressão do transportador de glicose sensível a insulina GLUT4 na superfície dos adipócitos aumenta disponibilidade de glicose para o corpo inteiro e pode gerar resistência insulínica no fígado e músculo esquelético⁹⁵.

A associação entre obesidade e níveis elevados de TNF- α levou a indentificação do tecido adiposo como maior local de produção desta citocina. Em conjunto com a interleucina-6 e quimiocinas, o TNF- α medeia a infiltração por macrófagos que ocasiona o processo inflamatório do tecido adiposo na obesidade. A ativação do NF κ B é realizada por intermédio do TNF-alfa e pelo estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo é considerado o principal fator para a progressão da DHGNA de esteatose para esteatohepatite⁹⁶.

O estresse do retículo endoplasmático é considerado um fator chave para o desenvolvimento do diabetes e pode contribuir para a progressão da DHGNA. O Retículo Endoplasmático (RE) é uma organela citosólica especializada na regulação do metabolismo de lipídios, da glicose, do colesterol e de proteínas⁹⁷. Células secretoras especializadas como hepatócitos, células β -pancreáticas e adipócitos podem adaptar as funções do

durante o desenvolvimento da obesidade parece depender do “estresse” celular provocado pelo acúmulo de lípidos no tecido adiposo, sendo desviada para o fígado e músculo¹⁰⁰. Uma numerosa lista de genes sugere a interação entre genes reguladores do metabolismo e o sistema imune: TNF α , leptina, adiponectina, resistina, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PCR entre outros. Por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF α) é conhecido por ativar cascatas de transdução de sinais incluindo algumas vias criticamente envolvidas na inibição da ação da insulina, como a ativação de JNKs (c-Jun N-terminal cinase) na inflamação. TNF α também é altamente expresso no tecido adiposo e músculo esquelético de indivíduos obesos, e quando administrado endogenamente induz resistência à insulina¹⁰¹. A inibição desta citocina em modelo de ratos obesos apresenta um aumento na captação de glicose estimulada por insulina no tecido adiposo⁹³. TNF α diminui a sinalização da insulina por induzir a fosforilação do IRS-1 na Ser307 do músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, e foi demonstrado que, no fígado, esta citocina age de forma dependente de JNK¹⁰². Além disso, TNF α é um potencializador de diversas citocinas inflamatórias, gerando uma retroalimentação positiva para a inflamação. A gordura corporal é determinante nessa relação, pois o tecido adiposo também libera IL-6, que age sobre o músculo esquelético, interferindo na captação de glicose⁹¹.

Outro fator agravante para tal resposta é o aumento na produção de óxido nítrico (NO) através do aumento da expressão (transcrição) da forma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS). Quando em grande quantidade, o NO pode se tornar citotóxico, comprometendo diversas funções celulares incluindo a sensibilidade do receptor de insulina¹⁰³.

Foi demonstrado que a obesidade “sobrecarrega” a capacidade funcional do retículo endoplasmático (RE) e que este “estresse”, conhecido como estresse do RE, conduz à ativação de vias de sinalização inflamatórias e contribui, assim, para a resistência à insulina¹⁰⁴. Além disso, o metabolismo da glicose aumentado induz a produção mitocondrial de espécies reativas do oxigênio (ROS). A produção de ROS está bastante elevada na obesidade, o que provoca a ativação aumentada de vias inflamatórias¹⁰⁵. Várias serino/treonino-cinases são ativadas por estímulos inflamatórios ou fatigantes e contribuem para a inibição da sinalização da insulina, o que inclui a ativação de

JNK. Novamente, a ativação desta cinase na obesidade evidencia a sobreposição de vias metabólicas e imunes, particularmente IKK e JNK. Os três membros do grupo de JNK (JNK-1, -2, -3) pertencem à família de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e regulam múltiplas atividades no desenvolvimento e função das células, em grande parte, através da sua capacidade de controlar a transcrição por fosforilação do fator AP-1 (*activator protein-1*), incluindo c-Jun e JunB¹⁰⁶. JNKs surgiram recentemente como reguladoras metabólicas centrais, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade¹⁰⁷. Em resposta a estímulos, tais como estresse do RE, citocinas, e os ácidos graxos, JNKs são ativadas fosforilando o IRS-1 na Ser307, induzindo prejuízo na ação da insulina¹⁰⁸. Na obesidade, a atividade de JNK é elevada no fígado, músculo, e tecido adiposo enquanto que, em animais deficientes no gene JNK1 ($JNK1^{-/-}$), observa-se uma diminuição na concentração de glicose e insulina plasmáticas, bem como da gordura corporal total¹⁰⁹. Curiosamente, a isoforma JNK2 desempenha um papel significativo na aterosclerose, embora aparentemente não no diabetes do tipo 2¹⁰⁸.

1.7 Ativação da JNK e proteínas de choque térmico

Na síndrome metabólica, adipócitos e macrófagos secretam citocinas inflamatórias (como o TNF- α) que ativam a serina-treonina cinase – cjun terminal cinase (JNK) e o inibidor do κ B cinase (IKK) nos tecidos sensíveis a ação da insulina (fígado, músculo e gordura). As C-Jun N-terminal cinase- (JNK), também denominadas SAPKs, é um dos 3 membros da superfamília de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK), que também inclui a cinase reguladora de sinal extracelular (ERKs) e a p38 MAPK¹¹⁰. JNKs ligam-se e fosforilam c-Jun na serina 63 e 73 com o domínio de transcrição. Estas proteínas são responsivas ao estímulo de estresse, principalmente através de sinalização inflamatória e estão envolvidas na apoptose e diferenciação de células T. As JNKs possuem 10 isoformas expressas por 3 genes: *JNK1* (4 isoformas), *JNK2* (4 isoformas) e *JNK3* (2 isoformas). A JNK1 está envolvida na apoptose, neurodegeneração, diferenciação e proliferação celular, condições inflamatórias e produção de citocinas através da AP-1. Recentemente, a JNK1 foi relacionada com a renovação de proteínas pela fosforilação e ativação da ubiquitinina ligase¹¹⁰. Em modelo experimental de EHNA ficou evidenciado que a JNK1, ao contrário da JNK2, promove o desenvolvimento de esteatohepatite¹¹¹.

O JNK e IKK prejudicam a ação do receptor para a insulina, reduzindo a sinalização deste hormônio. Uma consequência do prejuízo da ação da insulina é a deposição lipídica nos hepatócitos e adipócitos, que elevam a produção de metabólitos lipídicos (ceramida e diacilglicerol)¹⁰¹. Por sua vez, estes metabólitos lipídicos ativam diretamente o JNK e IKK, ampliando o defeito na sinalização da insulina. O bloqueio desta rota inflamatória em camundongos geneticamente modificados, pela administração de agentes anti-inflamatórios ou pelo exercício protege contra o desenvolvimento da resistência insulínica induzida pela obesidade¹¹².

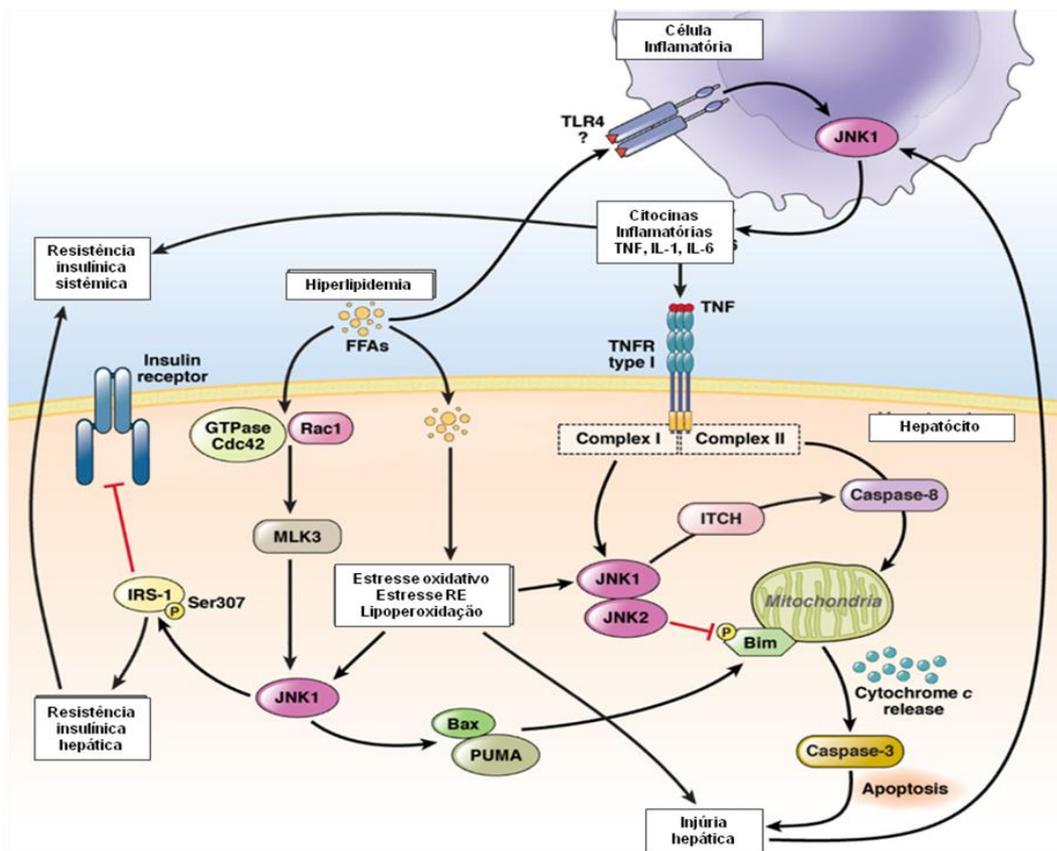


Figura 7: Obesidade e hiperlipidemia aumentam níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e ativam JNK nos hepatócitos. JNK1 contribui para resistência insulínica hepática através da fosforilação da serina 307 e estresse mitocondrial. Vias de estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático no hepatócito também estão ativadas. JNK também ativa células inflamatórias que contribuem para liberação de citocinas inflamatórias. Adaptado de Seki¹¹³.

Outro fator que está presente no diabetes e contribui para um estado pró-inflamatório é a baixa expressão de proteínas de choque térmico (do inglês: *heat shock proteins*-HSP)¹¹⁴. Proteínas de choque térmico são chaperonas ativadas em situações de estresse celular que apresentam um papel importante na homeostase. Estas proteínas são formadas por uma sequência genômica altamente conservada entre espécies podendo ser encontrada em seres eucariotos e procariotos. Proteínas de choque térmico (HSPs) são ferramentas eficazes para estender o tempo de vida de invertebrados. Em mutantes *C. elegans* *daf-2*, a longevidade resultante da perda da sinalização da insulina e do fator de crescimento relacionado a insulina (IGF) é pelo menos parcialmente dependente da expressão elevada da HSP¹¹⁵. A expressão das HSPs é dependente de uma situação de estresse fisiológico, químico ou ambiental que induz a ativação do fator de transcrição (fator de choque térmico - do inglês: *heat shock factor* - HSF) por um processo denominado

trimerização. Este processo constitui da conversão da forma monomérica inativa extra-celular do HSF em um heterocomplexo hábil em ligar-se ao DNA com alta afinidade¹¹⁶. A família de HSFs é representada por 4 membros (HSF-1, HSF-2, HSF-3 e HSF-4), sendo o HSF-1 o fator presente nos principais tecidos e células de vertebrados. A expressão do HSF-1 é dependente de estímulos estressores e regulada através de *feedback* negativo pela presença das HSPs¹¹⁷. Diferenças nas expressões de HSPs em diferentes populações e tecidos enfatizam que a capacidade de resposta natural ao estresse pode ser dependente do tipo celular ou do estímulo. As HSPs são classificadas de acordo com o seu peso molecular, sendo que as proteínas que possuem de 66 a 78 KDa (HSP70) estão mais expressas em mamíferos¹¹⁸. A HSP70 pode ser classificada por duas isoformas, a constitutiva (HSP73 ou HSC70) presente nas células em situações basais e a induzida (HSP72) rapidamente em situações de estresse. Esta chaperona molecular reconhece e liga-se a proteínas sintetizadas, dobradas ou localizadas de forma inapropriada, auxiliando na restauração da estrutura e função natural destas, além de fornecer integridade a componentes celulares como membrana plasmática, núcleo e mitocôndria¹¹⁹.

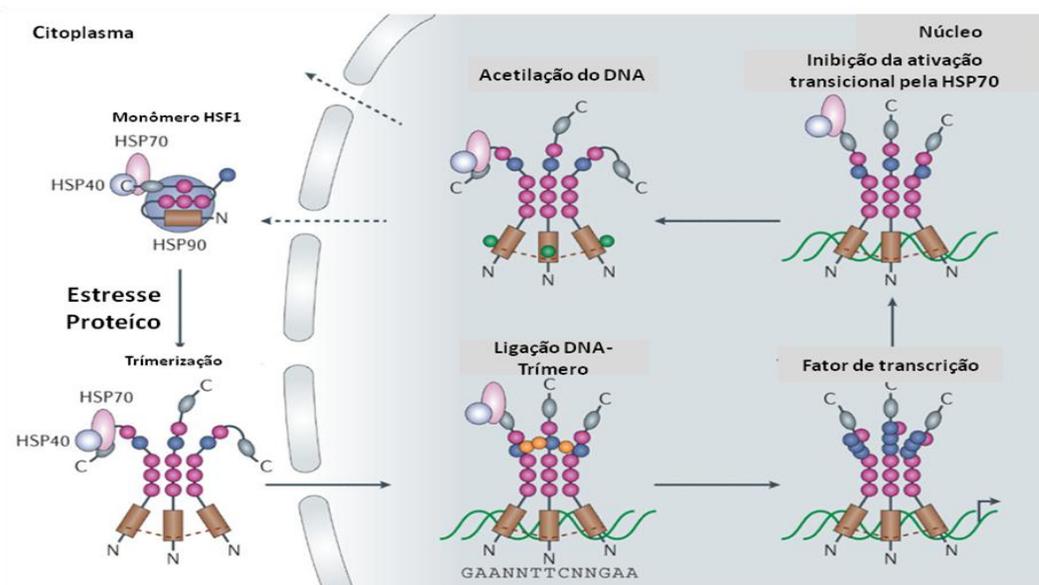


Figura 8: Expressão das proteínas de choque térmico (HSPs). O processo de trimerização constitui da conversão da forma monomérica inativa extra-celular do fator de transcrição das proteínas de choque térmico (HSF-Heat Shock Factor) em um heterocomplexo hábil em ligar-se ao DNA com alta afinidade e induzir a expressão da HSP70¹²⁰.

A falta de resposta intracelular da HSP72 ao estresse pode ser relacionada aos níveis de resistência à insulina em células do músculo esquelético¹²¹. Esta baixa resposta ao estresse em células de pacientes diabéticos parece estar relacionada com a ativação de proteínas envolvidas na resposta inflamatória (e sensíveis a alterações no estado redox), tais como a JNK. O DM II está associado a uma redução a uma baixa expressão do fator de transcrição de proteínas de choque térmico (do inglês: *Heat shock factor-1* - HSF-1), das HSPs. A ativação do HSF-1 e a subsequente expressão das HSPs pode produzir um estado anti-inflamatório geral¹²². Em particular, a HSP70 pode bloquear a ativação do JNK e IKK e fatores de transcrição como o NFκB¹²³.

Melhoras na sensibilidade à insulina foram observadas com a indução da expressão de HSP70 em pessoas diabéticas. Em situações de desafio, como exercício físico, ou após tratamento com choque térmico (forte indutores desta proteína), há um bloqueio da ativação de mediadores da resposta inflamatória, como JNK e IKK no músculo esquelético¹²³. De fato, camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica (HFD) apresentam um aumento na taxa de fosforilação do IKKα/β (Ser180/181), o que é completamente revertido em camundongos transgênicos para HSP70 (HSP72^{+/+}) mesmo se submetidos a HFD¹⁰⁷. Além disso, HSP72 também tem um papel importante na diminuição da atividade do NF-κB, não somente por atuar sobre o complexo IKK, mas também por ativar IKKβ em tecidos como o músculo esquelético¹²⁴. Outro mecanismo sugerido seria através de uma possível inibição competitiva sobre o HSF-1, fator de transcrição da HSP70, que quando ativado, diminui a capacidade de ligação do NF-κB ao DNA¹²⁵. Essa regulação pode limitar a atividade de intermediários de cascatas inflamatórias, como a da iNOS que, em células transfectadas com HSP70, apresenta a expressão de seu gene diminuída em resposta ao estresse, restringindo a alta produção e liberação de NO por estas células¹²⁵.

A atividade do NF-κB também é dependente de outros indutores inflamatórios, como p³⁸MAPK, mesmo na ausência de ativação das IKK¹²⁶. A indução de HSP72 pode comprometer a atividade da p38 em diferentes situações, como em coração isolado estimulado com hormônios da tireoide,

onde a taxa de fosforilação da p³⁸MAPK cai pela metade em resposta a isquemia enquanto que em cultura de células, sua atividade é fortemente diminuída após tratamento com diferentes estimuladores da expressão de HSP72¹²⁰. A expressão desta proteína também está ligada à diminuição da atividade de JNK. Efeitos provocados pelo aumento na taxa de fosforilação de JNK no gastrocnêmio de animais HFD, como intolerância à glicose e resistência à insulina, são atenuados ou completamente revertidos após tratamento com choque térmico, o que também é observado em camundongos transgênicos HSP72^{+/+} ¹⁰⁷. Esse mecanismo de inibição das JNK ocorre rapidamente e de forma dose-dependente em linhagens de células NIH 3T3 de fibroblastos previamente chocados. Porém, essa regulação não sofre interferência das vias de estimulação de JNK, tais como MAPKs como Erk e p38, mas sim através de uma interação direta entre JNK1 em um domínio específico da HSP72 ¹²². Além disso, alguns estudos têm demonstrado a capacidade da HSP70 em ligar-se diretamente ao receptor de insulina que, apresenta uma alta taxa de recuperação após choque térmico ^{127, 128}.

As JNK induzem hiperfosforilação do HSF-1, inativando-o (e, conseqüentemente, bloqueando uma possível resposta de resolução de inflamação)¹²². Na verdade, estudos sugerem que a ativação do HSF-1 seja regulada por JNK2, e não por JNK1 ^{129, 130}, um clássico indutor de HSP70 via HSF-1. Assim, a ativação exacerbada da sinalização pró-inflamatória pode induzir falhas no funcionamento de mecanismos celulares de sinalização da insulina, além de contribuírem para a diminuição na capacidade de expressar HSP70, que é anti-inflamatória e capaz de reverter completamente os bloqueios da sinalização de insulina provocados por respostas inflamatórias crônicas (mesmo que de baixo nível).

Uma vez que a Esteatohepatite Não Alcolica é uma condição patológica e metabólica associada ao estado inflamatório do tecido adiposo a avaliação de marcadores de estresse oxidativo e das proteínas de choque térmico é muito importante para melhor compreender o processo de progressão da doença. Portanto, o presente estudo objetiva através de pesquisa translacional identificar vias pró-inflamatórias hepáticas presentes no modelo de diabetes experimental e em pacientes com Doença Hepática Gordurosa não Alcolica.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar marcadores pró-inflamatórios em um modelo de diabetes experimental e em pacientes obesos com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Artigo 1:

1. Determinar o peso corporal e a glicose sanguínea dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados, no momento da indução do DM e no dia do sacrifício.
2. Avaliar a lipoperoxidação mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.
3. Determinar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática nos diferentes grupos estudados.
4. Determinar a expressão da nitrotirosina hepática nos diferentes grupos estudados.
5. Determinar a expressão nuclear da p65 no fígado dos diferentes grupos estudados.

2.2.2 Artigo 2:

1. Analisar parâmetros clínicos de altura, peso, índice de massa corpórea (IMC), idade e bioimpedância para determinação do percentual de gordura corporal em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica submetidos à cirurgia da obesidade.
2. Avaliar nos pacientes as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT) e

fosfatase alcalina (FA), assim como a dosagem das bilirrubinas totais e frações.

3. Avaliar a dosagem sérica do colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, glicemia, hemoglobina glicada (HbA1) e insulina sérica.
4. Avaliar a resistência à insulina dos pacientes através do índice HOMA (*homeostatic model assessment*).
5. Avaliar a lipoperoxidação no plasma através da técnica de determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
6. Avaliar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) plasmática.
7. Classificar a doença hepática gordurosa não alcóolica segundo a progressão e estadiamento através das alterações histológicas apresentadas pelo tecido hepático biopsiado no trans-operatório.
8. Avaliar através do método Western Blot a ativação da serina-treonina cinase – cjun terminal cinase (JNK) através da expressão das proteínas JNK1, JNK2, p-JNK1, p-JNK2 no tecido adiposo biopsiado no trans-operatório.
9. Avaliar através do método Western Blot a expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) HSP70 e do fator de transcrição heat shock factor 1 (HSF-1) no tecido adiposo biopsiado no trans-operatório.
10. Avaliar através do método Western Blot a ativação da serina-treonina cinase – cjun terminal cinase (JNK) através da expressão das proteínas JNK1 e p-JNK1 no tecido hepático biopsiado no trans-operatório.
11. Avaliar através do método Western Blot a expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) HSP70 no tecido hepático biopsiado no trans-operatório.
12. Avaliar através da imunofluorescência a expressão e a distribuição tecidual da HSP70 e do HSF-1 no tecido hepático.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Artigo 1

3.1.1 Delineamento do estudo:

Estudo de caráter experimental, quantitativo, aplicando modelo de indução experimental de diabetes através da utilização da estreptozotocina. Conforme apresentado no artigo: ***Hepatic Nitrosative Stress in Experimental Diabetes***. *Journal of Diabetes and Its Complications* 26 (2012) 378–381.

3.1.2 Animais e protocolo experimental

O protocolo experimental utilizado estava de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals*. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 08-543. Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O peso médio dos animais no início do estudo foi de 200 a 300 g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 4 °C em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas). O experimento foi realizado na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O DM foi induzido por única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina - STZ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na dose de 70 mg/Kg de peso corporal¹³¹. A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e ácido cítrico (0,1 M, pH 4,5) e administrada na região abdominal esquerda do animal cerca de 10 minutos após a diluição em solução tampão. Os animais do grupo controle receberam somente NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume do tampão utilizado para dissolver a STZ.

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica), no qual um reagente foi misturado a 20 μ L de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500 nm. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram a concentração de glicose sangüínea acima de 250 mg/dL.

Foram utilizados 21 ratos machos Wistar, divididos em três grupos com 7 animais cada: controles (CO), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com aminoguanidina (DM+AG). A Aminoguanidina (aminoguanidine hemisulfate salt, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) foi utilizada na dose de 50 mg/kg (i.p.) durante os últimos 30 dias de experimento ¹³².

Após o período de 60 dias de DM os animais foram mortos por exsanguinação após anestesia profunda. O sangue foi retirado do seio retro-orbital foi centrifugado durante 15 minutos, para dosagem da glicemia sangüínea e o fígado foi retirado, pesado, colocado em porções e congelado a -80°C para posteriores dosagens.

3.1.3 Preparo dos homogeneizados de fígado

Colocou-se 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM pH 7,4) por grama de tecido. Foi utilizado o PMSF, um inibidor de proteases, para que não haja degradação das enzimas posteriormente medidas. O órgão foi homogeneizado em Ultra-Turrax (*IKA-WERK*) durante 40 segundos, à temperatura de 0 a 2° C. Esse homogeneizado foi centrifugado refrigeradamente (*SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge*) por 10 min a 3000 rpm (1.110 x g). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado, congelado em freezer em temperatura de -80° C para ser usado para as dosagens. Foi homogeneizado um grama de fígado em 4 mL de tampão fosfato sódico (0,2 M, pH 6,5) e centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C. A fração total coletada para a realização dos experimentos posteriores foi o sobrenadante.

3.1.4 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método Bradford. O método de Bradford depende da união quantitativa de um corante, o Coomassie Brilliant Blue, a uma proteína desconhecida e a comparar esta união a diferentes quantidades de uma proteína padrão. Como padrão utilizou-se uma solução de albumina bovina 1 mg/mL (nos volumes de 50, 100 e 150 μ L). Foi adicionado 40 μ L do reativo BioRad Protein Assay e lido em absorvância de 595nm¹³³.

3.1.5 Medida das Substâncias que Reagem ao Acido Tiobarbitúrico

A técnica de Medida das Substâncias que Reagem ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS) consiste no aquecimento do homogeneizado com o ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondealdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram colocadas em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,25 mL do homogeneizado, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 25 mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Posteriormente, agitou-se cada tubo e fez-se a incubação em 100 ° C por 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados e acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles então foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último o produto corado foi retirado e lido em espectrofotômetro (*CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian*) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína¹³⁴.

3.1.6 Western blot

Para determinação da expressão das proteínas nitrotirosina, iNOS e p65 por Western Blot os fragmentos de tecido hepático foram extraídos inteiros e coletados em tubo de ensaio tipo falcon contendo SDS 0,1% (5mL/g de tecido) e inibidores de protease (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 100 μ M, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK) 20 μ M, Aprotinina 2 μ g/mL e Leupeptina 2 μ g/mL), para serem homogeneizados em homogeneizador de facas Ultra 80. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 16.000g por 1 minuto a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), sendo as amostras diluídas em tampão para eletroforese (50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/mL azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~40 μ g por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%, para separação durante 4 horas utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi usado como marcador de peso molecular 5 μ L de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, onde ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham), foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 90 minutos. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi confirmada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%) e em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

O procedimento de imunoblotting foi realizado em aparelho específico com uso de sistema de vácuo (SNAP i.d., MilliPore), otimizando o tempo de reação dos anticorpos sendo 1) incubação instantânea a vácuo com 15 mL de

tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%); 2) incubação por 10 minutos com anticorpo específico *anti-nitrotyrosine, anti-iNOS polyclonal antibody, specific p65 antibody (Cell Signalling Technology)*; 3) Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1% após cada incubação ¹³⁵.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

3.1.7 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e analisados com o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 15.0 (SPSS-15.0). As variáveis foram testadas para normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Uma análise de variância (ANOVA) para as diferenças entre grupos. O pós-teste de *Student-Newman-Keuls* foi utilizado para variáveis paramétricas. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). O tamanho da amostra foi calculado por meio de um estudo piloto, que determinou que a utilização de sete ratos proporcionaria significância estatística para a análise de lipoperoxidação hepática.

3.2 Artigo 2

3.2.1 Delineamento do estudo:

Estudo transversal analítico. Foram avaliados pacientes obesos classe III e IV submetidos à cirurgia bariátrica com biópsia hepática comprobatória de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Segundo apresentação no artigo: ***Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway contributing to the progression of NAFLD in obese patients***, submetido à *Clinical Science*, ISSN:0009-9287.

3.2.2 Pacientes

Pacientes adultos com diagnóstico de obesidade grave, que foram submetidos ao tratamento cirúrgico da obesidade no Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas (COM - PUC / RS) foram incluídos no estudo. O Comitê de ética do Hospital São Lucas aprovou o estudo (CEP 11/05544- ANEXO I). Todos os participantes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento informado (ANEXO II). Os pacientes com evidência de uso excessivo de álcool (≥ 10 g / dia), as outras causas de doenças do fígado (por exemplo, hepatite B, hepatite C, doença hepática auto-imune), e aqueles que receberam tratamento com agonistas de PPAR- γ (do inglês: Peroxisome proliferator-activated receptor γ) foram excluídos.

No pré-operatório foram coletados dados demográficos, exame físico (peso, altura e impedância bioelétrica para determinar a porcentagem de gordura corporal) e testes laboratoriais de função hepática, incluindo aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Colesterol total, HDL, LDL glicose, triglicérides, insulina e sorologia para hepatite B e C também foram avaliados. Os níveis de glucose foram medidos pela glucose oxidase kits com base em (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com o protocolo

do fabricante. Os níveis de insulina no soro foram quantificados por ELISA em sanduíche (LINCO Research, St. Charles, MO, EUA). Para o diagnóstico de resistência à insulina é usada HOMA (modelo de avaliação hemostático) calculada pela fórmula [insulina em jejum ($\mu\text{IU} / \text{mL}$) x glucose plasmática em jejum (mg / dl) / 22.5], utilizando o ponto de corte igual ou superior a 3,0¹³⁶.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção de veia da fossa antecubital no período pré-operatório. Todas as amostras de sangue, após centrifugação para obtenção de soro foram separadas em alíquotas, armazenadas em freezer a -80°C para as posteriores dosagens. Todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à cirurgia de gastroplastia redutora com derivação intestinal em “Y de Roux”. Neste procedimento, um reservatório gástrico de 20-40ml foi criado após o grampeamento do estômago proximal. O estômago distal foi conectado a alça de jejuno distal anastomosada ao reservatório gástrico formando um “Y”. Durante o procedimento cirúrgico, aproximadamente 15mg de tecido hepático da borda do lobo esquerdo foi biopsiado e armazenado a -80°C para as posteriores dosagens. O tecido adiposo visceral (100 mg) foi biopsiado e armazenado congelado a -80°C para posterior análise. Durante o procedimento cirúrgico, cerca de 15 mg de tecido de tecido hepático também foi biopsiado e armazenado em paraformaldeído.

3.2.3 Estudo histológico

As biópsias de fígado foram fixadas em formol, processadas rotineiramente para histologia, seccionadas e coradas com hematoxilina-eosina e picrossirius. Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista cego. O grau de esteatose e inflamação portal, inflamação lobular, infiltrado de polimorfonucleares, hipertrofia das células de Kupffer, corpos apoptóticos, necrose focal de parênquima, núcleos de glicogênio, vacuolização hepatocelular, e os corpúsculos de Mallory tiveram suas características histológicas avaliadas em cortes corados com hematoxilina-eosina. A fibrose foi avaliada através da técnica de coloração de picrossirius. A DHGNA foi classificada segundo Matteoni e colaboradores, considerando-se esteatohepatite os casos que apresentavam algum grau de balonização

hepatocelular. Casos que apresentem esteatose hepatocelular e algum grau de fibrose perissinusoidal também foram considerados como esteatohepatite. A esteatose macrovacuolar será classificada de acordo com o percentual de hepatócitos acometidos como ausente (menos de 5%), grau 1 (5 a 25%), grau 2 (>25% a 50%), grau 3 (>50 a 75%), grau 4 (> 75%). A fibrose será classificada como grau I (fibrose perivenular e/ou perisinusoidal limitada à zona 3), grau II (fibrose perivenular e/ou perisinusoidal em zona 3 com fibrose portal e/ou formação de septos fibrosos finos), grau III (presença de septos fibrosos ligando veias centrais entre si e/ou veias centrais à área portal, com poucos nódulos parenquimatosos observados) e grau IV (cirrose). Cada biópsia hepática foi atribuída a uma das três categorias de diagnóstico: esteatose, esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose perissinusoidal ⁷.

3.2.4 Detecção das HSPs através da imunofluorescência

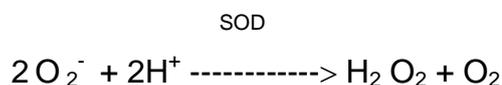
As reações de imunofluorescência foram realizadas nos cortes de tecido hepático pela técnica de complexo estreptavidina- biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO). As lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS – Sigma A3648) diluído a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação por panela de pressão (Eterna, Nigro) utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0 por 15 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 3%, seguida da incubação com o anticorpo primário HSP70 (Sigma H5147, produzido em camundongos, anti-HSP70) que reconhece tanto a indutível 72-kDa, tal como a forma constitutiva de 73-kDa. Para determinar a expressão de HSF-1 foi utilizado anti-HSF-1 (Sigma SAB4501448-100ug, produzidos em coelhos). Para a marcação das células de Kupffer foi utilizado o anticorpo anti-CD14 produzido em coelhos. As reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 60mg%.

3.2.5 Análises bioquímicas de estresse oxidativo

Amostras de sangue foram coletadas com heparina e centrifugadas a 1613xg rpm por 5 minutos a 4°C. O plasma foi armazenado e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com o mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9%), sendo o sobrenadante descartado a cada lavagem e os eritrócitos separados. Dez µL de eritrócitos foram pipetados para a medida da concentração de hemoglobina de acordo com o método de Drabkin. Outros 100 µL de plasma foram pipetados para determinar os produtos gerados pela lipoperoxidação através do método *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) e a medida foi realizada espectrofotometricamente a 535nm¹³⁷.

3.2.6 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da SOD nos eritrócitos foi realizada segundo MIRSA e FRIDOVICH (1972). O método está baseado na inibição por superóxido dismutase da formação de adrenocromo na autoxidação da epinefrina.



Considerando que a epinefrina permanece estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação de adrenocromo, a SOD pôde ser medida espectrofotometricamente seguindo a troca de absorbância de epinefrina a 480nm onde apresenta um pico de absorbância.

Para a reação ocorrer foi preparada uma mistura com volume final de 1 mL com: tampão bicarbonato (0,05 M; pH 10,2), fração citosólica e epinefrina (4 mM). A absorbância utilizada foi de 480 nm, a 30°C.

A reta padrão foi elaborada com concentrações crescentes de SOD (20 a 100 nM) para determinar a que concentração da mesma se produz a inibição da autoxidação da epinefrina em 50% e os resultados foram expressos em

U/mg de hemoglobina. Uma atividade enzimática se define como a quantidade de enzima que é capaz de inibir 50% da autoxidação da epinefrina¹³⁸.

3.2.7 Western blot

Para determinação da expressão das proteínas HSP70, HSF-1, JNK1, pJNK1, JNK2 e pJNK2 por Western Blot os fragmentos de tecido hepático e adiposo foram extraídos inteiros e coletados em tubo de ensaio tipo falcon contendo SDS 0,1% (5mL/g de tecido) e inibidores de protease (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 100µM, N-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK) 20µM, Aprotinina 2µg/mL e Leupeptina 2µg/mL), para serem homogeneizados em homogeneizador de facas Ultra 80. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 16.000g por 1 minuto a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), sendo as amostras diluídas em tampão para eletroforese (50 mM Tris pH 6,8, SDS 10% (w/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) e 2 mg/mL azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para desnaturação completa das proteínas. Quantidades iguais de proteína (~40µg por poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%, para separação durante 4 horas utilizando corrente elétrica constante a 15 mA por gel. Foi utilizado o sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean TetraCell (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) preenchido com tampão de corrida contendo Tris a 25 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3. Foi usado como marcador de peso molecular 5 µL de mistura de proteínas recombinantes pré-coloridas (RPN800E, GE Health Care) por gel. Para a realização do procedimento de eletrotransferência, onde ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (GE Health Care-Amersham), foi utilizado o sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100V constantes por 1:30 horas. A confirmação do sucesso dos procedimentos descritos acima foi confirmada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Vermelho Ponceau S (Red Ponceau S, sal de sódio 0,3%, Sigma, em solução de ácido tricloroacético a 3%) e em seguida descoradas com solução TEN (Tris-EDTA-NaCl a respectivamente 50, 5 e 150 mM)-Tween 0,1% (v/v).

O procedimento de imunoblotting foi realizado em aparelho específico com uso de sistema de vácuo (SNAP i.d., MilliPore), otimizando o tempo de reação dos anticorpos sendo 1) incubação instantânea a vácuo com 15 mL de tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 0,5% em TEN-Tween 0,1%); 2) incubação por 10 minutos com anticorpo específico *mouse anti-human HSP70 monoclonal antibody* (Sigma H5147) que reconhece ambas 73-kDa *constitutive* HSC70 (HSPA8 gene) e 72-kDa *inducible* HSP70 (HSPA1A gene). HSF-1 *rabbit polyclonal anti-human* HSF-1 (Sigma SAB4501448). JNK1 e JNK2 foram reveladas com *mouse anti-human JNK monoclonal antibody* (Sigma SAB4200176, clone 1C2). *Activated phospho-JNK1* e *phospho-JNK2* foram detectadas com *mouse anti-human monoclonal antibody* (Sigma J4750, clone JNK-PT48) ; 3) Três lavagens instantâneas a vácuo com 15 mL TEN-Tween 0,1% após cada incubação ¹³⁵.

A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com uso de Luminol, ácido p-coumárico e H₂O₂, sendo a quimiluminescência fotodocumentada (60 fotos, 1foto/10seg) e as imagens quantificadas com auxílio do sistema automático ImageQuant 350 (GE Health Care).

3.2.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD) e foram analisados por meio de software estatístico SPSS 15.0. As variáveis foram testadas para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para as diferenças intergrupais. O teste *post hoc* de *Bonferroni* foi utilizado para variáveis paramétricas e *Kruskal-Wallis* para não-paramétricos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo 1

HEPATIC NITROSATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL DIABETES

(Publicado em *Journal of Diabetes and its Complications*- 26 (2012) 378–381)



Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes[☆]

Fábio Cangeri Di Naso^{a,b}, Graziella Rodrigues^{a,c}, Alexandre Simões Dias^{c,d}, Marilene Porawski^e, Henrique Fillmann^f, Norma Possa Marroni^{a,c,g,*}

^a Laboratório de Fisiologia e Gastroenterologia Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Curso de Fisioterapia/Centro de Ciências da Vida e da Saúde - Universidade Católica de Pelotas (UCPEL) 96010-000, Pelotas, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, HCPA, UFRGS 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Escola de Educação Física, Curso de Fisioterapia UFRGS 90690-200 Porto Alegre, RS, Brazil

^e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^f Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92543-977, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Universidade Luterana do Brasil, 92425-900 Canoas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2011

Received in revised form 29 March 2012

Accepted 27 April 2012

Available online 13 June 2012

Keywords:

Aminoguanidine

Diabetes

Nitrosative stress

ABSTRACT

Aim: The effects of the inhibition of nitrosative stress by aminoguanidine in an experimental model of diabetes mellitus (DM) were investigated.

Methods: Twenty-one male Wistar rats were divided into three groups: control (CO), diabetic (DM), and diabetic treated with aminoguanidine (DM + AG). Aminoguanidine (aminoguanidine hemisulfate salt, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used at a dose of 50 mg/kg (i.p.) during the last 30 days of the experiment. The expression levels of liver lipoperoxidation (TBARS - nmol/mg protein), inducible nitric synthase (iNOS), nitrotyrosine and the NF-κB nuclear transcription factor p65 were examined using western blot analysis.

Results: The DM group demonstrated an increase in lipoperoxidation and in the expression of iNOS, nitrotyrosine and p65. Aminoguanidine reduced hepatic lipid peroxidation and protein expression levels of iNOS, nitrotyrosine and p65.

Conclusion: Aminoguanidine treatment reduces liver oxidative and nitrosative stress in diabetic animals. In addition, aminoguanidine reduced the expression of p65 in the liver.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The excessive formation of free radicals in many reactions plays a crucial role in the pathogenesis of chronic diabetic complications (Bonnefont-Rousselot, 2002; Ceriello, 2003). The enhanced level of metabolism in mitochondria leads to increased leakage of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) from the respiratory chain; furthermore, inducible nitric oxide synthase (iNOS) is induced by many factors, resulting in the production of excess nitric oxide (NO) and $O_2^{\cdot-}$ (Ha & Lee, 2000; Nishikawa et al., 2000; Pacher, Beckman, & Liaudet, 2007). The interaction of the diffusing NO with the $O_2^{\cdot-}$ results in the formation of peroxynitrite (ONOO⁻) at a diffusion-coefficient-limited rate. Nitrosative stress occurs when the production of the highly reactive nitrogen-containing chemicals exceeds the ability of the human body to neutralize and eliminate them. Nitrosative stress can lead to reactions that alter protein structure, interfering with normal body functions. Oxidative stress causes increased expression of transcrip-

tion factors that favor increased expression of iNOS and nitrosative stress (Di Naso, Simoes Dias, Porawski, & Marroni, 2011; Dias et al., 2005). Notably, transcription factors, such as NF-κB, have an important role in the pathogenesis of diabetic complications, and p65 overexpression in the nucleus is related to this activation process.

The liver, which is rich in mitochondria, is an organ that is important to both energy and substance metabolism. Therefore, damage to the liver mitochondria will aggravate the metabolic disorders in diabetes. The liver is the main organ of oxidative and detoxifying processes, as well as free radical reactions. In many diseases, the biomarkers of oxidative stress are elevated in the liver at an early stage (Dey & Swaminathan, 2010; Ren, Pulakat, Whaley-Connell, & Sowers, 2011).

Aminoguanidine (AG) is a prototype therapeutic agent for the prevention of advanced glycation end product (AGE) formation. AG reacts rapidly with α,β-dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal, glyoxal, and 3-deoxyglucosone, to prevent the formation of AGES (Thornalley, 2003). The adducts formed are substituted derivatives of 3-amino-1,2,4-triazine. The inhibition of disease mechanisms, particularly vascular complications in experimental diabetes, via AG demonstrates that the accumulation of AGES is a risk factor for disease progression (Degenhardt et al., 1999). In addition to the

[☆] Conflicts of interest: None.

* Corresponding author. Rua Jose Kanan Aranha, 102 - Porto Alegre, RS - Brasil. Tel.: +55 51 32483556/+55 51 99643011.

E-mail address: nmarroni@terra.com.br (N.P. Marroni).

effects on advanced glycation, aminoguanidine at low dose can act in a specific manner via the inhibition of nitric oxide synthase (iNOS) activity and nitrosative stress reduction (Szabo et al., 1997). Additionally, AG can inhibit the metabolism of histamine, the catabolism of polyamines and the activity of catalase, and increase the effects of angiotensin in the production of prostacyclin (Nilsson, 1999). Although many inhibitors of NO synthase have been developed to date, few selective inhibitors for the individual isoforms of NOS (inducible, endothelial, neuronal) have been described. Among these, AG has been identified as one of the first iNOS-selective inhibitors (Pacher et al., 2007) (Fig. 1).

Because the liver is subjected to ROS-mediated injury in diabetes, our experiments were performed to investigate the potential protective effects of aminoguanidine treatment on liver oxidative and nitrosative stress in an experimental model of diabetes mellitus.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and experimental protocol

The experimental protocol followed that established by the Ethical Research Committee of Health of the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, as well as the recommendations of the *Principles for Research Involving Animals* (NAS). Twenty-one male Wistar rats, obtained from the breeding colony of the Basic Health Sciences Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), were used. The animals' mean weight was 200–300 g at the beginning of the trials. The animals were kept in a room at a controlled temperature (22 ± 4 °C) with a 12:12-h light/dark cycle with light from 7 a.m. to 7 p.m.

DM was induced using a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) at a dose of 70 mg/kg body weight (Like & Rossini, 1976). STZ was dissolved in citrate sodium buffer (0.1 M, pH 4.5) and citric acid (0.1 M, pH 4.5) and administered in the left abdominal region approximately 10 min after dilution in buffer solution. The animals in the control group were administered sodium chloride (NaCl 0.9%) alone i.p. in the same volume as the buffer that was used to dissolve STZ (Degenhardt et al., 1999). Aminoguanidine (aminoguanidine hemisulfate salt, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used at a dose of 50 mg/kg (i.p.) during the last 30 days of the experiment (Degenhardt et al., 1999).

Male Wistar rats were divided into three groups: control (CO, $n = 7$), diabetes (DM, $n = 7$), and diabetes treated with aminoguanidine (DM + AG, $n = 7$). After 60 days of DM, the animals were deeply anesthetized and euthanized via exsanguination. A non-diabetic group of animals treated with aminoguanidine was not included, as previous studies demonstrated a lack of hepatic alterations with the dosage used (Thornalley, 2003).

Blood was withdrawn from the retro-orbital sinus and centrifuged for 15 min for determination of glycemia. The liver was separated into portions, removed and frozen at –80 °C for later analysis.

2.2. Biochemical analyses

2.2.1. Glycemia

For determination of glycemia, a colorimetric enzymatic test (Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica) was used, in which a reagent was

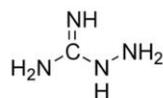


Fig. 1. Chemical structure of aminoguanidine. Adapted from Thornalley (2003).

mixed with 20 µL of the plasma sample and read in a spectrophotometer (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) at a wavelength of 500 nm. Animals with blood glucose concentrations above 250 mg/dL were considered as having diabetes.

2.2.2. Oxidative stress

The liver was homogenized with 9 mL of phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM pH 7.4) per gram of tissue. The protein concentration in the liver homogenates was determined using a bovine albumin solution as described by Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Liver peroxidation was determined using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay (Buege & Aust, 1978).

2.2.3. Western blot

Protein extraction and Western blot were performed as described elsewhere (Laemmli, 1970). Briefly, the membranes were incubated with anti-nitrotyrosine, anti-iNOS polyclonal antibody and specific anti-p65 antibody (*Cell Signaling Technology*). Binding to the primary antibody was detected with rabbit anti-immunoglobulin bound to HRP (DAKO A/S, Glostrup, Denmark). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain), after exposing the membrane to this commercial mixture for one minute. A cassette tape was subsequently introduced with developing film (Amersham Hyperfilm ECL, UK) for approximately 2 min.

After washing the film, the bands were quantified by densitometry using Scion Image 4.02 for Windows (Scion Corporation, Frederick, USA), with the results expressed in relation to control percentage (100%).

2.2.4. Statistical analysis

Data were presented as the mean ± standard deviation (SD) and analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences version 15.0 (SPSS-15.0). Variables were tested for normality by the Kolmogorov–Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for inter-group differences. The Student–Newman–Keuls post-test was used for parametric variables. The level of significance was 5% ($p < 0.05$). The sample size was calculated through a pilot study that determined that the use of seven rats would provide statistical significance in the analysis of hepatic lipid peroxidation.

3. Results

Aminoguanidine administration failed to reduce glycemia in diabetic rats. There was a significant decrease in animal weight in the DM group, and AG treatment (DM + AG) did not reverse this condition (Table 1). The DM group showed a significant increase in liver lipoperoxidation (0.46 ± 0.11 vs 1.10 ± 0.06 nmol/mg protein; $p < 0.05$), and treatment with AG significantly reduced these values (0.50 ± 0.35 nmol/mg protein; $p < 0.05$) (Table 1).

iNOS expression was increased in the DM group compared with the CO group (14.48 ± 0.22 vs 42.88 ± 0.64 arbitrary units; $p < 0.01$), and the expression in the AG-treated group decreased compared with the DM group (Fig. 2). The nitrotyrosine expression also increased in

Table 1
Effect of streptozotocin-induced diabetes and aminoguanidine (AG) on liver lipoperoxidation, glycemia and weight of animals.

Parameters	CO ($n = 7$)	DM ($n = 7$)	DM + AG ($n = 7$)
Glycemia (mg/dL)	217.6 ± 11.84	561 ± 35.60*	549.62 ± 42.30
Weight (g)	401 ± 30.45	287.71 ± 20.79*	285.88 ± 23.80**
TBARS (nmol/mg protein)	0.46 ± 0.11	1.10 ± 0.06*	0.50 ± 0.35**

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AG: aminoguanidine.

* $p < 0.05$ DM vs. CO.

** $p < 0.05$ DM vs. DM + AG.

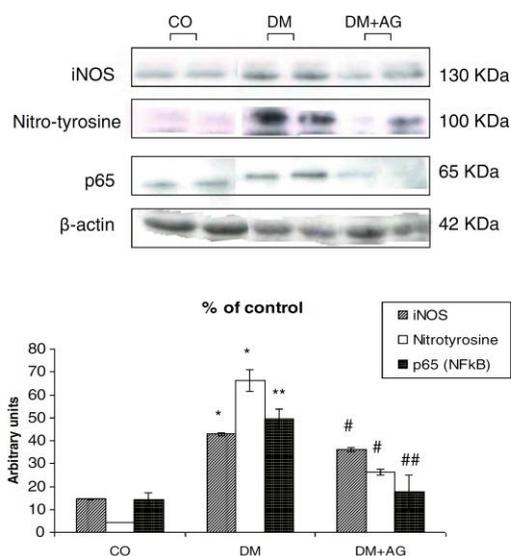


Fig. 2. Effect of streptozotocin-induced diabetes and aminoguanidine (AG) on liver iNOS, nitrotyrosine and p65 NFκB protein by Western blot analysis. *CO vs. DM $p < 0.001$; **CO vs. DM $p < 0.01$; #DM vs. DM + AG $p < 0.001$; ##DM vs. DM + AG $p < 0.01$.

DM group (4.23 ± 0.11 vs 66.38 ± 4.73 arbitrary units, $p < 0.01$), and the treatment with AG significantly reduced these values. A greater expression of p65 was observed in the DM group (14.10 ± 3 vs 49.28 ± 4.65 arbitrary units, $p < 0.01$) with a reduction observed in the AG-treated group (Fig. 2).

4. Discussion

The results of the present study confirmed previous studies describing increased liver oxidative and nitrosative stress in a model of experimental diabetes mellitus (Dias et al., 2005). Because the liver is rich in mitochondria for metabolic functions, it is a crucially important organ, and in a chronic hyperglycemic state, liver oxidative stress is considered a relevant process (Ren, Li, Qi, & Niu, 2008).

Aminoguanidine administration did not affect the glycemic values of the diabetic animals. This finding contradicts results from previous studies that used antioxidants in the treatment of experimental DM (Coskun, Kanter, Korkmaz, & Oter, 2005).

In the present study, a significant increase in liver lipoperoxidation in the DM group was observed, and a reduction in this oxidative stress marker occurred following AG treatment. We observed that AG reduced lipoperoxidation in diabetic animals, possibly due to its antioxidant activity. Previous studies have demonstrated that aminoguanidine reduced apoptosis induced by reactive oxygen species and lipid peroxidation in cells of the retina, kidney and lung tissue in animals with DM (Di Naso, Fogiarini, et al., 2010b, Giardino, Fard, Hatchell, & Brownlee, 1998, Kelly et al., 2001).

A number of studies have shown the involvement of NO and superoxide anion radical in the physiopathological process of chronic complications in DM (Cumaoglu, Stefek, Bauer, Ari, Aricioglu, & Karasu, 2010). Moreover, NO and other related free radicals and oxidative species are the leading agents involved in β -pancreatic cell necrosis (Pacher et al., 2007). In our study, there was evidence of a reduction in iNOS and nitrotyrosine, a marker of peroxynitrite (ONOO⁻) action, after treatment with aminoguanidine.

Using an experimental model of streptozotocin-induced diabetes Ren et al. (2008) demonstrated the hepatic mitochondrial damage

caused by protein nitration. The mitochondrial ultrastructure of hepatocytes was analyzed using electron microscopy, and the expression of iNOS and nitrotyrosine representing nitrosative stress in liver tissue was examined. The diabetic animals showed significant structural damage in the hepatic mitochondria as well as an increased expression of iNOS and nitrotyrosine, which could be related to the nitration of proteins and the damage of mitochondrial structures. In the present study, a reduction in both nitrosative and oxidative stress was seen with the use of aminoguanidine similar to that seen with an iNOS inhibitor (Ren et al., 2008). In the present study, in addition to the role of aminoguanidine in relation to nitrosative stress, benefits regarding the expression of p65 and the activation of nuclear transcription factor NFκB were also demonstrated.

Through an imbalance of the redox state, DM triggers the activation of nuclear transcription factors such as NFκB. The nuclear transcription factor NFκB binds to DNA as a heterodimer of 50 kDa (p50) and 65 kDa (p65) subunits. The p65 subunit is responsible for the activation potential of NFκB (Baeuerle, 1991), whereas NFκB activation is responsible for an increase in iNOS expression. In our study, as well as that of Dias et al., an increased expression of nuclear p65 and iNOS was observed, showing NFκB activation in experimental DM. However, the use of AG reduced p65 and iNOS expression. Experimental diabetes studies have demonstrated that the use of antioxidants can reduce oxidative stress and inhibit the activation of redox-dependent transcription factors (Dias et al., 2005) and the expression of iNOS (Di Naso, De Mello, et al., 2010a).

To investigate the hepatic model of diabetes induced by streptozotocin, Kameyama and colleagues (2008) analyzed the expression of bile transporter proteins and xenobiotic components, as well as the expression of p65 and NFκB. The authors concluded that altered hepatic transport proteins affect the distribution of xenobiotics and that the increased transcription of NFκB is one of the factors responsible (Kameyama et al., 2008). The study demonstrated the importance of redox-dependent factors in the pathogenesis of hepatic complications in diabetes mellitus, and these data could translate to the clinical management of liver diseases and metabolic syndrome.

In conclusion, aminoguanidine treatment reduces liver oxidative and nitrosative stress in diabetic animals and, in addition to these effects, aminoguanidine reduces the expression of liver p65.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies "Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)", and "Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCPA/UFRGS)".

References

- Baeuerle, P. A. (1991). The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochemical Biophysical Acta*, 1072, 63–80.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion Clinical Nutr Metab Care*, 5, 561–568.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302–310.
- Ceriello, A. (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 26, 1589–1596.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*, 51, 117–123.
- Cumaoglu, A., Stefek, M., Bauer, V., Ari, N., Aricioglu, A., & Karasu, C. (2010). Glycoxidative and nitrosative stress in kidney of experimental diabetic rats: effects of the pyridindole antioxidant stobadine. *Neuro Endocrinol Lett*, 31, 313–318.
- Degenhardt, T. P., Fu, M. X., Voss, E., Reiff, K., Neidlein, R., Strein, K., et al. (1999). Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, 43, 81–89.
- Dey, A., & Swaminathan, K. (2010). Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Science*, 87, 197–214.

- Di Naso, F. C., De Mello, R. N., Bona, S., Dias, A. S., Porawski, M., Ferraz Ade, B., et al. (2010a). Effect of *Agaricus blazei* Murill on the pulmonary tissue of animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2010, 543926.
- Di Naso, F. C., Forgiarini Junior, L. A., Forgiarini, L. F., Porawski, M., Dias, A. S., & Marroni, N. A. (2010b). Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. *J Bras Pneumol*, 36, 485–489.
- Di Naso, F. C., Simoes Dias, A., Porawski, M., & Marroni, N. A. (2011). Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2011, 754132.
- Dias, A. S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P. S., & Gonzalez-Gallego, J. (2005). Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr*, 135, 2299–2304.
- Giardino, I., Fard, A. K., Hatchell, D. L., & Brownlee, M. (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 47, 1114–1120.
- Ha, H., & Lee, H. B. (2000). Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl*, 77, S19–S25.
- Kameyama, N., Arisawa, S., Ueyama, J., Kagota, S., Shinozuka, K., Hattori, A., et al. (2008). Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase Calpha and NF-kappaB p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1782, 355–360.
- Kelly, D. J., Gilbert, R. E., Cox, A. J., Soullis, T., Jerums, G., & Cooper, M. E. (2001). Aminoguanidine ameliorates overexpression of proclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2098–2107.
- Laemmlis, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Like, A. A., & Rossini, A. A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193, 415–417.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265–275.
- Nilsson, B. O. (1999). Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflamm Res*, 48, 509–515.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787–790.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315–424.
- Ren, J., Pulakat, L., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2011). Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med*, 88, 993–1001.
- Ren, X. Y., Li, Y. N., Qi, J. S., & Niu, T. (2008). Peroxynitrite-induced protein nitration contributes to liver mitochondrial damage in diabetic rats. *J Diabetes Complications*, 22, 357–364.
- Szabo, C., Ferrer-Sueta, G., Zingarelli, B., Southan, G. J., Salzman, A. L., & Radi, R. (1997). Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem*, 272, 9030–9036.
- Thornalley, P. J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419, 31–40.

4.2 Artigo 2

Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway contributing to the progression of NAFLD in obese patients

Submetido à *Clinical Science* sob o número CS 2013/0390.

**Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway contributing to
the progression of NAFLD in obese patients**

Authors:

Fábio Cangeri Di Naso¹, Henrique Sarubbi Fillmann^{1,2}, Lucas Maggioni², Alexandre Vontobel Padoin², Rafael Jacques Ramos², Claudio Corá Mottin², Rossana Rosa Porto³, Aline Bittencourt³, Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.³, Norma Possa Marroni^{1,4*}.

Affiliations:

¹Laboratory of Physiology and Experimental Hepatology, Porto Alegre Clinics Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Center of Obesity and Metabolic Surgery, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).

³Laboratory of Cellular Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS and National Institute of Hormones and Women's Health, Brazil.

⁴Lutheran University of Brazil, Canoas, RS (ULBRA)

Running title: Obesity depresses HSP70 in NAFLD

***Correspondence:** Prof. Norma Possa Marroni, ¹Laboratory of Physiology and Experimental Hepatology, Experimental Research Center, Porto Alegre Clinics Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone: +55 (51) 33598937; Fax: +55 (51) 33084555; E-mail: nmarroni@terra.com.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate whether reduced activity of the anti-inflammatory 70-kDa heat shock protein (HSP70) pathway correlates with the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and markers of oxidative stress.

Design and Subjects: Adult patients (95) diagnosed with severe obesity who underwent surgical treatment of obesity were divided into steatosis (ST), steatohepatitis (SH) and fibrosis (SH+F) groups. The expression of heat shock protein (HSP70), its major transcription factor heat shock factor-1 (HSF-1) and c-jun amino-terminal kinases (JNK1 and JNK2) were assessed by immunoblotting from hepatic and visceral adipose tissue. Results were confirmed by immunohistochemistry (IHC). Metabolic parameters (lipids, HbA_{1c} and HOMA), hepatic enzymes and redox markers (thiobarbituric acid reactive substances and total superoxide dismutase) were evaluated in the plasma.

Results: In both liver and adipose tissue, decreased HSP70 expression, paralleled by similar reduction in HSF-1 expression and reduced plasma antioxidant enzyme activities, were observed that are associated with insulin resistance and the degree of NAFLD progression (expressions were: ST>SH>SH+F). IHC studies suggested Kupffer cells were the major site of HSP70 inhibition. Conversely, JNK1 expression and phosphorylation was increased at the same pace in adipose tissue while only JNK1 enhancements were observed in the liver. **Conclusion:** Obesity-elicited decrease in HSF-1 expression in Kupffer cells impairs HSP70-dependent anti-inflammation with consequent increase in oxidative stress and insulin resistance in advanced stages of NAFLD. The possible causal effect of fat cell senescence to these processes is discussed.

Keywords: Obesity, non-alcoholic fatty liver disease, heat shock proteins, oxidative stress, cellular senescence.

INTRODUCTION

The increasing worldwide prevalence of obesity and high fasting glucose, which are interdependent risk factors for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), have become a major healthcare problem ¹. In turn, NAFLD encompasses a broad spectrum of successive and progressive pathological conditions that circumscribe hepatic steatosis, its inflammatory variant, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), progressive fibrosis and cirrhosis².

Since obesity is accompanied by an inflammatory status in metabolic tissues ³ and adipose tissue-derived hormones influence hepatic function, including in NAFLD ⁴, the cross-talk between fat and liver has been subject of attention ^{5, 6}. Visceral adipose tissue is inherently pro-inflammatory, although inflammation has also been observed in stressed subcutaneous adipose tissue in obesity ⁷. Important consequences include the release of macrophage cytokines, notably macrophage chemotactic protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF α) ⁸. Moreover, although the complete sequence of events linking obesity to inflammation and insulin resistance has not been fully settled, the mechanism by which excess lipids/fuels trigger low-grade inflammation in both adipocyte and liver contributing to impaired insulin responsiveness involves the activation of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs), endoplasmic reticulum (ER) stress, unfolded protein response (UPR), ceramide, and low grade of inflammatory response ^{9, 10}. In fact, impaired response to stress (e.g. high blood glucose and fatty acid levels) in the cells from diabetic patients is connected with the activation JNK cascades ¹¹, whereas TNF α -elicited activation of JNK is a major constituent of free fatty acid-induced insulin resistance ¹².

If, on the one hand, obesity operates in the sense of activation of JNKs, which feeds forwardly systemic inflammation, on the other, stress (inflammation)-induced expression of the 70-kDa family of heat shock proteins (HSP70) works in opposite direction. Besides the now classical molecular chaperone action, the most remarkable intracellular effect of HSP70 is its anti-inflammatory action under stressful situations. Accordingly, HSP70 blocks nuclear factor κ B (NF- κ B) activation at different levels, *e.g.* by impeding the phosphorylation of inhibitor of κ B (I κ Bs) ¹³, by directly binding to I κ B kinase gamma (IKK γ)¹⁴, thus inhibiting downstream inflammatory signals, which is corroborated by the finding that HSP70 assembles with liver NF- κ B/I κ B complex in the cytosol thus hindering further transcription of NF- κ B-dependent TNF α and NOS-2 genes that worsen severe inflammation in rats ¹⁴. Also, stress-induced HSP70 inhibits JNK-dependent signal transduction that leads to programmed cell death ¹⁵. The remarkable anti-inflammatory action of HSP70 when intracellularly located also explains why cyclopentenone prostaglandins (cp-PGs), which are physiological inducers of HSP70 expression, are powerful anti-inflammatory autacoids ¹⁶⁻¹⁸. Nonetheless, one of the most striking observations during the installation of obesity states is the decreased expression of HSP70 in both skeletal muscle ¹⁹ and adipose tissue of obese patients ²⁰, this being consistently associated with insulin resistance. This is why enhanced HSP70 expression has been convincingly demonstrated to protect against obesity-induced insulin resistance in both humans and animal models of obesity ²¹ while pharmacological (*e.g.* the hydroxylamine derivative BGP-15, now under clinical trial) as well as physiological (hyperthermic, hot tube)

treatments have started to be cogitated as promising therapeutic approaches in type 2 diabetes ²².

The interconnection between obesity, inflammation and HSP70 pathways encompasses a much more complex network operating at gene regulatory level. The promoter region of $TNF\alpha$ gene contains an HSF-1 (heat shock transcription factor-1) binding site that represses $TNF\alpha$ transcription, and thus loss of this repressor results in sustained expression of $TNF\alpha$ ²³, which explains why HSF-1 knockout is associated with a chronic increase in $TNF\alpha$ levels and increased susceptibility to endotoxin challenge ²⁴. Regulation of this network in the opposite directions has also been reported: $TNF\alpha$ may transiently repress HSF-1 activation ²⁵. Furthermore, JNK1 was convincingly demonstrated to phosphorylate HSF-1 in its regulatory domain causing suppression of HSF-1 transcribing activity ²⁶ while HSP70 prevents Bax activation both by inhibiting the JNK/Bim pathway and by interacting with Bax in UV-induced apoptosis ²⁷.

Taken together, the above observations led us to investigate whether HSP70 pathways could be impaired in the liver and adipose tissue of NAFLD patients thus allowing for JNK-triggered inflammatory signals to reach metabolic tissues. Moreover, systemic oxidative stress markers were analyzed in order to assess the relationship between HSP70-elicited anti-inflammation and the progression of NAFLD.

MATERIALS, SUBJECTS AND METHODS

Subjects and procedures

This study was approved by the institutional review boards (Federal University of Rio Grande do Sul and Hospital São Lucas). Ninety-five adult patients (75 women/20 men) with a diagnosis of severe obesity, who were submitted to surgical treatment of obesity at the Center for Obesity and Metabolic Syndrome of Hospital São Lucas (COM – PUC/RS) were included in the study. The Hospital São Lucas local ethics committee approved the study (CEP 11/05544). All participants provided their written informed consent. Patients with intraoperative liver biopsy confirming the diagnosis of NAFLD (please, see below) were included in the study and then divided into the following groups: steatosis (ST), steatohepatitis (SH) and steatohepatitis with fibrosis (SH+F). Patients with evidence of excessive alcohol use (≥ 10 g/day), other causes of liver disease (e.g., hepatitis B, hepatitis C, autoimmune liver disease), and those receiving treatment with PPAR- γ agonists were excluded.

All the patients included in this study underwent surgery with Roux-en-Y-gastric bypass, which involves anastomosing the proximal gastric pouch to a segment of the proximal jejunum bypassing most of the stomach and entire duodenum. During the surgical procedure, approximately 15 mg of liver tissue from the edge of the left lobe was biopsied and stored in *p*-formaldehyde for histology. Visceral adipose tissue (100 mg) and liver (15 mg) were also biopsied and stored frozen at -80 °C for subsequent analysis.

Preoperatively, it were collected demographic data, physical examination (height, weight and bioelectrical impedance to determine body fat percentage) and laboratory liver function tests including aspartate aminotransferase (AST),

alanine aminotransferase (ALT). Serum total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, glucose and insulin, and serology for hepatitis B and C also were evaluated. Glucose levels were measured by glucose oxidase-based kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's protocol. Insulin levels in serum samples were quantified by sandwich ELISA (LINCO Research, St Charles, MO, USA). For diagnosis of insulin resistance, homeostasis model assessment (HOMA-IR) was applied as follows: fasting insulin ($\mu\text{IU/mL}$) x fasting plasma glucose (mg/dL)/22.5. In terms of patient peripheral insulin resistance, HOMA-IR values were equal of or higher than 3.0, consistent with previously observed ²⁸.

Blood samples were collected by puncturing the vein of the antecubital fossa at the initial preoperative period. All blood samples were centrifuged, separated into working aliquots and frozen at $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent analysis.

Histopathology

Each liver biopsy specimen was fixed in buffered *p*-formaldehyde, routinely processed for histology, sectioned, and stained with hematoxylin–eosin (HE) or picro-sirius (PS) red techniques. All biopsies were evaluated by a blinded hepatopathologist. The degree of steatosis and portal inflammation, lymphoplasmacytic lobular inflammation, polymorphonuclear lobular inflammation, Kupffer cell hypertrophy, apoptotic bodies, focal parenchymal necrosis, glycogen nuclei, hepatocellular ballooning, and Mallory bodies were assessed in HE stained slices (**Supplementary Fig. 1A-C**). Fibrosis was assessed via PS red staining analysis (**Supplementary Fig. 1D-F**). Portal fibrosis and interlobular pericellular fibrosis were graded as follows: 0 = none,

1 = mild, 2 = moderate, and 3 = marked. When present, bridging fibrosis was noted as few or many bridges, and cirrhosis was identified by parenchymal nodules surrounded by fibrous tissue. Each liver biopsy was assigned to one of three diagnostic categories: steatosis with nonspecific inflammation (ST, **Supplementary Fig. 1A and D**), nonalcoholic steatohepatitis (SH, **Supplementary Fig. 1B and E**) and perisinusoidal fibrosis (F, **Supplementary Fig. 1C and F**)²⁹.

Protein Separation and Detection.

In order to examine protein expression, biopsies of liver (15 mg) and adipose tissue (100 mg) were prepared as described above and processed for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot analyses as adapted from elsewhere²⁰. Briefly, tissues were homogenized (still frozen) in 0.1% (w/v) SDS buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma) consisting of Leupeptin (4,2 μ M), Aprotinin (0,31 μ M), TLCK (N-Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone, hydrochloride; 20 μ M), PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride, 100 μ M), Sodium Orthovanadate (Na_3VO_4 ; 1 mM), Sodium Molybdate (Na_2MoO_4 ; 1 mM), β -Glycerophosphate (1 mM). Afterwards, homogenates were centrifuged at 16000 x g for 1 min at room temperature and supernatant fractions were saved for protein determination³⁰ by using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as standard. Then, equivalent amounts of protein from each sample (~ 40 μ g) were mixed with Laemmli's gel loading buffer [50 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml bromphenol blue] in a ratio of 1:1, boiled for 5 min and electrophoresed in a 10% polyacrylamide minigel for 4 h 15 mA/gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE

HealthCare) according to the electrotransfer (Bio-Rad) manufacturer's instructions (2 h, 100 V) and transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma) in 3% (w/v) trichloroacetic acid solution to be photodocumented (ImageQuant 350, GE HealthCare). For immunoblotting procedures, SNAP i.d. (Merck Millipore) quick immunoblot vacuum system was used and membranes were washed with water and then blocked in 0.5% (w/v) non-fat dry milk (Nestlé) in wash buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v)]. Membranes were washed three times with wash buffer and incubated for 10 min with mouse anti-human HSP70 monoclonal antibody (Sigma H5147) which recognizes both the 73-kDa constitutive HSC70 (HSPA8 gene) and the 72-kDa inducible HSP70 (HSPA1A gene) forms, at 1:1000 dilution. HSF-1 was detected in adipose tissue samples with rabbit polyclonal anti-human HSF-1 (Sigma SAB4501448), which recognizes both phosphorylated and unphosphorylated isoforms of HSF-1. In liver biopsies, HSF-1 expression was not tested due to tissue size constraints. Total (quiescent unphosphorylated plus activated diphosphorylated) JNK1 and JNK2 were revealed with mouse anti-human JNK monoclonal antibody (Sigma SAB4200176, clone 1C2), which specifically discriminates between 43-kDa JNK1 and 55-kDa JNK2 isoforms. Activated phospho-JNK1 and phospho-JNK2 were detected with mouse anti-human monoclonal antibody (Sigma J4750, clone JNK-PT48), which specifically recognizes both the 46-kDa p-JNK1 and 54-kDa p-JNK2 isoforms diphosphorylated at their regulatory sites Thr183 and Tyr185. After three washings with wash buffer, peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG (Sigma A9044) or peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Sigma A0545) were utilized as secondary antibodies, at 1:10,000 dilution. As a gel loading control,

peroxidase-labeled mouse anti-human β -actin monoclonal antibody (Sigma A3854) was used at 1:25,000 dilution). Data are given as the mean \pm s.d. of expressions normalized in terms of β -actin.

Immunofluorescence Detection

Immunostaining reactions were performed in 3- μ m *p*-formaldehyde-fixed deparaffinized/re-hydrated permeabilized sections of hepatic tissue mounted onto (3-aminopropyl)-triethoxysilane/acetone treated slides after antigen retrieve (15 min at 100 °C in 10 mM citrate buffer pH 6.0). Then, tissue slices were incubated for 1 h at room temperature with a mix of mouse anti-human HSP70 (1:400) and rabbit anti-human HSF-1 (1:50) in a 1% (w/v) BSA solution in PBS (blocking buffer). Antibodies were the same described for western blotting procedures (above). For HSP70/Kupffer cell co-localization, a mix of mouse anti-human HSP70 (Sigma, H5147) and rabbit anti-human CD14 (Sigma, HPA001887, 1:500 dilution) antibodies in BSA/PBS solution was applied onto the slices. Afterwards, slices were washed three times in blocking buffer (5 min each) and then incubated at room temperature for 1 h with secondary fluorescent antibodies [FITC-labeled rabbit anti mouse IgG (Sigma, F9137, 1:500) and Cy3-labeled sheep anti-rabbit (Sigma, C2306, 1:200)] in blocking buffer. Fluorescence stabilization and counterstaining were performed by using Fluorshield with DAPI (Sigma, F6057). Negative controls with either no primary or secondary antibodies were processed in parallel to confirm the results. Images were acquired in a motorized semi-confocal phase-contrast/differential interference contrast (DIC) Olympus model IX81 fluorescence microscope equipped with a xenon lamp (X-cite EXFO-Lumen

Dynamics) and ColorView III Peltier-cooled CCD 5-Mpixel (Soft Imaging) camera. Data were analyzed via Olympus Cell^F software.

Biochemical Analyses of Oxidative Stress

Blood was collected with heparin and centrifuged at 1613xg rpm for 5 min at 4°C. The plasma was discarded and the erythrocytes were rinsed 3 times with the same volume of saline solution (NaCl 0.9%), the supernatant being discarded at each rinsing and the red cells reserved. Ten µL of rinsed red cells was pipetted for hemoglobin measurement according to the Drabkin technique. Another 100 µL of rinsed red cells were pipetted to determine the products generated by lipid peroxidation through the method of thiobarbituric acid reactive substances TBARS technique and was spectrophotometrically measured at 535 nm³¹.

Superoxide dismutase (SOD) activity in erythrocytes was determined using a technique based on the inhibition of adrenochrome formation in epinephrine auto-oxidation³².

Statistical Analysis

The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed through statistical software SPSS 15.0. The variables were tested for normality through the Kolmogorov-Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for intergroup differences. Bonferroni post hoc test was used for parametric variables and Kruskal-Wallis for the nonparametric ones. The level of significance used was $P < 0.05$.

RESULTS

General

Anthropometric data from enrolled patients are depicted in **Table 1** (Please, see also **Supplementary Table 1** in the online version of this manuscript). From an overall 95 type III obese patients (BMI > 45 kg.m⁻²), 75 (79%) were women whereas 20 (21%) were men. According to histological characterization, patients were classified as presenting steatosis (ST, 28.4%), steatohepatitis (SH, 40%) or steatohepatitis accompanied by fibrosis (SH+F, 31.6%). Despite marked differences in NAFLD presented by them, there was no observable difference in BMI, waist circumference, percentage of body fat or obesity degree (**Supplementary Table 1**). The same in relation to plasma lipids (**Table 1**). Such similarities, however, were not circumscribed to the data related to glycemic control, as SH and SH+F patient groups showed increased insulin resistance (HOMA-IR), glycated hemoglobin, and fasting glycemia and insulinemia as compared to ST group (**Table 1**). It is noticeable that HOMA-IR values in SH and SH+F patients were within the double of that found in ST obese individuals (P<0.004).

Plasma liver enzymes were also higher in SH+F and SH patients with NAFLD in comparison with ST group, as expected, denoting a higher degree of hepatic damage and accompanying systemic oxidative stress, as evaluated by TBARS, which allows the assessment of the degree of lipoperoxidation. This was confirmed by a slight but significant decrease in the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), particularly in SH group, as compared to ST patients (**Table 1**).

The incremental inflammatory disease (from ST to SH and SH+F) is clearly denoted by a characteristic leukocyte infiltration within the hepatic tissue of such patients (as typified in **Supplementary Fig. 1 A to C**).

HSP70 vs JNK Status in Adipose Tissue of NAFLD Patients

Consistent with the proposal that a progressively higher degree of liver inflammation among NAFLD patients could be related to a parallel rise in inflammatory status in adipose tissue due to a loss of function of HSP70 anti-inflammatory and cytoprotective activity, we investigated HSP70 expression in biopsies of visceral adipose tissue from such patients. Noteworthy, total HSP70 (HSP72+HSP73) protein expression in adipose tissue of NAFLD patients was found to be markedly decreased in SH (by 50.4%) and SH+F (by 60.6%) as compared to ST groups ($p < 0.05$), which was perfectly correlated with a conspicuous suppression of HSF-1 expression in the tissues of the same patients, as depicted in **Fig. 1**: SH (by 48.2%) and SH+F (by 75.8%) as compared to ST group HSF-1 expression ($p < 0.05$). Paralleling these observations, JNK1 and JNK2 (both total and diphosphorylated/activated forms) were found to be remarkably enhanced in the adipose tissue of the same patients ($p < 0.05$). As shown in **Fig. 1**, total JNK1 expression rose by 92.4% in SH patients and by 122.7% in SH+F individuals as compared to ST volunteers, which was paralleled by an increase by 52.8% (SH) and 56.3% (SH+F) in Thr183/Tyr185-diphosphorylated activated JNK1 (p-JNK1). The same concerning JNK2 expressions: SH patients exhibited an 85.1% rise in total JNK2 while SH+F individuals showed an 85.3%-increase, as compared to SF volunteers. Again, these rises were followed by similar augmentations in

p-(Thr183/Tyr185)-JNK2 expression in adipose tissue: by 57.8% in SH and 58.9% in SH+F as compared to ST group.

HSP70 vs JNK Status in Hepatic Tissue of NAFLD Patients

Liver biopsies from the NAFLD patients were also analyzed for HSP70 (HSP72 and HSP73 forms) and JNKs (JNK1 and JNK2, both total and diphosphorylated activated forms). Similarly to that observed in adipose tissue from the same patients, total HSP70 (HSP72+HSP73) expressions were found to be slightly but significantly decreased as NAFLD progresses (**Fig. 2**): by 54.2% in SH and by 37.2% in SH+F groups as compared to ST group, this being mainly due to a remarkable reduction in the expression of the inducible form HSP72 (by 89.4% in SH and 87.2% in SH+F groups in relation to ST one) while the cognate HSP70 form (HSP73) showed just a modest fade. Once again, as observed in adipose tissue, liver JNK1 and p-JNK1 expressions were found to be enhanced reciprocally in relation to HSP70 expressions: in relation to ST group, total JNK1 was elevated by 41.7% in SH and by 69.5% in SH+F groups (**Fig. 2**), whereas Thr183/Tyr185-diphosphorylated activated JNK1 was found to be enhanced by 23.2% in SH and by 41.9% in SH+F groups, thus suggesting that both JNK1 expression and activation were augmented during the course of the inflammatory disease of the liver. It is also of note that SH+F groups showed increased expressions of JNK1 (by 19.6%) and p-JNK1 (by 15.1%) when the comparison is against SH group as well. JNK2 was not detected in the livers of such patients at all.

In order to get further insight into the origin of such diverting results, we analyzed NAFLD liver biopsies for HSP70 and HSF-1 expressions by IHC. As

shown in **Fig. 3**, there is a progressive disappearance of HSP70 immunoreactivity in the hepatic tissues of patients as NAFLD proceeds from ST to SH and SH+F (**Fig. 3 A to C**), this being of the same magnitude of the pace of the reduction in HSF-1 expression (**Fig. 3 D to F**). Immunofluorescence analysis also showed co-localization of HSP70 and HSF-1 in the slices (**Fig. 3 J to L**), thus suggesting a causal effect of decreased HSF-1 expression over HSP72 (the inducible form of HSP70) immunodetection, since HSP73 expression is well known not to be influenced by HSF-1 activation/expression³³. This observation reinforces immunoblot analyses performed with the same samples in which HSP72 was the HSP70 form by far most affected by the progression of NAFLD (**Fig. 2**).

Immunofluorescence analyses of hepatic tissues from NAFLD patients (**Fig. 3**) also revealed an inconsistency between the cellular nature of HSP70/HSF-1 expressions and hepatocytes (expected to respond to NAFLD by changing HSP70 expression), since it was clear in all the slices so far examined that co-localization of HSP70 and HSF-1 expressions (**Fig. 3 J to L**) was not onto the same cellular structures as were hepatocytes that were clearly located in another histological plane. Because of the shape of the structures (small cells) co-localizing HSP70 and HSF-1 expressions, we conjectured that the cells affected by the progressively decreasing effect of NAFLD over HSP70/HSF-1 expressions could be Kupffer cells. In fact, as shown in **Fig. 4**, NAFLD-degree-dependent decreased expression of HSP70 in liver slices (**Fig. 4 A to C**) colocalized with CD14⁺ Kupffer cells (**Fig. 4 D to F** and **Fig. 4 M to O**).

DISCUSSION

Although body fat percentage and plasma lipids may have a central role in the pathogenesis of NAFLD^{28, 34}, the present results showed that these factors did not furnish a reliable marker for the following of the progression of NAFLD from ST to fibrosis. Accordingly, we firstly showed that NAFLD may be described as a systemic pathological condition largely related to the state of cellular stress and inflammation in adipose tissue and liver that can be traced in the plasma as alterations in lipoperoxidation. In fact, TBARS measurements which are a straightforward estimate of lipoperoxidation/malondialdehyde produced throughout the body (systemic oxidative stress) were found to be elevated in SH and SH+F groups as compared to ST plasma samples, this being correlated with the degree of insulin resistance as assessed by HOMA-IR (**Table 1**). On the other hand, plasma levels of SOD, an important antioxidant produced in response to oxidatively stressful situations which is positively correlated with the degree of severity of oxidative stress in metabolic syndrome³⁵ being frankly augmented in the liver of NAFLD patients³⁶, were found not to be correlated with the progression of the disease from its simple ST form towards the more inflammatory SH+F one.

The most striking observation from the present study, however, was the demonstration, for the first time, that HSF-1-HSP70 axis is progressively suppressed in adipose tissue and liver of obese patients as NAFLD evolves from SF towards SH+F. Moreover, such a suppression was found to be perfectly correlated with the degree of enhancement of total JNK1 and JNK2 expressions in adipose tissue, which is followed by similar rises in the amounts of Thr183/Tyr185-diphosphorylated activated p-JNK1 and p-JNK2 in the same

tissue (**Fig. 1**). Approximately the same pattern of HSP70 decrease paralleled by a proportionate JNK1 activation was observed in the liver of NAFLD patients. Differently from adipose tissue, however, restraint of the expression of the inducible form of HSP70 (HSP72) was much more evident in the liver while JNK2 expression was not verified in the liver at all (*cf.* **Fig. 1** and **Fig. 2**), consistently with the notion that JNK1 but not JNK2 promotes the development and aggravation of NAFLD ³⁷.

Taken together, the above propositions suggest a causal effect of decreased HSF-1 expression over HSP72 for the progression of NAFLD, since HSP72 expression is entirely dependent upon the induction via HSF-1 pathway (differently from that observed for the constitutive HSP73 form whose expression is HSF-1-independent ³³). As a consequence, JNK-based pro-inflammatory pathways may be derepressed thus allowing for an even enhanced oxidative stress and worsening of the disease inasmuch as HSF-1 may suppress TNF α expression ²³ whereas TNF α may repress HSF-1 activation ²⁵ and transcribing activity ²⁶, so that any factor that breaks the poise of HSF-1 biochemical pathways, easily triggers a vicious cycle of inflammation, oxidative stress, tissue damage and so on.

Oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction and ER stress are, in turn, triggering factors for the increased expression and activation of JNK and NF- κ B and development of a more pro-inflammatory state ^{6, 12, 38}. In this regard, we have recently shown, in rodent model of diabetes, that increased oxidative and nitrosative stress and reduced antioxidant enzyme activity are the leading cause of redox imbalance-elicited activation of NF- κ B and tissue damage in the liver of the animals ³⁹⁻⁴¹ that perpetuates inflammation thus

avoiding its resolution. In fact, it has recently shown that selective (tissue-specific transgenesis) inactivation of both JNK1 and JNK2 in adipose tissue of mice protects the animals against diet-induced increased adiposity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle ⁴².

In mammalian tissues, HSP70 are expressed both constitutively (HSP73 or HSC70) and in a stress-inducible way (HSP72). While both HSP70 forms work as molecular chaperones having anti-inflammatory properties, stressful situations that displace cells from the homeostasis (e.g. heat shock, heavy metals, inflammatory signals) quickly trigger HSF-1-dependent transcription of massive amounts of HSP72 to counteract such cellular insults. Therefore, reduced capacity for stress-induced HSP72 expression is at the center of inflammation and insulin resistance in both skeletal muscle ¹⁹ and adipose tissue of obese patients ²⁰. In fact, it has irrefutably been demonstrated that HSP72 expression is capital in blocking inflammation and preventing insulin resistance in the context of genetic obesity or high-fat feeding ²¹.

The above considerations, however, raise a capital question as to what is the mechanism underlying a decreased HSF-1-mediated HSP70 expression in adipose tissue and liver? In turn, this points at two corollary and alternate questions: a) is obesity-induced production of systemic low-grade inflammation responsible for the hepatic inflammatory response in such a way that hepatic capacity for counteracting inflammation through the production of anti-inflammatory HSP70 response is overridden? or b) does the establishment of obesity somehow induce a failure of correct and orchestrated HSP70 response leading to an inflammatory milieu that is spread out towards whole body (including adipose tissue and liver)?

Obesity-induced cellular senescence of adipocytes may be part of the answer to solve these questions. In fact, as pointed out by Tchkonja and co-workers, a senescent-like state can evolve in fat cells from obese individuals (even young ones) that is an adaptation to fat cell overutilization which resembles cellular aging ⁴³. In the same line of evidence is the fact that high fat diet-induced obesity leads to vascular senescence in a process that involves long-term activation of Akt1 and mTOR ⁴⁴. On the other hand, fibroblasts from adult segmental progeroid Werner syndrome, which undergo premature senescence, present a strong positive feedback system in which p38-NF- κ B pathway overactivation leads to a senescence-associated secretion phenotype (SASP) that blocks the expression of the RNA-binding factor HuR, a potentiating factor for the sirtuin SIRT1 which enhances HSF-1 expression ⁴⁵. Hence, cellular senescence occludes HSF-1 expression and, consequently, represses a protective anti-inflammatory heat shock response. Because of this, we advocate that the metabolic overburden of fat cells is responsible for cellular senescence that triggers the observed decrease in heat shock response, not only in adipose tissue, but also in the liver and other metabolic tissues (e.g. skeletal muscle, pancreatic islets). A generalized state of systemic inflammation which feeds forward a vicious cycle of inflammation impeding its physiological resolution is just a fatidic consequence.

Corroborating the above propositions is the recent finding that hepatocyte senescence predicts NAFLD progression in humans ⁴⁶ and the fact that hepatocyte senescence is a general marker of human liver cirrhosis ⁴⁷, which is the next step of NAFLD progression.

Even though one cannot discard the possibility that reduced heat shock response in hepatocytes may account for the aggravation of NAFLD, our results showed that the main target of decreased HSP70 expression in the liver appears to be Kupffer cells (**Fig. 4**), which renders hepatic tissue much more inflammatory. In fact, we showed that HSP70 expression was significantly and progressively diminished in Kupffer cells of NAFLD patients from ST towards SH+F. Although not completely understood, hepatic free radical generation may exacerbate inflammation through Kupffer cell activation. Moreover, it has been recently shown that amplified pro-inflammatory response of M1 Kupffer cells may account for the severity of NAFLD and its progression to NASH, fibrosis, cirrhosis and, eventually, hepatocellular carcinoma ⁴⁸. Also, a growing body of evidence suggests that Kupffer cells critically contribute to progression of NAFLD, in particular because abundant or abnormal lipids may confound recognition of fatty hepatocytes as dangerous and promote adverse interactions with these hepatic macrophages ⁴⁹.

Still in support to the senescence hypothesis is the observation that experimental Kupffer cell ablation produces a scenario that resembles in much senescence, with reduction of hepatic anti-inflammatory response and predisposition to steatosis and insulin resistance ⁵⁰. A tentative picture of such a hypothesis is summarized in **Fig. 5**.

To the limit of our knowledge, this is the first study to show a clearly negative and causal correlation between the progression of NAFLD to fibrosis and the expression/activation of HSF-1/HSP72 biochemical pathway in both liver and adipose tissue of the patients. These alterations were found to be associated with reduced antioxidant enzyme activities and enhanced JNK1 and

JNK2 in the adipose tissue and JNK1 in the liver. Suppression of HSP70 expression was also found to be positively correlated with poor maintenance of glucose homeostasis (**Table 1**) which is of note, since weight gain and baseline HOMA are independent predictors for the development of NAFLD ⁵¹.

Finally, these observations may have important diagnostic value for NAFLD patients, because “HSP70 status” may be assessed from circulating blood mononuclear cells in relation to the plasma (for review, please, see ref. 52) helping to predict fat cell senescence and the progression of the disease through minimally invasive procedures⁵².

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest and no competing financial interests in relation to the work described.

ACKNOWLEDGEMENTS

FCN, RRP and AB completed all the experiments described in this manuscript. HSF, CCM, AVP and RJR. performed the surgeries. All authors were involved in analyzing the results. FCN, PIHBJ and NPM co-wrote the paper. FCN, PIHBJ and NPM designed the study. PIHBJ and NPM provided experimental advice, helped with manuscript revision and were responsible for grant support with respect to Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant ‘Heat Shock Protein Metabolism in Diabetes’ #563870/2010-9, 402626/2012-5 and 402364/2012-0, to PIHBJ) and HCPA FIPE #08-534 which funded the present work. All authors had final approval of the submitted and published versions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary information is available at [International Journal of Obesity website](#).

REFERENCES

1. Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research* 2002; **10 Suppl 2**: 97S-104S.
2. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; **42**(1): 44-52.
3. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* 2011; **29**: 415-45.
4. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *The Journal of clinical investigation* 2003; **112**(1): 91-100.
5. Tarantino G. Should nonalcoholic fatty liver disease be regarded as a hepatic illness only? *World journal of gastroenterology : WJG* 2007; **13**(35): 4669-72.
6. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O *et al*. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008; **57**(9): 2438-44.
7. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT *et al*. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 2011; **19**(6): 1109-17.
8. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research* 2007; **48**(4): 751-62.
9. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering* 2011; **108**(12): 2777-93.
10. Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 2005; **54 Suppl 2**: S73-8.

11. Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta* 2007; **1773**(8): 1341-8.
12. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2006; **281**(17): 12093-101.
13. Chan JY, Ou CC, Wang LL, Chan SH. Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation* 2004; **110**(23): 3560-6.
14. Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 2005; **24**(3): 232-8.
15. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI *et al.* Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**(29): 18033-7.
16. Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, de Bittencourt PI, Jr. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochemical pharmacology* 2008; **75**(12): 2245-62.
17. Homem de Bittencourt PI, Jr., Curi R. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS-X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. *Biochemical pharmacology* 2001; **62**(7): 811-9.
18. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I-kappaB kinase. *Nature* 2000; **403**(6765): 103-8.
19. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* 2003; **52**(9): 2338-45.
20. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C *et al.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell stress & chaperones* 2012; **17**(3): 293-302.
21. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**(5): 1739-44.
22. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of hepatology* 2009; **8 Suppl 1**: S4-8.

23. Singh IS, He JR, Calderwood S, Hasday JD. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**(7): 4981-8.
24. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA *et al.* HSF-1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO journal* 1999; **18**(21): 5943-52.
25. Knowlton AA. NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovascular research* 2006; **69**(1): 7-8.
26. Dai R, Frejtag W, He B, Zhang Y, Mivechi NF. c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**(24): 18210-8.
27. Li H, Liu L, Xing D, Chen WR. Inhibition of the JNK/Bim pathway by Hsp70 prevents Bax activation in UV-induced apoptosis. *FEBS letters* 2010; **584**(22): 4672-8.
28. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association* 2005; **18**(5): 365-70.
29. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; **116**(6): 1413-9.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; **72**: 248-54.
31. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in enzymology* 1984; **105**: 328-31.
32. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; **247**(10): 3170-5.
33. Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF-1 as an anticancer strategy. *Expert opinion on therapeutic targets* 2009; **13**(4): 469-78.
34. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2011; **34**(3): 274-85.
35. Chen SJ, Yen CH, Huang YC, Lee BJ, Hsia S, Lin PT. Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PloS one* 2012; **7**(9): e45693.
36. Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V *et al.* Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver*

international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 2005; **25**(5): 946-53.

37. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE *et al.* JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006; **43**(1): 163-72.
38. Tarantino G, Caputi A. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2011; **17**(33): 3785-94.
39. Rodrigues GR, Di Naso FC, Porawski M, Marcolin E, Kretzmann NA, Ferraz Ade B *et al.* Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; **2012**: 902351.
40. Di Naso FC, Rodrigues G, Dias AS, Porawski M, Fillmann H, Marroni NP. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 2012; **26**(5): 378-81.
41. Di Naso FC, Simoes Dias A, Porawski M, Marroni NA. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Experimental diabetes research* 2011; **2011**: 754132.
42. Zhang X, Xu A, Chung SK, Cresser JH, Sweeney G, Wong RL *et al.* Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes* 2011; **60**(2): 486-95.
43. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging cell* 2010; **9**(5): 667-84.
44. Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, Sawada N, Salomone S, Benjamin LE *et al.* Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Science signaling* 2009; **2**(62): ra11.
45. Kim G, Meriin AB, Gabai VL, Christians E, Benjamin I, Wilson A *et al.* The heat shock transcription factor HSF-1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. *Aging cell* 2012; **11**(4): 617-27.
46. Aravinthan A, Scarpini C, Tachtatzis P, Verma S, Penrhyn-Lowe S, Harvey R *et al.* Hepatocyte senescence predicts progression in non-alcohol-related fatty liver disease. *Journal of hepatology* 2013; **58**(3): 549-56.
47. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002; **16**(9): 935-42.

48. Maina V, Sutti S, Locatelli I, Vidali M, Mombello C, Bozzola C *et al.* Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. *Clinical science* 2012; **122**(11): 545-53.
49. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of hepatology* 2009; **51**(1): 212-23.
50. Clementi AH, Gaudy AM, van Rooijen N, Pierce RH, Mooney RA. Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1792**(11): 1062-72.
51. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A *et al.* Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *Journal of hepatology* 2012; **56**(5): 1145-51.
52. Homem de Bittencourt Jr P, Newsholme P. A novel L arginine/L glutamine coupling hypothesis: implications for type 1 diabetes. In: Liu C-P (ed) *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. . Intech Open Access Publisher: Rijeka, Croatia, 2011, pp 241-284.

Table 1. Plasmatic parameters of fasting Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) obese patients.

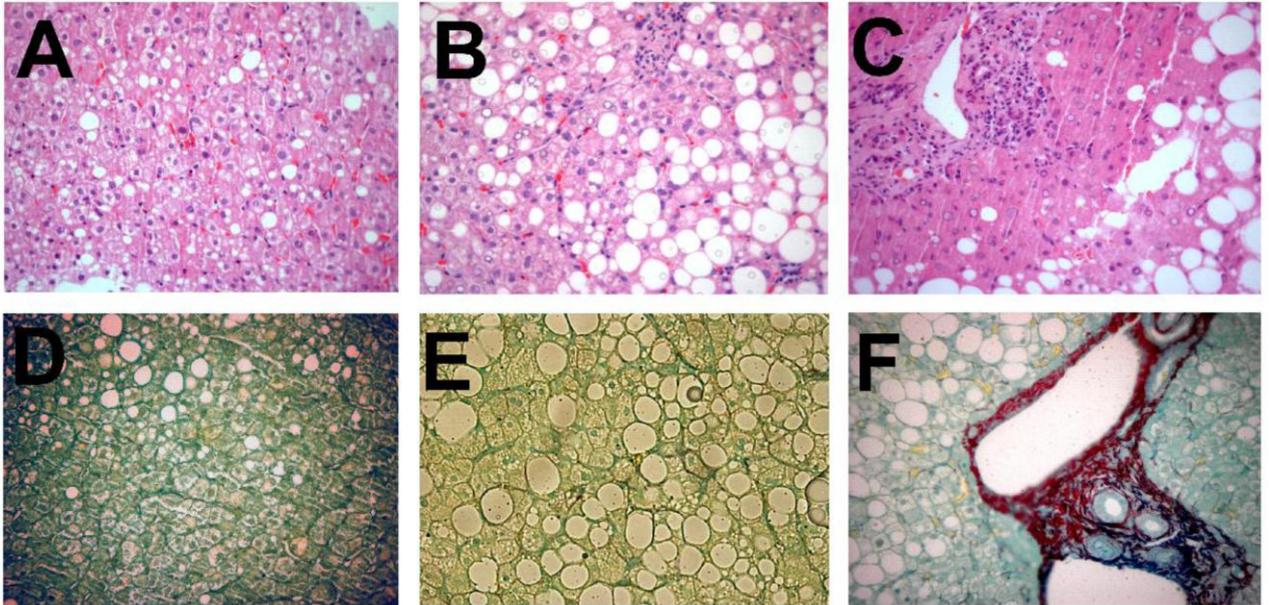
Variables	Groups			ANOVA <i>P</i> values			
	ST	SH	SH+F	Anova	ST X SH	ST X SH+ F	SH X SH+F
N (%)	27(28.4%)	38(40%)	30(31.6%)				
AST (U/L)	23.37±10.29	27.92±10.12	35.10±19.36	.007	ns	.005	ns
ALT (U/L)	24.55±10.13	38.89±18.41	51.40±46.55	.003*	.005	.01	ns
Cholesterol (mM)	5.04 ± 0.79	5.19 ± 1.01	4.93 ± 1.17	.575	ns	ns	ns
HDL-c (mM)	1.25 ± 0.25	1.25 ± 0.28	1.28 ± 0.28	.865	ns	ns	ns
LDL-c (mM)	3.05 ± 0.82	3.17 ± 0.87	2.85 ± 0.87	.395	ns	ns	ns
TAG (mM)	1.76 ± 1.38	1.99 ± 1.23	1.85 ± 0.77	.732	ns	ns	ns
Glycemia (mM)	5.18 ± 1.03	6.69 ± 2.80	5.97 ± 1.26	.019*	.015	.04	ns
Insulinemia (pM)	152.6 ±85.4	224.7 ± 115.9	229.4 ± 87.1	.012	.03	.023	ns
HbA _{1c} (%)	5.85±.78	6.63±1.70	6.24±.76	.049	.03	.03	ns
HOMA-IR	4.69 ± 2.64	9.5 ± 7.85	8.49 ± 4.05	.004*	.005	.003	ns
TBARS (μM)	1.06 ± 0.09	1.69 ± 0.83	1.53 ± 0.20	.01 *	.01	.001	ns
SOD (U/mg protein)	81.92 ± 39.98	50.87 ± 23.08	72.26 ± 32.71	.02*	.05	ns	ns

Data are the mean ± s.d. (and percentage of total enrolled patients). *Differences between groups were assessed by ANOVA and Kruskal-Wallis post hoc test. ST, Steatosis; SH, Steatohepatitis; SH+F, Steatohepatitis plus Fibrosis; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol fraction; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol fraction; TAG, triacylglycerols (in terms of triolein equivalents); HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostatic model assessment; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; SOD, superoxide dismutase activity.

Supplementary Table 1. Anthropometric features of Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) obese patients.

Variables	Steatosis	Steatohepatitis	Fibrosis	<i>P</i> values
N (% of patients studied)	27(28.4%)	38(40%)	30(31.6%)	-
Age (years)	33.78 ± 7.99	38.71 ± 10.02	39.00 ± 9.97	0.081
Sex (female/male)	26/1	29/9	20/10	-
BMI (kg/m ²)	44.56 ± 7.83	46.71 ± 8.38	47.54 ± 6.75	0.331
Waist circumference (m)	1.252 ± 0.193	1.329 ± 0.167	1.329 ± 0.149	0.149
Body Fat (%)	51.66 ± 2.16	49.03 ± 6.43	48.39 ± 11.23	0.647
Obesity degree (%)	196.87 ± 20.13	199.92 ± 22.51	205.27 ± 27.02	0.796

Data are the mean ± s.d. (and percentage of total enrolled patients). Differences between groups were assessed by ANOVA and Bonferroni post hoc test. ST, Steatosis; SH, Steatohepatitis; SH+F, Steatohepatitis plus Fibrosis.



Supplementary Figure 1. Representative slices from 22 NAFLD patient liver biopsies. Steatosis (ST): A and D; Steatohepatitis (SH): B and E; Steatohepatitis+Fibrosis (SH+F): C and F. Upper panels: HE staining. Lower panels: picro-sirius red staining. Original magnification: 40X.

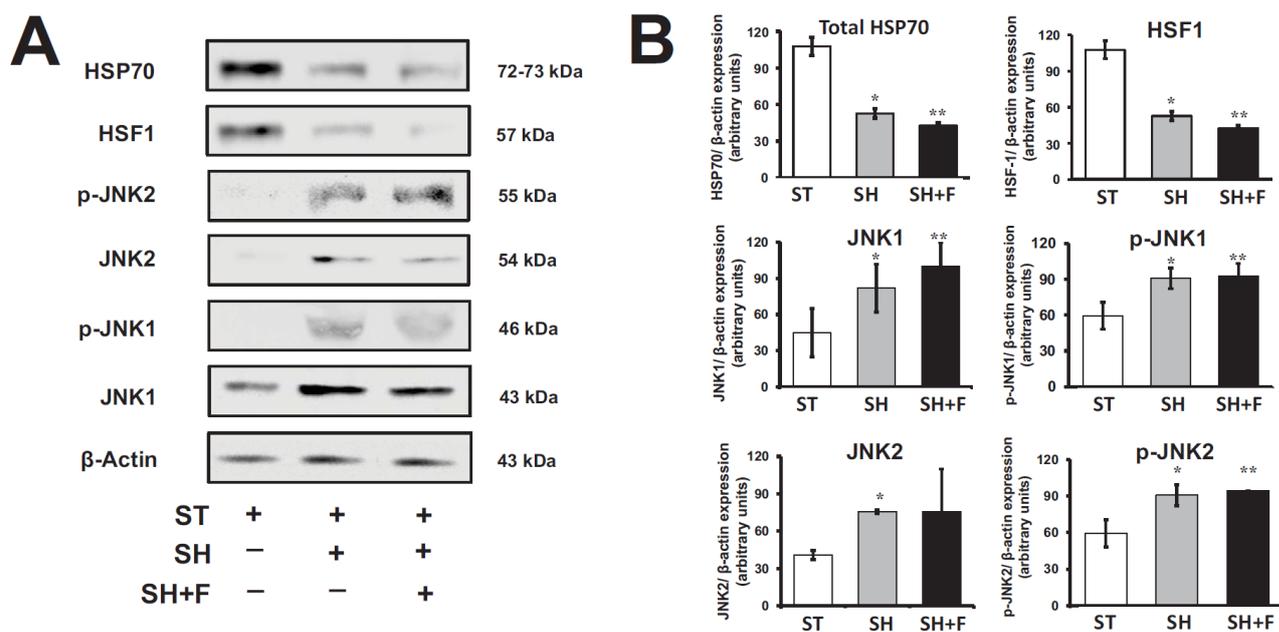


Figure 1. Visceral adipose tissue expression of total HSP70, HSF-1, and JNK1/2. For the immunoblot analysis of protein expressions, tissue biopsy was performed in samples from 22 out of 95 enrolled patients. Six of such patients had Steatosis (ST), ten Steatohepatitis (SH) and six Steatohepatitis+Fibrosis (SH+F). Antibodies to HSP70 detect both the constitutive cognate HSP73 (HSC70) and the inducible HSP72 (HSP70) forms. Antibodies to HSF-1 recognize total (phosphorylated and unphosphorylated) HSF-1 forms, whereas anti-JNK antibodies were specific for either JNK (1 and 2) or diphosphorylated activated JNKs (p-JNK1 and p-JNK2). * $P < 0.05$ for the comparison between ST and SH groups; ** $P < 0.05$ for the comparison between ST and SH+F groups by ANOVA.

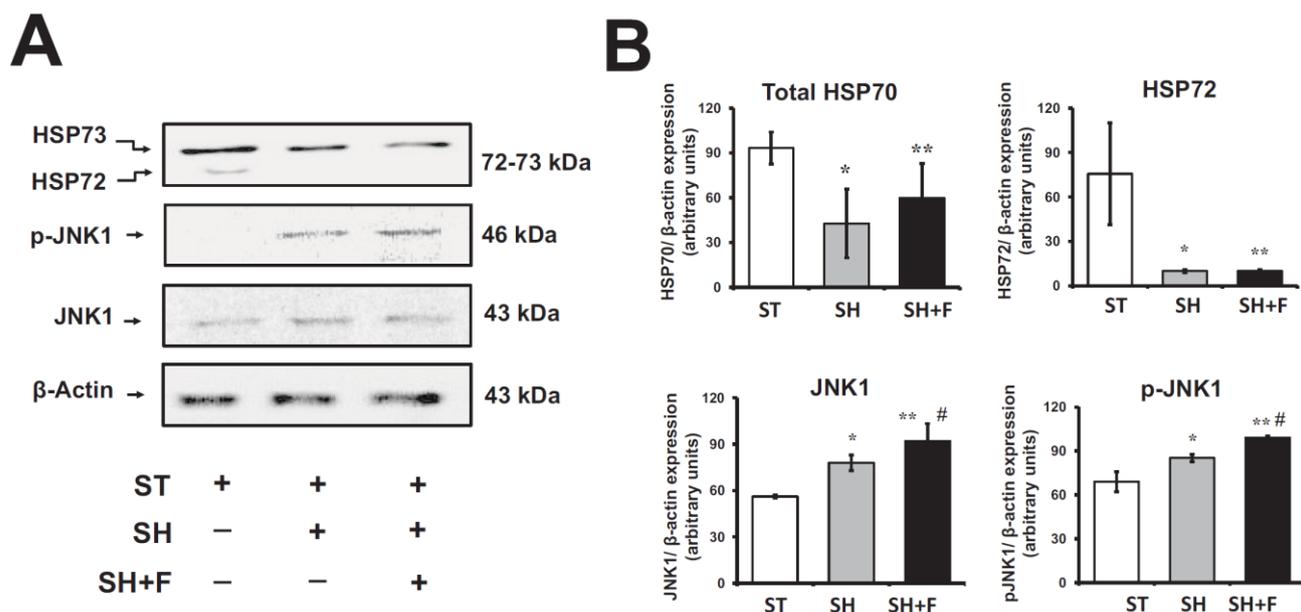


Figure 2. Hepatic tissue expression of HSP72/HSP73, HSF-1, and JNK1/2.

For the immunoblot analysis of protein expressions, tissue biopsy was performed in samples from 22 out of 95 enrolled patients. Samples were as described in the legend of Fig. 2. Antibodies to HSP70 detect both the constitutive cognate HSP73 (HSC70) and the inducible HSP72 (HSP70) forms. Antibodies to HSF-1 recognize total (phosphorylated and unphosphorylated) HSF-1 forms, whereas anti-JNK antibodies were specific for either JNK (1 and 2) or diphosphorylated activated JNKs (p-JNK1 and p-JNK2). * $P < 0.05$ for the comparison between ST and SH groups; * $P < 0.05$ for the comparison between ST and SH+F groups; # $P < 0.05$ for the comparison between ST and SH+F groups by ANOVA.

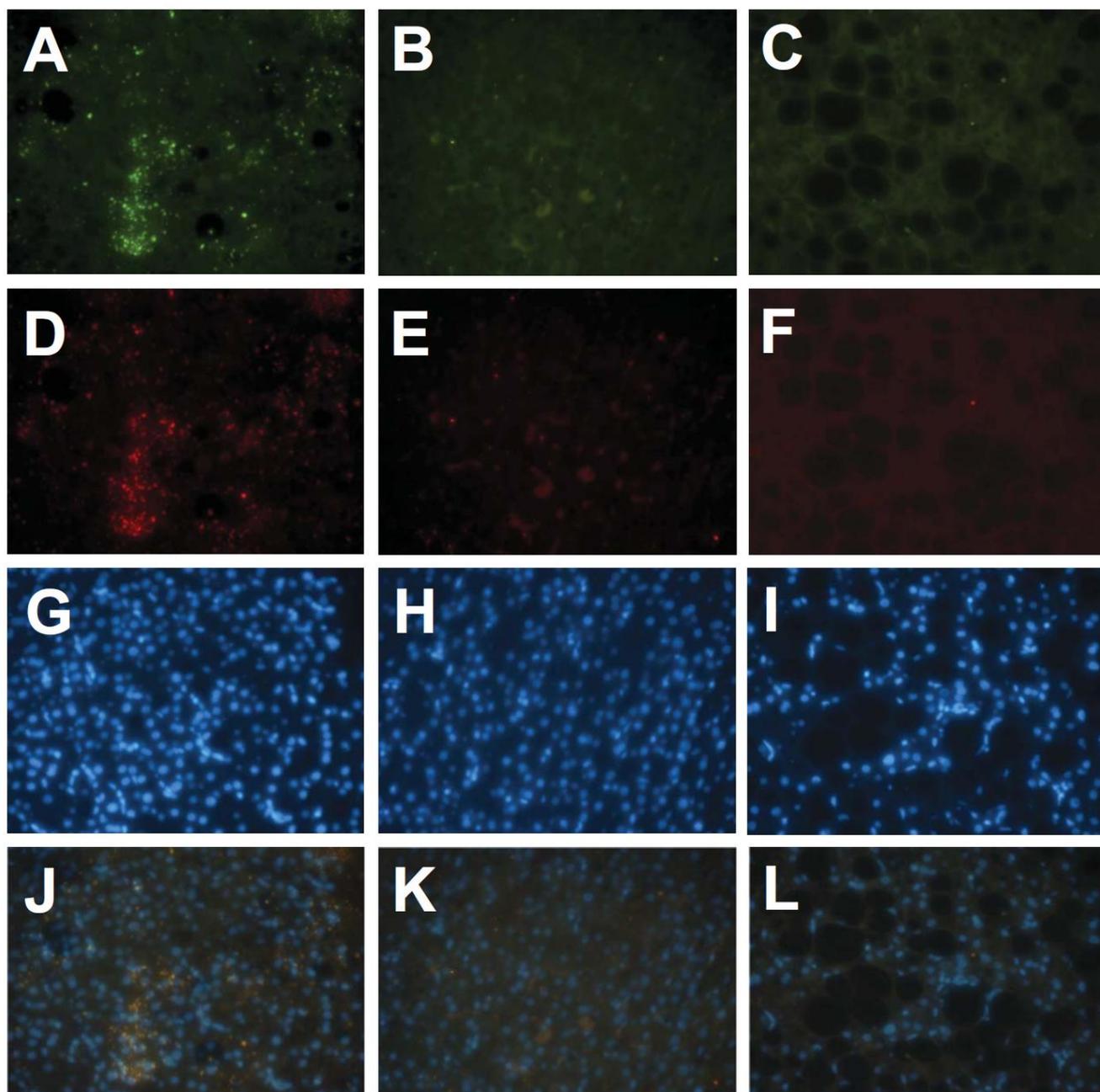


Figure 3. Immunofluorescence analysis of HSP70 and HSF-1 expression in the liver from NAFLD patients. Liver biopsies were collected and fixed as described in the Methods section and then probed with anti-HSP70 (FITC, green; both cognate HSP73 and inducible HSP72 forms) and anti-HSF-1 (red) antibodies. Nuclei were evinced with DAPI counterstaining. Groups are as follows. Steatosis (ST): A, D, G, J (merged); Steatohepatitis (SH): B, E, H, K (merged); Steatohepatitis plus Fibrosis (SH+F): C, F, I, L (merged). Representative immunohistochemistry sections from 22 patients are shown. Samples were as described in the legend of Fig. 2. Original magnification: 40X.

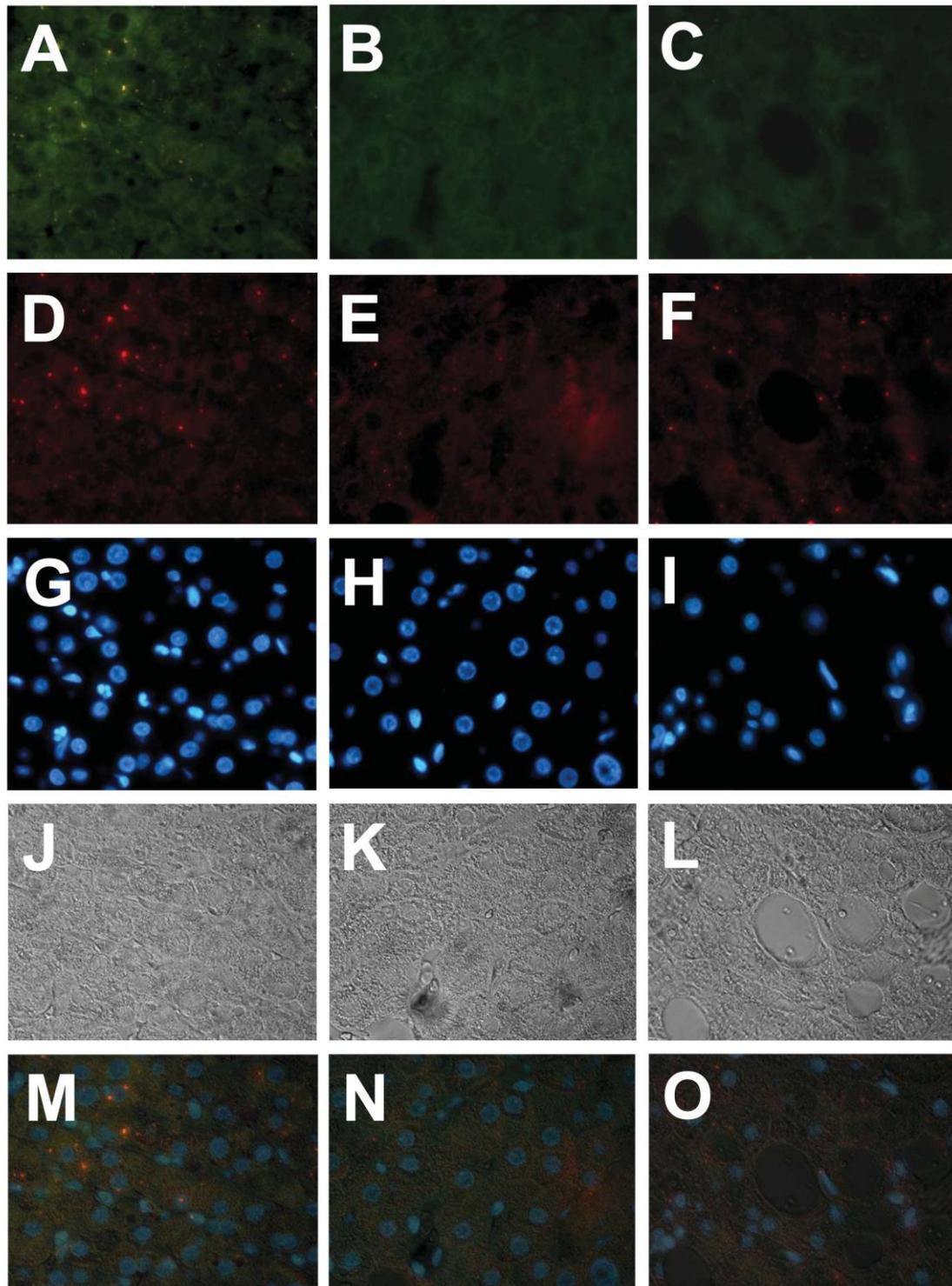


Figure 4. Co-localization of HSP70 and CD14 positive cells in the liver from NAFLD patients. Liver biopsies were collected and fixed as described in the Methods section and then probed with anti-HSP70 (FITC, green; both cognate HSP73 and inducible HSP72 isoforms) and anti-CD14 (red) antibodies. Nuclei were evinced with DAPI counterstaining. Phase contrast images from the same sections are also shown. Groups are as follows. Steatosis (ST): A, D, G, J, M (merged); Steatohepatitis (SH): B, E, H, K, N (merged); Steatohepatitis plus Fibrosis (SH+F): C, F, I, L, O (merged). Representative immunohistochemistry sections from 22 patients are shown. Samples were as described in the legend of Fig. 2. Original magnification: 60X.

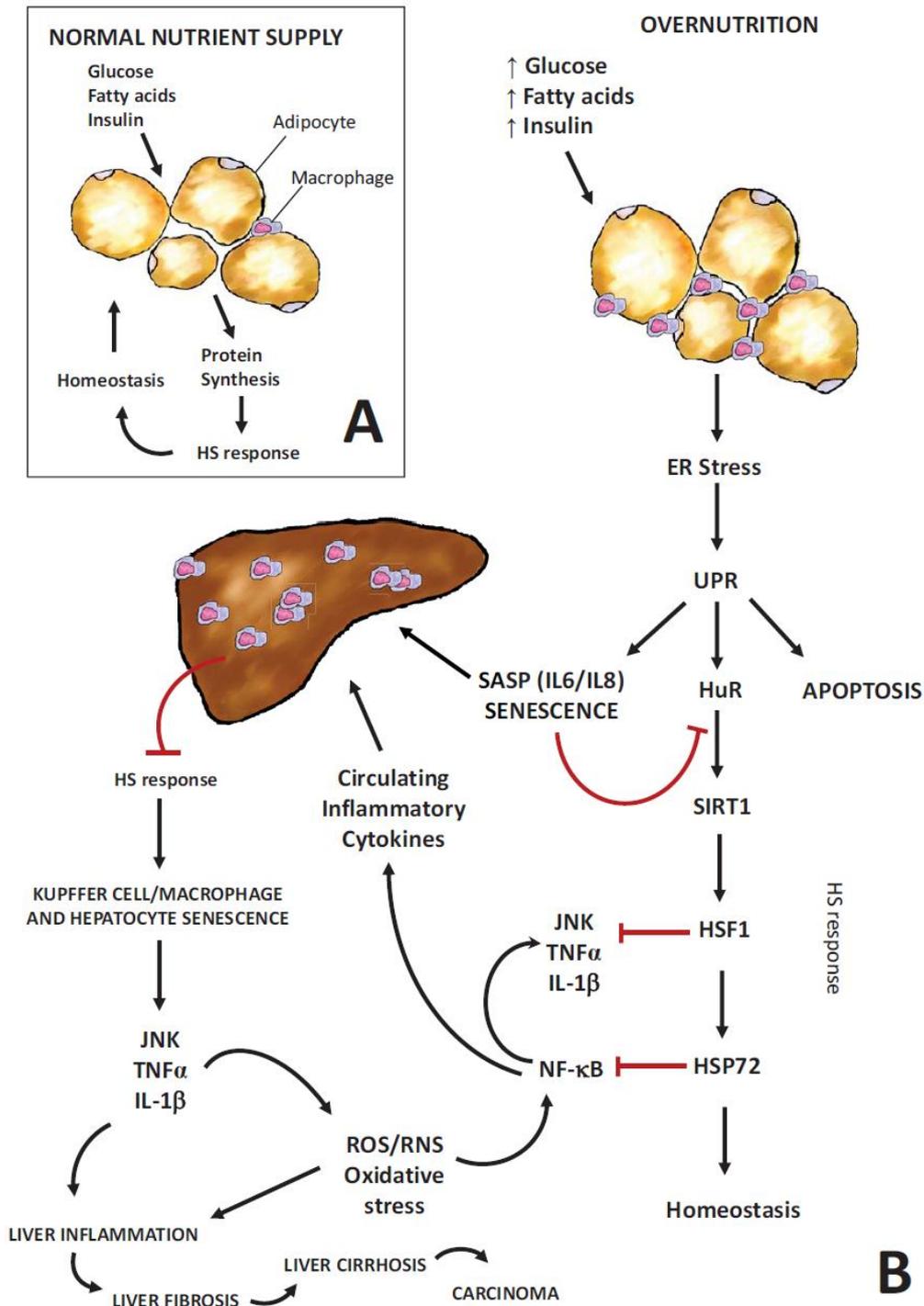


Figure 5. The fat cell senescence hypothesis for the progression of NAFLD. A tentative hypothesis of fat cell senescence as a triggering factor for the development of NAFLD is shown. **(A)** Under normal nutrient supply (*i.e.* equivalent to energy expenditure, physical activity), glucose and fatty acids are utilized in adipose tissue upon physiological amounts of insulin. Any excess of demand is counteracted by enhanced heat shock (HS) response in order supply the correct furnishing of chaperones thus avoiding endoplasmic reticulum (ER)

stress and the resulting unfolded protein response (UPR). **(B)** When circulating glucose and fatty acids (especially saturated) overcome energy expenditure and high amounts of surplus energetic metabolites should be stored in adipose tissue under a higher insulin command, ER stress develops. Should energy expenditure be still and chronically lower than energy intake, ER stress is followed by the UPR, a cellular strategy evolved in order to evaluate the capacity of the cell to arrange a physiological HS response (which forwards cells to protein/metabolite homeostasis). In the case of irremediable HS response, cells may undergo apoptosis and irreversible cell death. On the other hand, if proteostasis is not attained but cells still have conditions to avoid apoptosis, an alternative metabolic pathway may be taken in which cells do not die but activate senescence, assuming a senescence-associated secretion phenotype (SASP), which maintains senescence by increased production of SASP cytokines that chronically depress the expression of the RNA-binding factor HuR. However, HuR acts by binding to SIRT1 mRNA increasing its stability and translation, thus allowing the transcription of HSF-1, a capital transcription factor responsible for the correct HSP72 synthesis, HS response, and blockage of inflammatory cytokine production (e.g. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$) and pathways (e.g. JNK, $\text{NF-}\kappa\text{B}$). Therefore, fat cell senescence produces a systemic inflammatory response that spreads out towards all the tissues, including the liver, in which adipose tissue-derived SASP triggers a similar process of hepatocyte/Kupffer cell senescence which promotes loss-of-function phenotype that culminates in steatosis rapidly shifting to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and, eventually, hepatocellular carcinoma. These suppositions may importantly impact NAFLD patient follow-up, because “HSP70 status” can be assessed from circulating blood mononuclear cells in relation to the plasma, helping to predict fat cell senescence and the progression of the disease through minimally invasive procedures.

5. DISCUSSÃO

Pesquisas translacionais são inicialmente estabelecidas através do uso de modelos animais para posterior aplicação dos resultados desses estudos básicos na prática clínica. Existem diversos modelos experimentais de indução de doenças metabólicas e inflamatórias que possibilitam o conhecimento de mecanismos responsáveis pela progressão das doenças. Esta relação entre a pesquisa experimental e a pesquisa clínica é fundamental para que descobertas recentes já se tornem procedimentos aplicados, reduzindo o tempo destinado para que os primeiros benefícios sejam estabelecidos.

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica é considerada atualmente a doença hepática mais prevalente no mundo ocidental e está relacionada principalmente com a obesidade. A DHGNA abrange a esteatose hepática, a esteatohepatite e formas mais graves da doença hepática como cirrose e carcinoma hepatocelular. A doença está relacionada com a hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, obesidade central, hiperglicemia e diminuição de lipoproteínas de alta densidade ⁶⁻⁸. Obesidade, diabetes mellitus tipo II (DM II) e dislipidemia são as co-morbidades mais comumente associadas à DHGNA, doença que afeta qualquer faixa etária ou grupo racial. Em pacientes com DHGNA, a prevalência de DM II é de 10-75% e dislipidemia de 20 a 92% ⁹. Pacientes diabéticos tipo II, independentemente do índice de massa corporal (IMC), têm aumento significativo na prevalência e gravidade da DHGNA ⁷⁷. A DHGNA é uma síndrome insidiosa, de difícil detecção através de biópsia hepática e sem biomarcadores clínicos definidos.

Conforme os resultados apresentados no artigo ***Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes*** – *Journal of diabetes and its complications*, 2012 (artigo I), que objetivou definir algumas vias inflamatórias e de estresse oxidativo no modelo experimental de diabetes, assim como o efeito terapêutico da aminoguanidina, pode-se concluir que o fígado apresenta importantes alterações inflamatórias em um estado de hiperglicemia crônica. O presente estudo utilizou a droga Aminoguanidina (AG), que a partir dos dados apresentados na tabela I (**artigo I**) não afetou os valores de glicemia dos animais diabéticos. A aminoguanidina atua principalmente como um inibidor dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), mas em pequenas doses pode atuar como um inibidor específico da iNOS e possivelmente garantir uma alternativa terapêutica importante para o diabetes ^{139, 140}.

No presente artigo, foi observado um aumento significativo na lipoperoxidação do fígado no grupo DM e uma redução neste marcador de estresse oxidativo ocorreu após tratamento com AG (**Tabela 1- artigo I**). Observamos que a AG reduziu a lipoperoxidação hepática em animais diabéticos, possivelmente devido a sua atividade antioxidante. Estudos anteriores têm demonstrado que a aminoguanidina reduziu a apoptose induzida por espécies de oxigênio reativas e a lipoperoxidação, em células da retina, rim e tecido pulmonar em animais diabéticos ¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

A hiperglicemia estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é acompanhada pelo aumento da geração de NO. O NO reage com o O_2^- , formando o potente oxidante peroxinitrito, aumentando assim a peroxidação dos lipídios, alterando o metabolismo das proteínas, a oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL) e afetando as vias de sinalização e

transdução celular ⁶⁴. Evidências experimentais suportam que o NO, as espécies reativas de oxigênio e o peroxinitrito interferem no desenvolvimento do DM agudo antes de iniciarem as complicações da doença ⁶⁴.

Diversos estudos apontam o envolvimento do NO e do radical superóxido no processo fisiopatológico das complicações crônicas do DM. Estudos demonstram essas alterações no fígado de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina ^{62, 145}. Além disso, aparentemente, NO e outros radicais livres relacionados e espécies oxidantes são os maiores efetores de necrose das células β -pancreáticas ⁶⁴. Em nosso estudo, foi observado aumento significativo da expressão da iNOS, e redução dos níveis desta proteína após a administração da AG (**Figura 2- artigo I**). Esses achados demonstram que a AG exerceu um efeito inibidor seletivo da iNOS nos animais diabéticos e a relevância do estresse nitrosativo hepático na ativação de vias de transcrição pró-inflamatórias.

Foi demonstrado em modelo experimental de indução por estreptozotocina o dano mitocondrial hepático ocasionado pela nitração de proteínas. Neste estudo foram analisadas a ultraestrutura mitocondrial dos hepatócitos através da microscopia eletrônica e as expressões da iNOS e da nitrotirosina representando o estresse nitrosativo nos tecido hepático. O grupo de animais diabéticos apresentou um importante dano estrutural nas mitocôndrias hepáticas, assim como aumento das expressões da INOS e da nitrotirosina, podendo relacionar-se a nitração das proteínas ao dano das estruturas mitocondriais. A utilização, neste estudo, da aminoguanidina, droga inibidora da iNOS, demonstrou redução do dano nitrosativo e mitocondrial ¹⁴⁶. Considerando-se a importância do estresse nitrosativo e oxidativo hepático no

diabetes, a utilização de um agente antioxidante que reduz a formação do radical superóxido, como a orgoteína, ou que inibem a formação excessiva do óxido nítrico, como a aminoguanidina, pode apresentar um benefício terapêutico para essa doença ¹⁴⁶. Em estudo prévio, a administração da orgoteína determinou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no estresse oxidativo, essas alterações não estabeleceram, entretanto, modificações na p65 ⁶⁶.

O DM, através do desequilíbrio no estado redox, desencadeia a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NFκB. A ativação desse fator é responsável pelo aumento na expressão da iNOS. Em nosso estudo, assim como em outros estudos ^{62, 66, 144}, ocorreu aumento na expressão da p65 nuclear e da iNOS, demonstrando indiretamente a ativação do NFκB no DM experimental. Além disto, também foi evidenciado o aumento da nitração de proteínas, através do aumento da expressão da nitrotirosina hepática no grupo de animais diabéticos (**Figura 2- artigo I**). A diminuição da nitração de proteínas no grupo tratado pode estar associada à redução da ativação do NFκB. Estudos experimentais demonstram que a utilização de antioxidantes pode reduzir o estresse oxidativo e inibir a ativação de fatores de transcrição redox-dependentes ⁶².

Com a finalidade de investigar as alterações hepáticas do modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, Natsumi e colaboradores (2008) analisaram a expressão de proteínas transportadoras de xenobióticos e componentes da bile e a expressão da p65 do NFκB. Os autores concluíram que proteínas transportadoras hepáticas alteradas afetam a distribuição de xenobióticos e que o aumento da transcrição do NFκB é um dos fatores

responsáveis.¹⁴⁷ O estudo reforça a importância de fatores redox-dependentes na fisiopatogenia hepática do DM, podendo-se transpor esses dados para a clínica da DHGNA.

Estes resultados, que definem o diabetes como doença metabólica essencialmente inflamatória, demonstram a importância do estudo translacional com o modelo de diabetes induzidos pela droga estreptozotocina. O diabetes é um fator associado com a progressão da DHGNA e pacientes considerados não obesos, mas com alterações metabólicas e inflamatórias no fígado apresentam elevado risco de desenvolvimento da DHGNA¹⁴⁸. O estudo demonstrou a importância dos fatores redox dependentes na patogênese de complicações hepáticas no diabetes mellitus e esses dados poderiam contribuir para o manejo clínico da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

Conforme os resultados apresentados no artigo ***Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway contributing to the progression of NAFLD in obese patients***, submetido à revista *Clinical Science* (artigo II), pacientes obesos com DHGNA que apresentam um estado de estresse oxidativo e redução da expressão de proteínas de choque térmico desenvolvem a forma inflamatória da doença denominada esteatohepatite não alcoólica (EHNA).

O aumento da prevalência mundial de obesidade e a hiperglicemia em jejum são fatores de risco independentes para a DHGNA e ambos os fatores constituem um grande problema de saúde pública¹⁴⁹. A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) abrange condições patológicas que se sucedem de forma progressiva e levam a esteatose e a sua forma inflamatória, a esteatohepatite, podendo também desencadear fibrose, cirrose e carcinoma

hepatocelular¹⁴⁸. A prevalência da DHGNA varia de 10 a 51%, dependendo da população estudada e da metodologia utilizada^{5, 150}. Com base em estimativas, a prevalência da EHNA na população em geral de países ocidentais é cerca de 2 a 3%⁷³.

O presente estudo caracteriza a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica como uma doença de origem sistêmica amplamente relacionada com o estado inflamatório e de estresse celular do tecido adiposo e hepático. O percentual de gordura corporal e parâmetros quantitativos de lipemia como colesterol total e triglicerídeos possuem um papel central na etiopatogenia da DHGNA. No entanto, o presente estudo demonstrou que estes fatores não contribuíram para a evolução da esteatose para EHNA, nem para o desenvolvimento de fibrose hepática em indivíduos com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica (**Tabela 1 – artigo II**). Também não houve diferença significativa em relação ao índice de massa corporal (IMC) e o percentual de gordura corporal nos diferentes grupos (**Tabela suplementar 1-artigo II**). A obesidade é o principal fator de desenvolvimento da DHGNA e indivíduos obesos possuem um risco relativo muito maior de adoecer do que indivíduos sem sobrepeso^{136, 148}. No entanto, o percentual de gordura corporal não foi um fator determinante de progressão para a EHNA em pacientes com obesidade grave submetidos à cirurgia bariátrica (**Tabela suplementar 1-artigo II**). A análise de adipocitocinas e outros mediadores inflamatórios já demonstrou ter maior poder preditivo para o desenvolvimento da EHNA do que somente a adiposidade visceral¹⁵¹. A partir destes achados a necessidade de avaliar outros fatores inflamatórios no tecido que não a lipemia ou o percentual de gordura corporal se faz necessária.

A progressão da Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica ficou caracterizada através da análise dos marcadores da função hepática AST e ALT. Além da caracterização histológica dos grupos (**Figura complementar 1 – artigo II**), a avaliação destes marcadores foi fundamental para a determinação da gravidade da doença¹⁵⁰. Os pacientes com fibrose hepática apresentaram fundamentalmente níveis de ALT elevados (**Tabela 1- artigo II**) caracterizando a gravidade da doença.

No presente estudo, demonstramos mais uma vez a importante relação entre a resistência insulínica induzida pela obesidade e o estado inflamatório e de estresse oxidativo relacionado com esta condição¹⁵². Pacientes com esteatohepatite apresentaram piora na resistência insulínica e no controle glicêmico crônico avaliado através dos níveis de hemoglobina glicada (**Tabela 1 – artigo II**). Já foram descritas relações entre o estresse mitocondrial e a geração de espécies reativas de oxigênio em doenças metabólicas como o diabetes no fígado e no tecido adiposo¹⁰⁰. Na DHGNA, o estresse oxidativo possui papel fundamental para a progressão de um estado de esteatose pura para o desenvolvimento da forma inflamatória da doença¹⁵¹. No presente estudo foi observada uma elevação da lipoperoxidação sistêmica dos pacientes do grupo que desenvolveu esteatohepatite e no grupo de pacientes com esteatohepatite e desenvolvimento de fibrose quando comparados ao grupo esteatose (**Tabela 1- artigo II**) e uma redução da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no grupo esteatohepatite quando comparado ao grupo esteatose (**Tabela 1- artigo II**). A atividade da SOD reduzida pode ser explicada pela glicação avançada da proteína hemoglobina no estado de hiperglicemia crônica⁶⁶. A atividade da enzima SOD apresentou

leve aumento no grupo com desenvolvimento de fibrose, podendo ser explicado através do estresse crônico a que este grupo está exposto.

O estresse oxidativo mitocondrial, associado à disfunção e estresse do retículo endoplasmático (RE) são fatores para o aumento da expressão e ativação da JNK e NF-κB e para o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório¹⁵²⁻¹⁵⁴. Neste contexto, foi demonstrado **(artigo I – *Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes*)** que o aumento do estresse oxidativo e nitrosativo são as principais causas para o desequilíbrio redox e ativação do NFκB com consequente dano hepático. Em condições de super-nutrição, o adipócito decompõe o seu RE e, após um ponto crítico, começa a fornecer proteínas mal formadas. Para conter este dano, o RE do adipócito gera uma resposta à proteínas mal formadas^{97, 98}. Esta resposta resulta na inibição seletiva na síntese de novas proteínas, na transcrição de chaperonas e na ativação do c-Jun N-terminal cinase (JNK). A ativação do JNK conduz a uma variedade de efeitos, tal como a apoptose, inflamação e resistência à insulina⁹⁹.

No presente estudo ficou mais uma vez evidenciado o papel da ativação da JNK no desenvolvimento da resistência insulínica pelo tecido adiposo e a progressão da EHNA. A expressão e ativação da JNK1 hepática ficou mais evidente no grupo com desenvolvimento de esteatohepatite, o que pode ser um indicativo importante do envolvimento desta proteína na progressão da doença, **(Figura 2- artigo II)** de forma consistente com a evidência de que a JNK1, em detrimento da JNK2, promove o desenvolvimento e agravamento da DHGNA¹¹¹. No tecido adiposo, a ativação tanto da JNK1 quanto da JNK2 foram mais evidentes conforme a progressão para a EHNA **(Figura 1- artigo II)**.

No entanto, este estudo demonstra pela primeira vez a redução relativa da expressão da HSP70 no tecido adiposo (**Figura 1- artigo II**) e fígado (**Figura 2- artigo II**) de pacientes obesos com esteatohepatite quando comparados com pacientes com esteatose pura . Também ficou evidenciado no tecido adiposo e fígado a redução do Fator de transcrição das proteínas de choque térmico (*Heat shock transcription factor 1* – HSF-1) nos pacientes com esteatohepatite (**Figuras 1 e Figura 3 D, E e F – artigo II**). Isto demonstra que estes pacientes provavelmente desenvolveram piora do quadro clínico da EHNA por possuírem uma defesa insuficiente contra o estresse celular. O diabetes mellitus tipo II está relacionado com uma baixa expressão do HSF-1 e dos níveis e expressão da HSP nos tecidos sensíveis a insulina¹²¹. Uma sinalização alterada da insulina nestes pacientes reprime a atividade da HSF-1 através do aumento da expressão da JNK¹⁵⁵. A expressão da HSP70 é fundamental para o bloqueio de fatores de transcrição pró-inflamatórios e para ativação da JNK ¹²². Esta disfunção nas defesas contra o estresse ocorreu tanto no tecido adiposo quanto no fígado e desta forma demonstrou contribuir para a resistência insulínica e para a progressão da EHNA no presente estudo (**Tabela 1 e figuras 1 e 2 - artigo II**).

Em tecidos de mamíferos, a HSP70 é expressa tanto constitutivamente (HSP73 ou Hsc70) quanto de uma forma indutível ao estresse (HSP72)¹⁵⁶. Embora ambas as formas da HSP70 são chaperonas moleculares que funcionam com propriedades anti-inflamatórias, situações de estresse que perturbam a homeostase celular (por exemplo choque térmico, metais pesados, os sinais inflamatórios) podem desencadear rapidamente a transcrição dependente do HSF-1 de grandes quantidades de HSP72 para contrapor tais

agravos celulares ⁶⁸. Portanto, a redução da capacidade de expressão induzida pelo estresse da HSP72 está no centro da origem da inflamação e resistência à insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo de pacientes obesos ^{121, 157}. De fato, tem sido demonstrado que a expressão da HSP72 é fundamental para bloquear a inflamação e prevenir a resistência à insulina no contexto da obesidade genética ou alimentação rica em gordura ¹⁰⁷. No presente estudo foi observada no fígado uma expressão positiva da forma indutível HSP72 somente no grupo de pacientes com esteatose (**figura 2- artigo II**) e sugerimos que este possa ser considerado um fator de proteção para a progressão à esteatohepatite.

No presente estudo, com o objetivo de avaliar o tipo celular e a distribuição tecidual hepática das HSPs foi realizada a marcação por imunofluorescência das proteínas HSF-1, HSP70 e a co-marcação das células CD14 positivas. Foi demonstrado que a expressão da HSP70 foi significativamente e progressivamente diminuindo em células de Kupffer CD14+ de pacientes com DHGNA a partir do grupo esteatose até esteatohepatite e fibrose (**Figuras 3 e 4 A, B e C – artigo II**). Embora não seja completamente compreendida, a geração de radicais livres pode agravar a inflamação através da ativação das células Kupffer. Além disso, foi recentemente demonstrado que a resposta pró-inflamatória das células de Kupffer pode ser responsável pela a gravidade da esteatose hepática e a sua progressão para EHNA, fibrose, cirrose e, eventualmente, carcinoma hepatocelular ¹⁵⁸. Neste contexto, evidências sugerem que as células de Kupffer contribuem criticamente para a progressão da DHGNA reconhecendo a

injúria nos hepatócitos com esteatose e promovendo consequentes respostas inflamatórias ¹⁵⁹.

Em conjunto, as proposições do presente estudo sugerem um efeito causal de diminuição da expressão HSF-1 sobre HSP72 para a progressão da EHNA, uma vez que a expressão da HSP72 é totalmente dependente da indução da via HSF-1 ¹⁶⁰. Consequentemente, as vias pró-inflamatórias ativadas pela JNK podem ser reprimidas, resultando em aumento do estresse oxidativo e agravamento da doença, na medida em que o HSF-1 pode suprimir a expressão de mediadores de inflamação ¹⁶¹, de forma que qualquer elemento que quebre o equilíbrio do HSF-1 através de vias bioquímicas, facilmente desencadeia um ciclo vicioso de inflamação, estresse oxidativo e consequente dano ao tecido.

Portanto, o presente estudo demonstrou o envolvimento do estresse oxidativo sistêmico e de alterações inflamatórias do fígado e tecido adiposo na progressão da EHNA. Também ficou evidenciado o papel da expressão regular das proteínas de choque térmico como fatores de proteção no tecido hepático e adiposo em pacientes com DHGNA. Nesta população, o aumento do estresse celular e a baixa expressão das proteínas de choque térmico contribuíram para a maior expressão da JNK, para o agravamento da resistência insulínica e para um estágio mais avançado da DHGNA.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos nos trabalhos realizados concluiu-se que:

No artigo I:

O modelo experimental de indução de diabetes através da droga estreptozotocina promove alterações hepáticas relacionadas com o aumento de estresse oxidativo avaliado através da lipoperoxidação hepática. Também foi visto aumento do estresse nitrosativo, representado pelo aumento da expressão da iNOS e da nitrotirosina, que levaram à ativação do NFκB. Estas alterações foram revertidas com a utilização de um inibidor específico da iNOS, o que evidencia a importância do estresse nitrosativo nas alterações hepáticas relacionadas ao diabetes.

No artigo II:

Pacientes obesos com DHGNA apresentam aumento do estresse oxidativo sistêmico que contribui para a progressão da EHNA. A redução da via HSF-1/HSP70 no fígado e tecido adiposo também determinou um estado pró-inflamatório representado pela ativação da JNK, um estado de resistência insulínica, progressão da esteatohepatite e desenvolvimento de fibrose hepática. A obesidade e o diabetes promovem aumento do estresse oxidativo hepático e deprimem a via anti-inflamatória HSP70 contribuindo para a progressão da DHGNA.

PERSPECTIVAS FUTURAS

As evidências encontradas neste estudo, assim como em estudos anteriores demonstram a importância das vias de transcrição relacionadas ao estado redox e à expressão das proteínas de choque térmico para o desencadeamento e progressão de diversas doenças. Na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica as evidências de que estas vias estão envolvidas não somente no tecido hepático, mas também no tecido adiposo para a progressão da doença, são determinantes para o surgimento de novas pesquisas e intervenções. O estudo da relação intra extracelular da HSP70 pode ser um marcador de prognóstico de fácil obtenção a partir do sangue periférico, ao contrário da biópsia hepática, que ainda é a principal forma de estadiamento da doença.

O estudo de novos biomarcadores moleculares relacionados a senescência celular do tecido adiposo e dos hepatócitos também é uma linha de pesquisa que se abre a partir destes resultados e de resultados publicados recentemente. O estudo das citocinas SASP - *senescence-associated secretion phenotype*, HuR e SIRT1 e como estas vias podem inibir a ativação do HSF-1 seriam perspectivas futuras aos presentes achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obesity research* 2001; **9 Suppl 4**: 228S-233S.
2. Freitas LRSd, Garcia LP. Evolução da prevalência do diabetes e deste associado à hipertensão arterial no Brasil: análise da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, 1998, 2003 e 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2012; **21**((1)): 7-19.
3. Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y, Haj-Yehia A. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2002; **436**(1-2): 111-8.
4. Francque S, Verrijken A, Mertens I, Hubens G, Van Marck E, Pelckmans P *et al.* Visceral adiposity and insulin resistance are independent predictors of the presence of non-cirrhotic NAFLD-related portal hypertension. *Int J Obes (Lond)* 2011; **35**(2): 270-8.
5. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 2012; **61**(2): 141-52.
6. Edmison J, McCullough AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis* 2007; **11**(1): 75-104, ix.
7. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; **116**(6): 1413-9.
8. Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2007; **22**(3): 293-303.
9. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; **11**(1): 74-80.
10. Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *Journal of hepatology* 2006; **44**(1): 197-208.

11. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; **414**(6865): 782-7.
12. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes care* 2010; **33 Suppl 1**: S11-61.
13. Bresson D, von Herrath M. Immunotherapy after recent-onset type 1 diabetes: combinatorial treatment for achieving long-term remission in humans? *Rev Diabet Stud* 2004; **1**(3): 108-12.
14. ASSOCIATION AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; **28 Suppl 1**: S37-42.
15. Colman PG, Thomas DW, Zimmet PZ, Welborn TA, Garcia-Webb P, Moore MP. New classification and criteria for diagnosis of diabetes mellitus. Position Statement from the Australian Diabetes Society, New Zealand Society for the Study of Diabetes, Royal College of Pathologists of Australasia and Australasian Association of Clinical Biochemists. *The Medical journal of Australia* 1999; **170**(8): 375-8.
16. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; **414**(6865): 813-20.
17. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991; **40**(10): 1328-34.
18. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998; **44**(7): 1139-45.
19. Goh SY, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**(4): 1143-1152.
20. Vlassara H. Advanced glycosylation in nephropathy of diabetes and aging. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1996; **25**: 303-15.
21. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int* 1995; **48**(1): 111-7.
22. Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**(8 Suppl 3): S254-8.

23. Twigg SM, Cao Z, SV MC, Burns WC, Brammar G, Forbes JM *et al.* Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology* 2002; **143**(12): 4907-15.
24. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; **114**(6): 597-605.
25. Schiekofler S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T *et al.* Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes* 2003; **52**(3): 621-33.
26. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS *et al.* Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; **269**(13): 9889-97.
27. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1997; **272**(26): 16498-506.
28. Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**(9): 368-75.
29. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y *et al.* RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003; **162**(4): 1123-37.
30. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL *et al.* RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006; **185**(1): 70-7.
31. Devangelio E, Santilli F, Formoso G, Ferroni P, Bucciarelli L, Michetti N *et al.* Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**(4): 511-8.
32. Engerman RL, Kern TS, Larson ME. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 1994; **37**(2): 141-4.
33. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994; **43**(9): 1122-9.

34. Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007; **55**(6): 498-510.
35. Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research* 2002; **10 Suppl 2**: 97S-104S.
36. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1998; **22**(1): 39-47.
37. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 2010; **87**(1): 4-14.
38. Levitan EB, Yang AZ, Wolk A, Mittleman MA. Adiposity and incidence of heart failure hospitalization and mortality: a population-based prospective study. *Circulation. Heart failure* 2009; **2**(3): 202-8.
39. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK *et al*. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; **120**(5): 1183-92.
40. Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Current medicinal chemistry* 2012; **19**(28): 4850-60.
41. Michaelis L. Fundamentals of oxidation and respiration. *American scientist* 1946; **34**(4): 573-96.
42. Davies KJ. The evolution of Free Radical Biology & Medicine: still radical after a quarter of a century! *Free radical biology & medicine* 2010; **49**(12): 1825-33.
43. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Quek AM, Huang SH, Khoo CM *et al*. Markers of oxidative damage are not elevated in otherwise healthy individuals with the metabolic syndrome. *Diabetes care* 2010; **33**(5): 1140-2.
44. Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 1998; **58**(4): 350-6.
45. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; **49**(3): 345-61.
46. Davies KJ, Pryor WA. The evolution of Free Radical Biology & Medicine: a 20-year history. *Free radical biology & medicine* 2005; **39**(10): 1263-4.

47. Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov Yu P, Belkina LM, Arkhipenko Yu V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol* 1982; **77**(5): 465-85.
48. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987; **1**(6): 441-5.
49. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980; **492**: 153-68.
50. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; **63**(4): 381-9.
51. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; **257**(4 Pt 1): L163-73.
52. Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl* 2000; **77**: S19-25.
53. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; **5**(5): 561-8.
54. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; **52**(1): 1-8.
55. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003; **26**(5): 1589-96.
56. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; **17**(1): 24-38.
57. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **212**(2): 167-78.
58. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 1996; **29**(2): 169-202.
59. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; **416**(1): 15-8.

60. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; **404**(6779): 787-90.
61. Sadi G, Yilmaz O, Guray T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol Cell Biochem* 2008; **309**(1-2): 109-116.
62. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2005; **135**(10): 2299-304.
63. Hurdag C, Uyaner I, Gurel E, Utkusavas A, Atukeren P, Demirci C. The effect of alpha-lipoic acid on NOS dispersion in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2008; **22**(1): 56-61.
64. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; **87**(1): 315-424.
65. Di Naso FC, de Mello RN, Bona S, Dias AS, Porawski M, Ferraz Ade B *et al.* Effect of *Agaricus blazei* Murill on the pulmonary tissue of animals with streptozotocin-induced diabetes. *Experimental diabetes research* 2010; **2010**: 543926.
66. Di Naso FC, Simoes Dias A, Porawski M, Marroni NA. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Experimental diabetes research* 2011; **2011**: 754132.
67. Locatelli I, Sutti S, Vacchiano M, Bozzola C, Albano E. NF-kappaB1 deficiency stimulates the progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice by promoting NKT-cell-mediated responses. *Clinical science* 2013; **124**(4): 279-87.
68. Knowlton AA. NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovascular research* 2006; **69**(1): 7-8.
69. Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 2005; **24**(3): 232-8.
70. Zolotnik IA, Figueroa TY, Yaspelkis BB, 3rd. Insulin receptor and IRS-1 co-immunoprecipitation with SOCS-3, and IKKalpha/beta phosphorylation are increased in obese Zucker rat skeletal muscle. *Life sciences* 2012; **91**(15-16): 816-22.

71. Schattenberg JM, Schuppan D. Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Current opinion in lipidology* 2011; **22**(6): 479-88.
72. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine* 2002; **346**(16): 1221-31.
73. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *Journal of clinical gastroenterology* 2006; **40 Suppl 1**: S5-10.
74. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003; **124**(1): 71-9.
75. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; **40**(6): 1387-95.
76. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; **42**(1): 44-52.
77. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000; **45**(10): 1929-34.
78. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; **30**(6): 1356-62.
79. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; **115**(5): 1343-51.
80. Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**(2): G194-8.
81. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; **271**(5249): 665-8.
82. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ *et al.* Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; **107**(5): 450-5.
83. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A *et al.* Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases

- procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**(3): 1044-50.
84. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest* 1995; **96**(5): 2461-8.
 85. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *The Journal of nutritional biochemistry* 2008; **19**(8): 491-504.
 86. Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 2008; **43**(11): 811-22.
 87. Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *Jama* 2003; **289**(22): 3000-4.
 88. Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; **8**(4): 861-79, ix.
 89. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; **22**(6): 1714-9.
 90. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I *et al*. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; **118**(6): 1117-23.
 91. Mitra S, Bansal VS, Bhatnagar PK. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug discovery today* 2008; **13**(5-6): 211-8.
 92. Powell K. Obesity: the two faces of fat. *Nature* 2007; **447**(7144): 525-7.
 93. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**(5091): 87-91.
 94. Wang Z, Lv J, Zhang R, Zhu Y, Zhu D, Sun Y *et al*. Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 2006; **345**(3): 976-83.
 95. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E *et al*. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001; **409**(6821): 729-33.
 96. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; **114**(4): 842-5.

97. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of biological chemistry* 2005; **280**(1): 847-51.
98. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of lipid research* 2007; **48**(9): 1905-14.
99. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M *et al.* Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006; **38**(5-6): 782-93.
100. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* 2011; **29**: 415-45.
101. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; **444**(7121): 860-7.
102. Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 2005; **54 Suppl 2**: S73-8.
103. Musi N, Goodyear LJ. Insulin resistance and improvements in signal transduction. *Endocrine* 2006; **29**(1): 73-80.
104. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; **306**(5695): 457-61.
105. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 2004; **114**(12): 1752-61.
106. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; **103**(2): 239-52.
107. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**(5): 1739-44.
108. Zhang X, Xu A, Chung SK, Cresser JH, Sweeney G, Wong RL *et al.* Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes* 2011; **60**(2): 486-95.

109. Bikman BT, Zheng D, Reed MA, Hickner RC, Houmard JA, Dohm GL. Lipid-induced insulin resistance is prevented in lean and obese myotubes by AICAR treatment. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010; **298**(6): R1692-9.
110. Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta* 2007; **1773**(8): 1341-8.
111. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE *et al.* JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006; **43**(1): 163-72.
112. da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA *et al.* Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *European journal of applied physiology* 2011; **111**(9): 2015-23.
113. Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 2012; **143**(2): 307-20.
114. Hooper PL, Hooper PL. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell stress & chaperones* 2009; **14**(2): 113-5.
115. Swindell WR. Heat shock proteins in long-lived worms and mice with insulin/insulin-like signaling mutations. *Aging* 2009; **1**(6): 573-7.
116. Stephanou A, Isenberg DA, Nakajima K, Latchman DS. Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90beta gene promoters. *The Journal of biological chemistry* 1999; **274**(3): 1723-8.
117. Ahn SG, Thiele DJ. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes & development* 2003; **17**(4): 516-28.
118. Kume M, Yamamoto Y, Yamagami K, Ishikawa Y, Uchinami H, Yamaoka Y. Pharmacological hepatic preconditioning: involvement of 70-kDa heat shock proteins (HSP72 and HSP73) in ischaemic tolerance after intravenous administration of doxorubicin. *The British journal of surgery* 2000; **87**(9): 1168-75.
119. Ellis S, Killender M, Anderson RL. Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2000; **48**(3): 321-32.

120. Gabai VL, Meng L, Kim G, Mills TA, Benjamin IJ, Sherman MY. Heat shock transcription factor Hsf1 is involved in tumor progression via regulation of hypoxia-inducible factor 1 and RNA-binding protein HuR. *Molecular and cellular biology* 2012; **32**(5): 929-40.
121. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* 2003; **52**(9): 2338-45.
122. Park J, Liu AY. JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *Journal of cellular biochemistry* 2001; **82**(2): 326-38.
123. Thompson HS, Maynard EB, Morales ER, Scordilis SP. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta physiologica Scandinavica* 2003; **178**(1): 61-72.
124. Ohno Y, Yamada S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K. A possible role of NF-kappaB and HSP72 in skeletal muscle hypertrophy induced by heat stress in rats. *General physiology and biophysics* 2010; **29**(3): 234-42.
125. Song M, Pinsky MR, Kellum JA. Heat shock factor 1 inhibits nuclear factor-kappaB nuclear binding activity during endotoxin tolerance and heat shock. *Journal of critical care* 2008; **23**(3): 406-15.
126. Jijon H, Allard B, Jobin C. NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cellular signalling* 2004; **16**(9): 1023-32.
127. Marucci A, Miscio G, Padovano L, Boonyasrisawat W, Florez JC, Doria A *et al.* The role of HSP70 on ENPP1 expression and insulin-receptor activation. *Journal of molecular medicine* 2009; **87**(2): 139-44.
128. Zacharyus JL, Benatmane S, Plas C. Role of Hsp70 synthesis in the fate of the insulin-receptor complex after heat shock in cultured fetal hepatocytes. *Journal of cellular biochemistry* 1996; **61**(2): 216-29.
129. Guo W, Yang Z, Xia Q, Liu J, Yu Y, Li J *et al.* Arsenite stabilizes HIF-1alpha protein through p85alpha-mediated up-regulation of inducible Hsp70 protein expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011; **68**(3): 475-88.
130. Liu J, Zhang D, Mi X, Xia Q, Yu Y, Zuo Z *et al.* p27 suppresses arsenite-induced Hsp27/Hsp70 expression through inhibiting JNK2/c-Jun- and HSF-1-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**(34): 26058-65.

131. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; **193**(4251): 415-7.
132. Degenhardt TP, Fu MX, Voss E, Reiff K, Neidlein R, Strein K *et al.* Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; **43**(2): 81-9.
133. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; **72**: 248-54.
134. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; **52**: 302-10.
135. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680-5.
136. Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association* 2005; **18**(5): 365-70.
137. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in enzymology* 1984; **105**: 328-31.
138. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; **247**(10): 3170-5.
139. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 2003; **419**(1): 31-40.
140. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Southan GJ, Salzman AL, Radi R. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**(14): 9030-6.
141. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998; **47**(7): 1114-20.
142. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME. Aminoguanidine ameliorates overexpression of prosclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**(10): 2098-107.

143. Di Naso FC, Rodrigues G, Simoes Dias A, Porawski M, Fillmann H, Marroni NP. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 2012; **26**(5): 378-81.
144. Di Naso FC, Forgiarini Junior LA, Forgiarini LF, Porawski M, Dias AS, Marroni NA. Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 2010; **36**(4): 485-9.
145. Stadler K, Jenei V, von Bolcschazy G, Somogyi A, Jakus J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic Biol Med* 2003; **35**(10): 1240-51.
146. Ren XY, Li YN, Qi JS, Niu T. Peroxynitrite-induced protein nitration contributes to liver mitochondrial damage in diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2008; **22**(5): 357-64.
147. Kameyama N, Arisawa S, Ueyama J, Kagota S, Shinozuka K, Hattori A *et al.* Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase Calpha and NF-kappaB p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1782**(5): 355-60.
148. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2011; **34**(3): 274-85.
149. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Seminars in liver disease* 2008; **28**(4): 339-50.
150. Milic S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Digestive diseases* 2012; **30**(2): 158-62.
151. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, Zoppini G *et al.* NASH predicts plasma inflammatory biomarkers independently of visceral fat in men. *Obesity* 2008; **16**(6): 1394-9.
152. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O *et al.* Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008; **57**(9): 2438-44.
153. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2006; **281**(17): 12093-101.

154. Tarantino G, Caputi A. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2011; **17**(33): 3785-94.
155. Wigmore SJ, Sangster K, McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Fearon KC *et al.* De-repression of heat shock transcription factor-1 in interleukin-6-treated hepatocytes is mediated by downregulation of glycogen synthase kinase 3beta and MAPK/ERK-1. *International journal of molecular medicine* 2007; **19**(3): 413-20.
156. Thayer JM, Mirkes PE. Induction of Hsp72 and transient nuclear localization of Hsp73 and Hsp72 correlate with the acquisition and loss of thermotolerance in postimplantation rat embryos. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1997; **208**(2): 227-43.
157. Rodrigues-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C *et al.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell stress & chaperones* 2012; **17**(3): 293-302.
158. Maina V, Sutti S, Locatelli I, Vidali M, Mombello C, Bozzola C *et al.* Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. *Clinical science* 2012; **122**(11): 545-53.
159. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of hepatology* 2009; **51**(1): 212-23.
160. Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert opinion on therapeutic targets* 2009; **13**(4): 469-78.
161. Singh IS, He JR, Calderwood S, Hasday JD. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**(7): 4981-8.

ANEXO I



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP- 830/12

Porto Alegre, 24 de setembro de 2012.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05594 intitulado **"Avaliação do estresse oxidativo em obesos mórbidos, seu comportamento após o emagrecimento e sua relação com a doença hepática gordurosa não alcoólica"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Cláudio Corá Mottin
HSL
Nesta Universidade

PUC

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Avaliação do estresse oxidativo em obesos mórbidos e sua relação com a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

Objetivo Principal: Avaliar marcadores inflamatórios e relacionar com a progressão da DHGNA.

Resumo dos procedimentos: O presente estudo consiste de uma avaliação da biópsia hepática e de gordura de participantes que serão submetidos à cirurgia bariátrica. Durante o procedimento cirúrgico será realizada biópsia hepática e de gordura por agulha, para avaliar a condição do fígado.

Possíveis riscos e desconfortos: os procedimentos não implicarão em risco à saúde, adicionais aos riscos inerentes à cirurgia bariátrica.

Benefícios previstos: Conhecimento sobre a condição de saúde do fígado e controle e tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica. Os resultados serão apresentados e discutidos com a equipe de saúde responsável. Declaro que fui informado dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas dados consolidados serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores terá acesso aos nomes dos participantes da pesquisa. Entendo também que tenho direito a receber informação adicional sobre o estudo a qualquer momento, mantendo contato com o pesquisador principal e/ou orientador da pesquisa. Fui informado, ainda, que a participação é voluntária e se preferir não participar ou deixar de participar deste estudo a qualquer momento a equipe de pesquisa compreenderá a opção. Declaro, também, que compreendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo a que se refere este documento.

Assinatura do
participante:.....

Assinatura do pesquisador
responsável:.....

Porto Alegrede.....de 20____.

Pesquisador: