

## ALTERAÇÕES GÊNICAS ENVOLVIDAS NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS WISTAR

Luiza Mayara P. Silva<sup>1\*</sup>, Vanessa P. F. F. Neves<sup>2</sup>, Jaime D. Medeiros<sup>3</sup>, José Jairo T. Silva<sup>4</sup>,  
Julia Braga Pereira<sup>1</sup>, Glória I. B. P. Duarte<sup>5</sup>, Luiza A. Rabelo<sup>6</sup>, Valéria Nunes-Souza<sup>7</sup>

1. Estudantes do Curso de Biomedicina – UFPE

2. Estudante do Curso de Enfermagem – UFAL

3. Estudante de Doutorado RENORBIO – UFAL

4. Estudante de Doutorado PG-Bioquímica e Fisiologia – UFPE

5. Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

6. Docente/pesquisador do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL

7. Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – UFPE / Orientador

### Resumo:

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) são agravos crônicos decorrentes da infiltração lipídica no fígado. Objetivo: avaliar as alterações gênicas relacionadas às vias de sinalização lipídica, inflamatória e mitocondrial envolvidas na DHGNA. Ratos machos Wistar foram alimentados com dieta “high fat” (Grupo HFD, 58,4% kcal-lipídios) e dieta padrão (Grupo controle-CT). Avaliou-se: indução de obesidade, perfil glicêmico sistêmico, indução da DHGNA e mudanças gênicas (mRNA para PPAR $\alpha$ , UCP2, CCL2 e CD68) no fígado. Comparado ao grupo CT, os animais HFD apresentaram obesidade (elevado peso corporal e adiposidade), intolerância à glicose, resistência à insulina, aumento hepático de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos, bem como elevada atividade da ALT plasmática. Interessantemente, observou-se aumento significativo de mRNA para PPAR $\alpha$ , UCP2, CCL2 e CD68 no fígado do grupo HFD, indicando que alterações gênicas relacionadas com as vias supracitadas estão envolvidas nas DHGNA.

### Autorização legal:

Aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFPE (Protocolo 0012-2016).

### Palavras-chave:

Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas; Esteatohepatite; Dieta hipercalórica e hiperlipídica.

### Introdução:

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) são agravos crônicos, decorrentes da infiltração de gordura no fígado na ausência de consumo em longo prazo de etanol e/ou outras causas conhecidas de doença hepática (LIRIO et al., 2016), progredindo para esteatohepatite não alcoólica (HASHIMOTO, TOKUSHIGE, LUDWIG, 2014). Por sua vez, esta condição caracteriza-se por esteatose, inflamação e fibrose, em último estágio podendo evoluir para cirrose e hepatocarcinoma (MULDER et al., 2015; STÅL, 2015). Neste cenário, as DHGNA configuram como sério problema de saúde pública (HASHIMOTO, TOKUSHIGE, LUDWIG, 2014), visto não apenas à elevada morbidade relacionada ao fígado, mas, principalmente, por afetar vários órgãos extra-hepáticos, como coração e rins, e várias vias de regulação, a exemplo da via glicêmica, o que caracteriza a DHGNA como uma doença multissistêmica (BYRNE & TARGHER, 2015; CHACKO & REINUS, 2016).

Os eventos hepáticos da DHGNA decorrem, principalmente, da disfunção mitocondrial, resultante da sobrecarga do sistema de oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e, em sequência, a peroxidação lipídica e inflamação (SATAPATI et al., 2015; CHENG et al., 2016). Sinergicamente, o estresse oxidativo, condição decorrente do desequilíbrio entre os processos oxidativos e aqueles antioxidantes, e a indução de citocinas pró-inflamatórias promovem a progressão da esteatohepatite para fibrose e cirrose (MULDER et al., 2015; STÅL, 2015; NUNES-SOUZA et al., 2016a). Ademais, a elevação das taxas de doenças metabólicas, como a DHGNA, decorre, majoritariamente, das mudanças dietéticas observadas na atualidade e associadas ao sedentarismo (ALBERTI et al., 2009; BYRNE, TARGHER, 2014). Nesta direção, a deposição lipídica ectópica hepática cresce exponencialmente, contrária à qualidade e à quantidade de nutrientes (BREIJ, KERKHOF, HOKKEN-KOELEGA, 2014). Além disso, vias inflamatórias e oxidativas hepáticas, mediadas pelo elevado metabolismo oxidativo mitocondrial em situação de dieta “high fat”, exercem um papel relevante na progressão da doença (SATAPATI et al., 2015). Dessa forma, torna-se relevante a investigação da participação de vias relacionadas ao metabolismo mitocondrial, inflamatório e oxidativo, tanto na indução quanto progressão da DHGNA e, desta forma, contribuir para elucidação da patogênese da mesma.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações gênicas relacionadas com as vias lipídica, inflamatória e mitocondrial envolvidas na DHGNA.

### Metodologia:

No presente estudo, utilizaram-se ratos Wistar machos de oito semanas de idade obtidos no Biotério do Departamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Protocolo CEUA: 0012/2016). Mantiveram-se os animais em condições padrão de experimentação, com livre acesso à água e alimentação *ad libitum*, e foram randomizados em dois grupos: grupo submetido à dieta padrão (“chow”, CT) e grupo experimental HFD, submetido à dieta hipercalórica (58,4% kcal lipídios) por oito semanas.

Semanalmente, mensurou-se o peso corporal dos animais em balança. Para os testes metabólicos, realizaram-se: teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. O teste de tolerância à glicose foi realizado com restrição alimentar noturna de 12 horas, injetando-se glicose intraperitoneal (dose  $2 \text{ g.kg}^{-1}$  de peso corporal). Para a realização do teste de sensibilidade à insulina, os animais foram mantidos no estado alimentado. A seguir, administrou-se, por via intraperitoneal,  $0,5 \text{ UI de insulina.kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Para ambos os testes, mensurou-se a concentração de glicose antes da aplicação (basal) e após, nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (NUNES-SOUZA et al., 2016a) em glicosímetro (Accu-Chek® Performa; Roche®).

Os animais foram sacrificados sob plano anestésico (cetamina e xilazina;  $110/10 \text{ mg/kg}$ ; i.p.) seguido de punção cardíaca. Coletou-se, além de sangue, o fígado e o tecido adiposo branco epididimal e perirenal, os quais foram pesados e armazenados em freezer  $-80^\circ\text{C}$ . O index de adiposidade foi calculado:  $\text{Index (\%)} = \{(\text{epididimal (g)} + \text{perirenal (g)})/(\text{peso corporal (g)})\} * 100$ . Na análise da lesão hepática, mensurou-se a atividade plasmática da enzima alanina aminotransferase (ALT) por “kit” colorimétrico comercial (Labtest®). Para avaliação do perfil lipídico hepático, foram extraídos os lipídios totais pela técnica de FOLCH (FOLCH et al., 1957). A partir dos extratos lipídicos, avaliaram-se os níveis de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos não esterificados por “kits” comerciais (Labtest® e Wako Chemicals®, respectivamente).

Avaliou-se a expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Isolou-se o RNA total do fígado utilizando-se trizol (TRizol® Reagent), quantificado por espectrofotometria e utilizado para a síntese de DNA complementar (DNAC) pela transcriptase reversa (Promega®). Na sequência, amplificou-se o produto obtido usando a GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®) por PCR em tempo real. O RNA mensageiro foi quantificado como valor relativo comparado com uma referência interna, o GAPDH. Os valores foram obtidos pelo parâmetro  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (NUNES-SOUZA et al., 2016b). Os genes de interesse foram: receptor ativado por proliferador peroxissomo (PPAR $\alpha$ ); proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2); proteína quimioatraente monocitária 1 (MCP-1 ou CCL2); Cluster of Differentiation 68 (CD68). Os dados obtidos foram analisados através do teste T de “Student” não pareado. Consideraram-se estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### Resultados e Discussão:

Ao final do período experimental, os animais HFD apresentaram maior peso corporal ( $\text{CT}=320,6 \pm 21,7$  vs  $\text{HFD}=412,9 \pm 6,4$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=4$ ) e elevado index de adiposidade ( $\text{CT}=3,11 \pm 0,61$  vs  $\text{HFD}=5,74 \pm 0,37$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=4$ ) comparados aos ratos controle, caracterizando-se a indução da obesidade por ingestão de dieta “high fat” durante 8 semanas. Para os testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, na análise da curva glicêmica em função do tempo, observa-se um aumento significativo da glicemia em função do tempo do grupo HFD comparado ao CT, demonstrando uma intolerância à glicose (Área sob a curva-ASC -  $\text{CT}=21756 \pm 1903$  vs  $\text{HFD}=31434 \pm 730,7$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=5$ ) e resistência à insulina (ASC -  $\text{CT}=7847 \pm 249,0$  vs  $\text{HFD}=10599 \pm 318,8$ ;  $p < 0,001$ ;  $n=5$ ) induzidas por dieta “high fat”. Interessantemente, o grupo HFD apresentou um aumento significativo da atividade da ALT plasmática comparado ao grupo CT ( $\text{CT}=5,33 \pm 0,75$  vs  $\text{HFD}=10,70 \pm 1,8$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), indicando-se lesão dos hepatócitos. Somando-se, estes animais apresentaram maior deposição lipídica hepática, observada pelos elevados níveis de triglicerídeos ( $\text{CT}=2,33 \pm 0,21$  vs  $\text{HFD}=3,20 \pm 0,20$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), colesterol ( $\text{CT}=1,40 \pm 0,03$  vs  $\text{HFD}=1,88 \pm 0,13$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) e ácidos graxos não esterificados ( $\text{CT}=0,62 \pm 0,11$  vs  $\text{HFD}=1,24 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ), caracterizando um modelo roedor para esteatose hepática. Em conjunto, os dados indicam a indução da DHGNA associada à obesidade e mudanças glicêmicas induzidas por uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (FRAULOB et al., 2010; BARBOSA-DA-SILVA et al., 2014; MILIĆ et al., 2014; NUNES-SOUZA, et al., 2016a).

Na análise gênica, observou-se aumento significativo do PPAR $\alpha$  ( $\text{CT}=1,04 \pm 0,15$  vs  $\text{HFD}=2,06 \pm 0,22$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=5$ ), UCP2 ( $\text{CT}=0,9 \pm 0,11$  vs  $\text{HFD}=1,5 \pm 0,19$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ), CCL2 ( $\text{CT}=0,81 \pm 0,11$  vs  $\text{HFD}=1,45 \pm 0,09$ ;  $p < 0,01$ ;  $n=5$ ) e CD68 ( $\text{CT}=1,1 \pm 0,2$  vs  $\text{HFD}=2,1 \pm 0,36$ ;  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) nos animais HFD comparado aos CT. O PPAR $\alpha$  regula a expressão de genes relacionados com a beta-oxidação de ácidos graxos, sendo, portanto, um regulador do metabolismo lipídico (GRYGIEL-GÓRNIK, 2014; JIAO et al., 2014). Uma vez que a demanda de ácidos graxos para o fígado é maior no HFD, o aumento da expressão deste gene pode representar a tentativa do órgão em aumentar a beta-oxidação mitocondrial destes. Por conseguinte, esta condição induz estresse oxidativo e inflamação, os quais, neste trabalho, foram evidenciados pelo aumento de mRNA para UCP2, para combater o aumento de espécies reativas (KUHILA, et al., 2010; NUNES-SOUZA, et al., 2016b), e o aumento de mRNA para CCL2 e CD68, marcadores inflamatórios para monócitos e macrófagos (HUANG, et al., 2016). Neste sentido, os dados indicam que a indução e progressão da esteatose para esteatohepatite envolvem mudanças gênicas para os alvos avaliados.

### Conclusões:

Em conclusão, têm-se alterações gênicas relacionadas às vias lipídica, inflamatória e mitocondrial envolvidas na DHGNA associada à obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina. Tal fenótipo metabólico decorre da ingestão de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica.

## Referências bibliográficas

- Alberti, K. G.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, 2009.
- Barbosa da Silva, S.; Silva, N. C.; Aguilá, M. B., & Mandarim de Lacerda, C. A., Liver damage is not reversed during the lean period in diet induced weight cycling in mice. **Hepatology Research**, v. 44, n. 4, p. 450-459, 2014.
- Breij, L. M.; Kerkhof, G. F.; Hokken-Koelega, A. C. Accelerated infant weight gain and risk for nonalcoholic Fatty liver disease in early adulthood. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 99, n. 4, p. 1189-95, 2014.
- Byrne, C. D.; Targher, G. Ectopic Fat, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n.6, p.1155-61 2014.
- Byrne, C.D.; Targher, G. NAFLD: A multisystem disease. **Journal of Hepatology**, v. 62 j S47–S64, 2015.
- Chacko, K.R.; Reinus, J. Extrahepatic Complications of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clin Liver Dis**. v.20, n.2, p.387-401, 2016.
- Cheng, Y.; Mai, J.; Hou, T.; Ping, J. MicroRNA-421 induces hepatic mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease mice by inhibiting sirtuin 3. **Biochem Biophys Res Commun**. v.20, n.474(1), p. 57-63, 2016.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- Fraulob, J. C.; Ogg-Diamantino, R.; Fernandes-Santos, C.; Aguilá, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 46, n.3, p. 212-223, 2010.
- Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. **Nutrition Journal**, v. 13, n.17, 2014.
- Hashimoto, E.; Tokushige, K.; Ludwig, J. Diagnosis and Classification of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Current Concepts and Remaining Challenges. **Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology**. v. 45, n.1, p.20-8. 2014.
- Huang, R.; Liu, Y.; Xiong, Y. et al. Curcumin protects against liver fibrosis by attenuating infiltration of Gr1hi monocytes through inhibition of monocyte chemoattractant protein-1. **Discov Med**. v.21, n.118, p.447-57, 2016.
- Jiao, M.; Ren, F.; Zhou, L. et al., Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation attenuates the inflammatory response to protect the liver from acute failure by promoting the autophagy pathway. **Cell Death and Disease** v.5, p. e1397, 2014.
- Kuhla, A.; Hettwer, C.; Menger, M. D.; Vollmar, B. Oxidative stress-associated rise of hepatic protein glycation increases inflammatory liver injury in uncoupling protein-2 deficient mice. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 90, n. 8, p. 1189-98, 2010.
- Lirio, L.M.; Forechi, L.; Zanardo, et al. Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension. **Journal of Diabetes and Its Complications**. v.30, p.85–92, 2016.
- Milić, S.; Lulić, D.; Štimac, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J Gastroenterol**. v. 28, n. 20(28), p. 9330-9337, 2014.
- Mulder, P.; Morrison, M.C.; Wielinga, P.Y.; van Duyvenvoorde, W.; Kooistra, T.; and Kleemann, R. Surgical removal of inflamed epididymal white adipose tissue attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in obesity. **International Journal of Obesity**, v. 40, n.4, p.675-84, 2015.
- Nunes-Souza, V.; Cesar-Gomes, C.J.; Fonseca LJS.; Guedes, GS.; Smaniotto S.; Rabelo, LA. Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: mprovement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016a.
- Nunes-Souza, V.; Alenina, N.; Qadri, F.; Penninger, J. M.; Santos, R. A. S.; Bader, M.; Rabelo, L. A. CD36/Sirtuin 1 Axis Impairment Contributes to Hepatic Steatosis in ACE2-Deficient Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016b.
- Satapati, S.; Kucejova, B.; Duarte, J.A.G.; et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. **J Clin Invest**. v. 125, n.12, p.4447–4462, 2015.
- Stål, P. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease – diagnostic challenge with prognostic significance. **World J Gastroenterol**. v.21, n. 39, p. 11077-87 2015.