

Darkiane Fernandes Ferreira

**Papel do receptor *toll-like 4* no metabolismo
lipídico hepático**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Dr^a. Thaís Martins de Lima

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Darkiane Fernandes

Papel do receptor toll-like 4 no metabolismo lipídico hepático / Darkiane
Fernandes Ferreira. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientadora: Thaís Martins de Lima.

Descritores: 1.Metabolismo dos lipídeos 2.Fígado 3.Toll-like receptor 4
4.Fígado gorduroso/metabolismo 5.Triglicérides 6.Ácidos graxos 7.Colesterol
8.Receptores de LDL 9.Camundongos Knockout

USP/FM/DBD-238/14

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Cordeiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List Journals Indexed in Index Medicus*.

*Aos meus pais, Pedro e Izabel, amigos e
auxiliadores de todos os momentos.*

*Às minhas irmãs, Kyria e Keyla,
pela amizade e apoio de sempre.*

Agradecimentos

A Deus, primeiramente, que é dono de todas as coisas e é Quem tem me sustentado.

Meus sinceros agradecimentos também à minha orientadora Dra. Thais Martins de Lima, pela confiança, ensino, ajuda, compreensão, paciência e presença estrita em todas as etapas para a concretização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza pela oportunidade, confiança, apoio e pelas muitas sugestões durante o curso deste trabalho.

Ao amigo Ricardo Petroni, pela disposição e paciência em ensinar e ajudar em muitos experimentos deste trabalho. A você, meu muito obrigada!

À Denise Frediani Barbeiro, por toda ajuda e conhecimento transmitido em muitas reações de PCR deste estudo.

À Sueli Ariga pelo auxílio com o analisador de imagens e pela ajuda de sempre para esclarecer dúvidas.

A Fátima Abatepaulo pelo auxílio com a parte histológica.

Ao Dr. Jarlei Fiamoncini pelas várias sugestões em inúmeras etapas deste trabalho.

A Kelli, secretária do LIM-51, pela competência, disposição e auxílio sempre que necessário.

Ao Geraldo pelas conversas e auxílio.

A todos os demais colegas do laboratório de investigação médica 51 (LIM-51) pelas conversas, amizade, apoio e incentivo.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelos fomentos disponibilizados para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Síndrome metabólica e a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD)	1
1.2.Patogênese da NAFLD	3
1.3.Patogênese da NASH	5
1.4.NAFLD e receptores Toll-like	6
2.HIPÓTESE	10
3.OBJETIVO	11
3.1.Estratégia	11
4.MÉTODOS	12
4.1. Animais e dietas	12
4.2. Coleta de sangue e fígado	13
4.3. Perfil lipídico plasmático	13
4.4. Extração de lipídios totais	13
4.5. Reação em cadeia de polimerase em tempo real	14
4.6. Análise estatística	16
5. RESULTADOS	18
5.1. Ganho de peso	18
5.2. Porcentagem de gordura epididimal e retroperitoneal	19
5.3. Perfil plasmático de lipídios	21
5.3.1.Triglicérides	21
5.3.2. Colesterol	23
5.3.3. Ácidos graxos livres	25
5.4. Perfil hepático de lipídios	27
5.4.1. Triglicérides	27
5.4.2. Colesterol	28
5.5. Modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese de triglicérides pelo fígado	29
5.5.1. ApoB100	29
5.5.2. GPAT1	30
5.5.3. GPAT4	31
5.5.4. MTPP	32

5.6. Modulação da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação de triglicérides pelo fígado	33
5.6.1. CPT 1	33
5.6.2. MTP	34
5.6.3. ACOX	36
5.6.4. PBE	37
5.6.5. Tiolase	38
5.7. Modulação da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação de colesterol pelo fígado	39
5.7.1. CYP7a1	39
5.8. Modulação da inflamação no fígado	40
5.8.1. F4/80	40
5.8.2. IL-1 β	41
5.8.3. IL-6	42
5.8.4. TNF- α	43
6. DISCUSSÃO	44
6.1. Considerações sobre o modelo experimental utilizado	44
6.2. A ausência do receptor TLR4 interfere no perfil plasmático de lipídios	46
6.3. A ausência do receptor TLR4 não altera a produção de TG pelo fígado	48
6.4. A ausência do receptor TLR4 aumenta a oxidação de AG pelo fígado	50
6.5. A ausência do receptor TLR4 favorece a excreção de colesterol	53
6.6. A ausência do receptor TLR4 altera a inflamação e a produção hepática de citocinas	54
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS	59

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AG	Ácidos Graxos
Apo	Apolipoproteína
B2M	Microglobulina beta 2
BiP	Proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina
COL	Colesterol
CPT1	Carnitina palmitoil aciltransferase 1
CYP2E1	Citocromo P-450 2E1
CYP7a1	Colesterol 7 α hidroxilase
DAG	Diacilglicerídeos
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase microsomal
Duplo KO	Deficiente para o receptor de LDL e TLR4
FABP	do inglês “Fatty Acid Binding Protein” traduzido por Proteína de ligação de ácido graxo
GPAT	Glicerol 3 fosfato aciltransferase
HDL	do inglês “High Density Lipoprotein” traduzido por Lipoproteína de alta densidade
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
Kg	Quilograma
LDLr KO	Deficiente para o receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDL	do inglês “Low Density Lipoprotein” traduzido por Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	do inglês “Monocyte chemotactic protein 1” traduzido por Proteína quimioatrativa de macrófagos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mTOR	do inglês “Mammalian target of rapamycin” traduzido por Alvos mamíferos da rapamicina
MTP	Proteína trifuncional mitocondrial

MTTP	do inglês “Microsomal triglyceride transfer protein” traduzido por Proteína de transferência de triglicerídeo microssomal
MUT	Mutado
MYD88	do inglês “Myeloid differentiation primary response gene (88)” traduzido por Gene de resposta primária de diferenciação mielóide
NAFLD	do inglês “Non-alcoholic Fatty Liver Disease” traduzido por Doença do fígado gorduroso não-alcoólico
NASH	do inglês “Non-alcoholic Steatohepatitis” traduzido por Esteatohepatite não-alcoólica
NF-κB	do inglês “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
nM	Nanometros
PAMPS	do inglês “Pathogen-associated molecular pattern” traduzido por Padrões moleculares associados a patógenos
PBE	Proteína β -bi/multifuncional
PPAR	do inglês “Peroxisome proliferator-activated receptor” traduzido por Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RNA	do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ” traduzido por Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
ROS	do inglês “Reactive Oxygen Species” traduzido por Espécies reativas de oxigênio
SR-B1	do inglês “scavenger receptor class BI” traduzido por Receptor scavenger de colesterol
SREBP	do inglês “Sterol regulatory element-binding protein” traduzido por Proteína ligante do elemento regulado por esteróides
TGF- β	do inglês “ <i>Transforming Growth Factor</i> ”
Tiol	Tiolase
TNF	do inglês “ <i>Tumor Necrosis Factor</i> ” traduzido por Fator de necrose tumoral
TLR	do inglês “Toll-like receptor” traduzido por Receptor <i>toll like</i>
TLR4 KO	Deficiente para o receptor <i>toll like 4</i>
TG	Triglicérides

VLDL do inglês "Very Low Density Lipoprotein" traduzido por Lipoproteína de muito baixa densidade

WT do inglês "Wild Type" traduzido por Tipo selvagem

μg Micrograma

μL Microlitro

Lista de Tabelas

Tabela I – Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para avaliação da expressão gênica	16
---	----

Lista de Figuras

Figura 1 – Ganho de peso dos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO após 12 semanas recebendo dieta normo ou hiperlipídica	18
Figura 2 – Proporção de gordura epididimal nos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO tratados com dieta normo ou hiperlipídica por 12 semanas	19
Figura 3 – Proporção de gordura retroperitoneal nos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO tratados com dieta normo ou hiperlipídica por 12 semanas	20
Figura 4 – Concentração de triglicérides plasmático após ingestão de dieta controle por diferentes períodos	22
Figura 5 – Concentração de triglicérides plasmático após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos	22
Figura 6 – Concentração de colesterol total plasmático após ingestão de dieta normolipídica por diferentes períodos	24
Figura 7 - Concentração de colesterol total plasmático após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos	24
Figura 8 - Concentração plasmática de ácidos graxos livres após ingestão de dieta normolipídica por diferentes períodos	26
Figura 9 - Concentração plasmática de ácidos graxos livres após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos	26
Figura 10 - Concentração de triglicérides hepático dos diferentes grupos após 12 semanas	27
Figura 11 - Concentração de colesterol hepático dos diferentes grupos após 12 semanas	28
Figura 12 - Expressão de ApoB100 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO)	29

- Figura 13** - Expressão de GPAT1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 30
- Figura 14** - Expressão de GPAT4 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 31
- Figura 15** - Expressão de MTTP nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 32
- Figura 16** - Expressão de CPT1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 33
- Figura 17** - Expressão de MTP- α nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 34
- Figura 18** - Expressão de MTP- β nos grupos de animais controle e deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para o receptor TLR4 e LDL (DuploKO) 35
- Figura 19** - Expressão de ACOX nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 36
- Figura 20** - Expressão de PBE nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 37
- Figura 21** - Expressão de tiolase nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (DuploKO) 38
- Figura 22** - Expressão de CYP7a1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 39
- Figura 23** - Expressão de F4/80 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 40
- Figura 24** - Expressão de IL1- β nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 41

Figura 25 - Expressão de IL-6 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 42

Figura 26 - Expressão de TNF- α nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO) 43

Resumo

Ferreira DF. *Papel do receptor toll-like 4 no metabolismo lipídico hepático* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Estudos recentes têm demonstrado uma participação importante do receptor *toll-like* 4 (TLR4) na evolução de doenças envolvendo desordens metabólicas, como a doença do fígado gorduroso não-alcoólico (NAFLD). No entanto, as alterações do metabolismo lipídico que poderiam ser influenciadas pela ativação do TLR4 são desconhecidas. Neste estudo propomos caracterizar o papel do receptor TLR4 no metabolismo de lipídios no fígado de camundongos deficientes para o receptor de LDL, um modelo que desenvolve NAFLD quando submetido a uma dieta rica em gordura saturada e colesterol. Camundongos controle (C57 black6), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO), deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO) ou deficientes para ambos (duplo KO) receberam dieta controle ou hiperlipídica por quatro, oito ou doze semanas. Após o tratamento e sacrifício dos animais, avaliamos o perfil de lipídios plasmáticos, o conteúdo de lipídios do fígado e a expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese e degradação de triglicerídeos (TG) e colesterol no fígado. O perfil inflamatório no fígado também foi avaliado. A dieta hiperlipídica induziu uma hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia nos animais LDLr KO e duplo KO, sendo que o grupo duplo KO apresentou níveis séricos inferiores de triglicérides (TG) e ácidos graxos livres a partir de oito semanas de tratamento em comparação aos animais LDLrKO. A dieta hiperlipídica também induziu um aumento significativo no conteúdo de TG e de colesterol no fígado de todos os grupos. Na análise da expressão gênica não foram encontradas diferenças na expressão de proteínas relacionadas à síntese de triglicérides e colesterol (ApoB100, MTTP, GPAT1 e GPAT4) entre os grupos. Porém houve aumento significativo na expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos (CPT1, MTP, ACOX, PBE, tiolase) e à síntese de ácidos biliares (CYP7a1) no grupo duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO. No perfil inflamatório, a expressão de F4/80 demonstrou infiltração de macrófagos significativamente elevada no grupo LDLrKO tratado com a dieta hiperlipídica comparada a todos os outros grupos. No entanto, houve maior expressão de IL-6, IL-1 β e TNF- α no grupo duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO. Nossos dados sugerem que a ativação do TLR4 no fígado de animais alimentados com uma dieta hiperlipídica pode contribuir para o acúmulo de lipídios e início da esteatose hepática. Estratégias para a inativação hepática do TLR4 podem diminuir a NAFLD não somente devido a diminuição da inflamação, mas por aumentar a oxidação de ácidos graxos no fígado.

Descritores: metabolismo dos lipídeos, fígado, Toll-like receptor 4, fígado gorduroso/metabolismo, triglicérides, ácidos graxos, colesterol, receptores de LDL, camundongos Knockout

Summary

Ferreira DF. *Role of toll-like receptor 4 in hepatic lipid metabolism* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Recent studies have shown an important role of *toll-like* receptor 4 (TLR4) in the evolution of diseases involving metabolic disorders, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, changes in lipid metabolism regulated by TLR4 activation are still unknown. In this study, we characterized the role of TLR4 receptor in hepatic lipid metabolism of mice deficient for the LDL receptor, a model that develops NAFLD when exposed to a diet rich in saturated fat and cholesterol. We investigated the role of TLR4 activation in the pathogenesis of diet-induced NAFLD by crossing LDLr KO mice with the TLR4 knockout mice (double KO). Animals were fed for 4, 8 or 12 weeks with high-fat diet (HFD) containing 18% saturated fat and 1.25% cholesterol. We evaluated plasma lipid profile, hepatic lipid content and gene expression of enzymes related to the synthesis and degradation of triglycerides and cholesterol in the liver. Liver inflammatory status was also investigated. We observed that HFD induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in LDLr KO and double KO mice, but double KO animals presented lower serum levels of triglycerides and free fatty acids after eight weeks of treatment. HFD also induced a significant increase in liver contents of triglycerides (TG) and of cholesterol in all groups. We did not find differences in the expression of proteins related to triglycerides and cholesterol synthesis (ApoB100, MTP, GPAT1, GPAT4) between the groups. However, we observed a significant increase in the expression of proteins related to fatty acid oxidation (CPT1, MTP, ACOX, PBE, tiolase) and bile acid synthesis (CYP7a1) in double KO group in comparison to LDLr KO. Regarding the inflammatory process, F4/80 expression was elevated in LDLr KO mice fed HFD when compared to all groups. On the other hand, IL-6, IL-1 β e TNF- α expression was induced by HFD only in double KO mice. Taken together, our results show that TLR4 activation in liver from mice fed on a high-fat diet may contribute to lipid accumulation and steatosis onset. Strategies regarding localized TLR4 inactivation may increase the oxidation of fatty acids and improve NAFLD not only due to decreased inflammation.

Descriptors: lipid metabolism, liver, Toll-like receptor 4, fatty liver/ metabolism, triglycerides, fatty acids, cholesterol, receptors, LDL, mice Knockout

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Síndrome metabólica e a doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD)

O sedentarismo, juntamente com o excesso no consumo de açúcares e gorduras na dieta, tem contribuído para um ganho de peso epidêmico nas sociedades ocidentais. Recentes estudos epidemiológicos sugerem um risco aumentado de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II em indivíduos obesos e com sobrepeso. Da mesma forma, a incidência da síndrome metabólica e da doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD), que podem preceder o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, também estão aumentando (1).

Embora uma associação entre diferentes anormalidades metabólicas tenha sido notada por vários anos, a síndrome metabólica foi publicamente descrita em 1998 por Reaven (2). A definição do Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (3) define as variáveis referentes à síndrome metabólica: obesidade abdominal, dislipidemia aterogênica (hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL- colesterol), hipertensão arterial, resistência à insulina (com ou sem intolerância à glicose) e estados pró-inflamatórios e pró-trombóticos. Trata-se de um conjunto de fatores metabólicos relacionados ao risco cardiovascular que também predizem a um alto risco de desenvolvimento

de diabetes, se este já não estiver presente (4). Acredita-se que a resistência à insulina seja o ponto central no desenvolvimento da síndrome (5).

A doença do fígado gorduroso não alcoólico (NAFLD) é uma morbidade fortemente associada à síndrome metabólica. Trata-se de um emergente e importante problema de saúde pública mundial e se refere a um espectro de doenças que incluem graus variáveis, de simples esteatose (NAFLD) a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e cirrose. É caracterizada por um acúmulo de triglicérides nos hepatócitos (esteatose hepática) > 5% por quilo de peso do fígado na presença de <10 g de consumo de álcool diário (6, 7). Sua prevalência é estimada em cerca de 34% na população total, enquanto que a obesidade com a NAFLD varia entre 30% e 100%. A prevalência da NAFLD dentro do diabetes tipo II fica entre 10 a 75% (8).

A hiperinsulinemia e a resistência à insulina desempenham o maior papel na patogênese da NAFLD (9). Além disso, a obesidade associa-se comumente à NAFLD e, juntamente com a resistência à insulina, fornece suporte para a evidente associação entre obesidade, síndrome metabólica e NAFLD (1). Atualmente a NAFLD é considerada a representação hepática da síndrome metabólica (9). A simples esteatose é benigna, enquanto a NASH é definida pela presença de injúria nos hepatócitos, inflamação e/ou fibrose que pode levar a cirrose, falência hepática e carcinoma hepatocelular (7).

1.2 - Patogênese da NAFLD

Na etiologia molecular da NAFLD, sugere-se que a predisposição genética associada a fatores ambientais desempenhem papéis relevantes (10), porém a fisiopatologia da doença não se encontra totalmente elucidada.

Day e James (11) propuseram uma hipótese de dois sinais de insulto para explicar a presença da esteatose e a sua progressão para inflamação (NASH), fibrose e cirrose que podem ser vistas na NAFLD. O primeiro insulto é a esteatose hepática, ou seja, a NAFLD em sua forma simples, desenvolvida por um desbalanço na formação/ excreção de triglicérides (TG). Sob condições fisiológicas, os ácidos graxos (AG) são transportados para vários órgãos, incluindo fígado e músculo esquelético. Posteriormente, esses AG são metabolizados através da β - oxidação mitocondrial ou podem ser armazenados sob a forma de triglicérides, sendo que esses estoques de TG hepático originam-se principalmente da lipólise do tecido adiposo branco (12). Os demais estoques lipídicos do fígado derivam-se de AG provenientes da dieta ou da lipogênese. Desbalanços nessas vias promovem aumento no fluxo de AG para o fígado e músculo esquelético levando ao acúmulo de TG nesses tecidos o que prejudica a responsividade do organismo à insulina de forma sistêmica (13-15).

A resistência à insulina no tecido adiposo favorece e predispõe a esteatose hepática e isto acontece devido à inibição da regulação da lipase do tecido (16). Como consequência, grandes quantidades de AG livres são liberadas, o que expõe o fígado a um excessivo fluxo de AG (17), culminando em acúmulo de lipídios intra-hepático e em resistência à insulina através do

acúmulo de intermediários lipídicos tóxicos, em especial diacilglicerídeos (DAG) e ceramidas (18).

Além do fluxo aumentado de AG livres para o fígado, outros mecanismos também podem favorecer a esteatose hepática. A hiperinsulinemia inibe a ação da enzima carnitina palmitoil acil transferase (CPT1) reduzindo a β -oxidação mitocondrial de AG o que pode facilitar o acúmulo de lipídios intra-hepáticos (19). Sob condições de hiperinsulinemia, hepatócitos apresentam uma resposta paradoxal à estimulação da insulina. A insulina ativa o SREBP1c, um fator de transcrição regulador da síntese lipídica através da estimulação do complexo mTOR1. Isso resulta em aumento da lipogênese (20, 21) e dos depósitos de lipídios hepáticos acelerando o desenvolvimento da doença (7).

Outra ação da insulina no fígado é restringir a produção de VLDL. A hiperinsulinemia pode prejudicar a síntese/secreção de Apo B100 e desta forma diminuir a excreção de lipídios pelo fígado. Entretanto, um estado de resistência à insulina associado a hiperfluxo de AG para o fígado e à ausência dos efeitos da insulina na inibição da síntese de Apo B e secreção podem culminar tanto em aumento de lipídios hepáticos quanto em aumento da produção de VLDL-Apo B resultando em esteatose hepática e hipertrigliceridemia (22).

O excesso de glicose visto em obesos e diabéticos, juntamente com a hiperinsulinemia, aumenta a síntese de AG no fígado. Todos esses mecanismos favorecem a um desbalanço no suprimento, consumo ou excreção de lipídios no fígado levando desta forma ao desenvolvimento da esteatose hepática (19).

1.3 - Patogênese da NASH

Aproximadamente 10 a 25% dos pacientes com NAFLD desenvolvem NASH (23). Os fatores responsáveis pela mudança/progressão da esteatose para a esteatohepatite têm sido extensivamente investigados e especulados, porém ainda não se encontram esclarecidos. O segundo insulto do modelo de Jay e James é a injúria hepática induzida por citocinas inflamatórias e pelo estresse oxidativo. Os autores sugerem que isso seria resultado de uma “sensibilização” do fígado a alterações metabólicas e moleculares desencadeadas por depósitos intracelulares de TG (11).

AG livres causam aumento da expressão do citocromo P-450 2E1 (CYP2E1). CYP2E1 é uma enzima que participa da β -oxidação de AG de cadeia longa e muito longa levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que resulta em estresse oxidativo (24). Por outro lado, alguns AG de cadeia longa são metabolizados pela β -oxidação peroxissomal que também produz espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (25, 26). O excesso de ROS consome antioxidantes naturais como a glutatona e a vitamina E no fígado resultando em estresse oxidativo e peroxidação lipídica (27, 28). Isto provoca dano a membranas e organelas dos hepatócitos levando a degeneração e necrose hepatocelular (27). O dano causado pela peroxidação mitocondrial afeta a morfologia da mitocôndria (megamitocôndria) alterando a transferência de elétrons da cadeia respiratória o que resulta em produção de ROS, tornando-se um ciclo vicioso, resultado do estresse oxidativo (29-31).

Os produtos finais da peroxidação lipídica estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-8, que levam a síntese de colágeno pelas células estelares hepáticas (32). A manutenção do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica resulta em produção continuada de colágeno levando a fibrose e cirrose hepática (33).

Outros mediadores-chave na patogênese da esteatose e sua progressão para esteatohepatite são as adipocinas (adiponectina, leptina, resistina) e citocinas secretadas por adipócitos em estados de resistência à insulina. O tecido adiposo visceral representa a fonte preferencial de adipocinas e citocinas com potencial ação no tecido hepático. As adipocinas exercem tanto funções imunes como metabólicas e medeiam a interação entre o tecido adiposo, músculo e fígado. Algumas delas, como a adiponectina, possui propriedade anti-inflamatória enquanto outras, como a leptina, possui ação pró-inflamatória. Assim, na NASH, o dano hepático também poderia resultar de um desbalanço na produção de adipocinas anti e pró-inflamatórias (7).

Desta forma, além das alterações metabólicas lipídicas que desempenham papel crucial para o aparecimento da NAFLD, fica evidente a importância e a relação da inflamação no desenvolvimento das formas mais avançadas da doença.

1.4 - NAFLD e receptores *Toll-like*

Como mencionado anteriormente, o tecido adiposo possui ação direta no favorecimento da inflamação e doença hepática por meio da ação de adipocinas inflamatórias e outras citocinas produzidas no tecido.

Adicionalmente, estudos recentes têm mostrado também a contribuição do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) derivado do intestino no desenvolvimento da inflamação no fígado (34-35). Isto poderia acontecer principalmente devido a associação anatômica do fígado com o intestino e sua exposição a quantidades relativamente grandes de LPS derivados do intestino, mesmo na ausência de infecção ativa (36-38).

O LPS é reconhecido pelo receptor *toll like 4* (TLR4) (39), um receptor membro da super família de receptores *Toll-like* (TLRs) que reconhecem padrões associados a patógenos (PAMPs) como o LPS, lipopeptídeos, DNA metilado, entre outros. Atualmente são encontrados 12 isoformas de TLRs em humanos (40) que são estruturalmente caracterizados pela presença de um domínio extracelular rico em repetições de leucina (LRR) e um domínio intracelular semelhante ao receptor de interleucina 1 (TIR). A existência de um grande número de TLRs capacita o sistema imune a discriminar entre PAMPs característicos de diferentes classes de microorganismos e assim promover mecanismos de defesas específicos (40).

A sinalização mediada por TLRs é desencadeada por duas grandes vias. A via dependente do MyD88 e a via independente do MyD88 e ambas medeiam a ativação do NF- κ B com subsequente produção de citocinas inflamatórias (41).

Um crescente corpo de evidências tem sugerido que o TLR4 tem papel chave na patogênese de doenças crônicas do fígado. O TLR4 é o principal receptor para o LPS, um dos mediadores da inflamação do fígado associada tanto à NAFLD quanto à doença alcoólica do fígado. Além do LPS, o TLR4

também é ativado por AG livres, mediadores da inflamação do fígado induzida pela obesidade (35).

Estudos recentes têm fornecidos evidências também da participação do TLR4 na inflamação hepática e progressão da NAFLD para NASH. Dewei e colaboradores (42), num estudo com um modelo animal de NASH induzida por obesidade, demonstrou que camundongos APOE-/- / TLR4WT tratados com uma dieta rica em colesterol (41% de gordura e 0,25% de colesterol) por 12 semanas exibiram sinais patológicos típicos de NASH induzida por obesidade similar àqueles visualizados em humanos. Esses animais desenvolveram obesidade, intolerância a glicose e aterosclerose. Além disso, a análise histológica do fígado desses animais revelou presença de esteatose micro e macrovesicular e inflamação lobular significativamente aumentada em comparação aos animais APOE-/- / TLR4 mut (TLR4 não funcional) alimentados com a mesma dieta e pelo mesmo período. Os animais APOE-/- / TLR4WT ainda expressaram níveis significativamente elevados de F4/80, um marcador de macrófagos, de citocinas inflamatórias como TNF- α e MCP-1, e de marcadores de peroxidação lipídica e de estresse do retículo endoplasmático, demonstrando que a ativação do TLR4 é essencial para o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pela dieta.

Sawada e colaboradores (43), num outro estudo com um modelo animal de NASH, encontraram presença de esteatose hepática e níveis significativamente elevados de ALT plasmática e de ganho de peso nos animais alimentados com uma dieta hiperlipídica (60% de triglicérides) em comparação aos animais alimentados com a dieta controle por um período de dezesseis semanas. A análise do fígado dos animais não revelou presença de

infiltração de células inflamatórias, porém o tecido hepático dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica exibiu níveis significativamente maiores de expressão de receptores TLRs, inclusive de TLR4, e de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , além de pIRAK1. Os autores sugerem que a estimulação dos receptores TLRs contribuiu para a indução da produção de citocinas e que a via de sinalização dos TLRs encontra-se ativada já na simples esteatose, mesmo com ausência de inflamação.

Pierre e colaboradores (44) ainda verificaram uma correlação do TLR4 ativado por lipídios na indução do estresse do retículo endoplasmático. Nesse trabalho, a dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo de marcadores de estresse do retículo endoplasmático, como a proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina (BiP) e do homólogo C/EBP (CHOP), em tecidos como o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo dos animais do grupo controle (WT) alimentados com uma dieta hiperlipídica (45% de gordura) comparados aos animais TLR4 -/-.

Esses achados evidenciam a importância da ativação do receptor TLR4 mediando o avanço da doença das formas mais simples (NAFLD) para as mais complicadas (NASH). Contudo, evidências da participação do TLR4 nas alterações do metabolismo lipídico que propiciam o surgimento e desenvolvimento da NAFLD ainda são desconhecidas.

2. HIPÓTESE

O receptor TLR4 tem papel relevante na progressão da NAFLD para NASH, visto que sua ausência limita a inflamação do fígado, levando a menor infiltração de leucócitos e produção de citocinas.

Embora muitos dos efeitos atribuídos ao TLR4 se deva a sua ativação por LPS, este receptor também pode ser ativado por ácidos graxos. Essas moléculas estão em alta concentração plasmática em pacientes com síndrome metabólica, e uma grande porcentagem destes pacientes desenvolvem NAFLD.

Nossa hipótese é que a ativação do TLR4 não está envolvida somente na inflamação observada na NASH, mas tem papel relevante nas alterações do metabolismo lipídico observadas desde o início da NAFLD.

3. OBJETIVO

Avaliar se o receptor TLR4 está envolvido nas alterações do metabolismo lipídico observados na esteatose hepática não alcoólica.

3.1 – ESTRATÉGIA

Utilizamos como modelo de síndrome metabólica animais deficientes para o receptor da LDL (LDLr KO), que ao ingerirem dieta rica em gordura e colesterol desenvolvem diversos aspectos desta síndrome, como aterosclerose, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e esteatose hepática. Para averiguar o papel do receptor TLR4, cruzamos os animais LDLr KO com animais deficientes para o receptor TLR4, criando uma linhagem LDLr/TLR4 KO.

Após 4, 8 e 12 semanas ingerindo a dieta, avaliamos:

- Perfil plasmático de lipídios
- Conteúdo hepático de lipídios
- Expressão gênica de enzimas de síntese e degradação de lipídios

4. MÉTODOS

4.1 - Animais e dietas

Camundongos machos de 10 semanas, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram mantidos em gaiolas com cinco animais cada, em ambiente com controle de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($54\pm 9\%$) e luminosidade (12h escuro:12h iluminado), recebendo água *ad libitum*. Foram utilizados 4 genótipos: C57black6, deficientes para o receptor da LDL (LDLr KO), deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO) e deficientes para receptor da LDL e TLR4 (Duplo KO). Os animais receberam a dieta normolipídica (Nuvilab) ou hiperlipídica [52,95% de carboidratos, 20% de proteínas, 18% lipídios (12% de óleo de coco, 4,75% de óleo de soja e 1,25% de colesterol), 5% de celulose, 3,5% de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 03% de L-cistina e 0,25% de bitartarato de colina] em quantidades iguais por 4, 8 ou 12 semanas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *The Universities Federation for Animals Welfare* (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo de Pesquisa nº 052/12.

4.2 - Coleta de sangue e fígado

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Parke-Daves) na dose de 10 mg/Kg de peso e xilasina (Bayer) na dose de 8 mg/Kg de peso. O sangue foi coletado da veia cava inferior e o plasma separado por centrifugação a 200rpm por 15 minutos a 4°C. O fígado foi dissecado e congelado em nitrogênio líquido em duas porções para posterior extração de RNA e extração de proteínas e lipídios totais.

4.3 - Perfil lipídico plasmático

A concentração de colesterol total e triglicerídeos no plasma dos animais foi avaliada utilizando kits enzimáticos, conforme protocolo fornecido pelo fabricante (Labtest Diagnóstica, Brasil). A concentração plasmática de ácidos graxos livres foi determinada utilizando o kit NEFA C (Wako Diagnostics, Japão).

4.4 - Extração de lipídios totais

Os lipídios totais foram extraídos segundo protocolo de Folch e colaboradores (45) e solubilizados em etanol. Resumidamente, a 100 mg de fígado adicionamos 200µL de água, 200µL de metanol e 400µL de clorofórmio. Após agitação vigorosa por quinze segundos as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por dois minutos. A fase superior foi separada num novo tubo, e 400µL de clorofórmio foi adicionado novamente ao restante do tecido. Após

nova agitação e centrifugação, a fase superior foi unida com a anterior e o clorofórmio removido no concentrador a vácuo. Uma parte das amostras foi separada para quantificação de triglicérides. O restante foi saponificado utilizando hidróxido de potássio (KOH), separado com hexano e solubilizado com etanol para quantificação do colesterol total. A quantidade de colesterol total e triglicerídeo do fígado foi determinada utilizando kits enzimáticos, conforme protocolo fornecido pelo fabricante (Labtest Diagnóstica).

4.5 - Real-time PCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O RNA total das amostras de fígado foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Life Technologies, USA). Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1 mL do TRIZOL. Em seguida foram incubados à temperatura ambiente por cinco minutos e, após adição de 0,2 mL de clorofórmio, foram agitados vigorosamente por quinze segundos e incubados à temperatura ambiente por três minutos. A separação de fases foi feita por centrifugação a 12.000g por quinze minutos a 4°C. O RNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para outro tubo e precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol por dez minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75 % centrifugado a 7000g por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm, correspondente ao pico de absorção de

RNA, e 280 nm, correspondente ao pico de absorção de proteínas, no equipamento NanoVue (GE HealthCare).

A expressão dos genes de interesse foi quantificada por PCR em tempo real utilizando o kit SuperScript III Platinum® SYBR Green One-Step Kit (Invitrogen) no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems). Depois da otimização, os primers foram utilizados para a detecção e quantificação relativa da expressão dos genes de interesse. A quantificação da expressão gênica foi realizada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (46,47), usando o gene da B2M como controle interno.

Os genes estudados foram: apolipoproteína B100 (ApoB100), carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), colesterol 7 α hidroxilase (CYP7a1), glicerol 3 fosfato aciltransferase 1 e 4 (GPAT1 e GPAT4), proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP), proteína trifuncional mitocondrial α e β (MTP- α e MTP- β), proteína L-bi/ multifuncional (PBE), Tiolase (Tiol), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL) IL-1 β , IL-6 e F4/80. As sequências dos primers foram desenhadas conforme dados do Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As sequências utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para a avaliação da expressão gênica.

Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')	Anneling temperature	Fragment size (bp)
ApoB 100	GGCTTTGTATTGG GTCAATGGC	TTGTCCACAATG GGCATGATTC	55	129
B2M	CATGGCTCGCTC GGTGACC	AATGTGAGGCG GGTGGAAGT	60	61
CPT1	CCATATTCAGGCA GCGAGAGC	AGGGATGCGGG AAGTATTGAAG	56	160
CYP7a1	TGGGCATCTCAA GCAAACAC	TCATTGCTTCAG GGCTCCTG	55	125
F4/80	CCTGAACATGCA ACCTGCCAC	GGGCATGAGCA GCTGTAGGATC	57	201
GPAT1	GGAGCACCAGCA ATTCATCACC	TGTGGCACTCTC AGCGTACACG	58	190
GPAT4	TGGAGCCACTGT TTACCCTGTG	CCCAACTGGTC ATCATCCTCAG	55	116
IL-6	GGGACTGATGCT GGTGACAACC	AAGCCTCCGAC TTGTGAAGTGG	56	117
IL-1 β	GGCAGCTACCTG TGTCTTTCCC	ATATGGGTCCG ACAGCACGAG	60	203
MTPa	TCAGTCGCTTCTC TGCCTTCAG	TCCGAATAACTG CCACATCCC	56	130
MTPb	GGGTCCGCATTC CATTCTG	GCCTCTTAGC CACATTGCTTG	56	181
MTTP	GCATGTCAGCCA TCCTGTTTG	CAGAATAAGCC CTTTCACCACG	54	128
PBE	GCTTGCCCAACA TGGACAGTG	GCCTGGACTGA ACGGACACAAG	56	103
Tiol	CGCCTGCTGGAG AGTGAGAAAG	TCCTGCTTCTGC CGTGAAATG	56	101
TNF- α	CTAACAGTCCATG CCATTGG	CATCCAGTCCAT GCCATACT	58	260

4.6 - Análise estatística

Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média. Comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (Two

way ANOVA). Diferenças significantes foram encontradas usando o Tukey-Kramer`s test (GraphPad Prism version 4.00, GraphPad programa, San Diego, Califórnia, USA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 - Ganho de peso

A ingestão de dieta hiperlipídica por 12 semanas não alterou o ganho de peso dos animais de modo significativo, independentemente de seu genótipo (Figura 1).

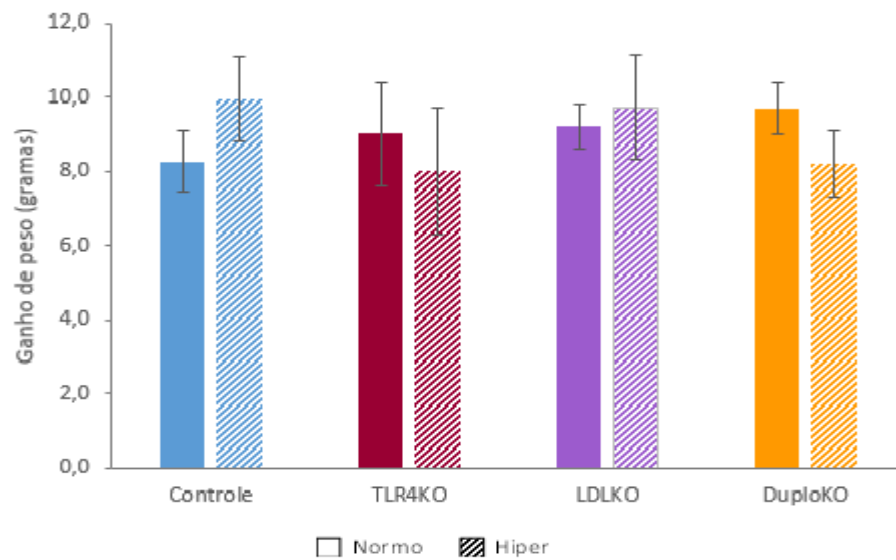


Figura 1: Ganho de peso dos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO após 12 semanas recebendo dieta normo ou hiperlipídica. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDL KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7

5.2 - Porcentagem de gordura epididimal e retroperitoneal

Observamos que a dieta hiperlipídica proporcionou ganho significativo de gordura epididimal e retroperitoneal em todos os grupos de animais. Esse ganho foi superior nos animais do grupo controle (Figuras 2 e 3).

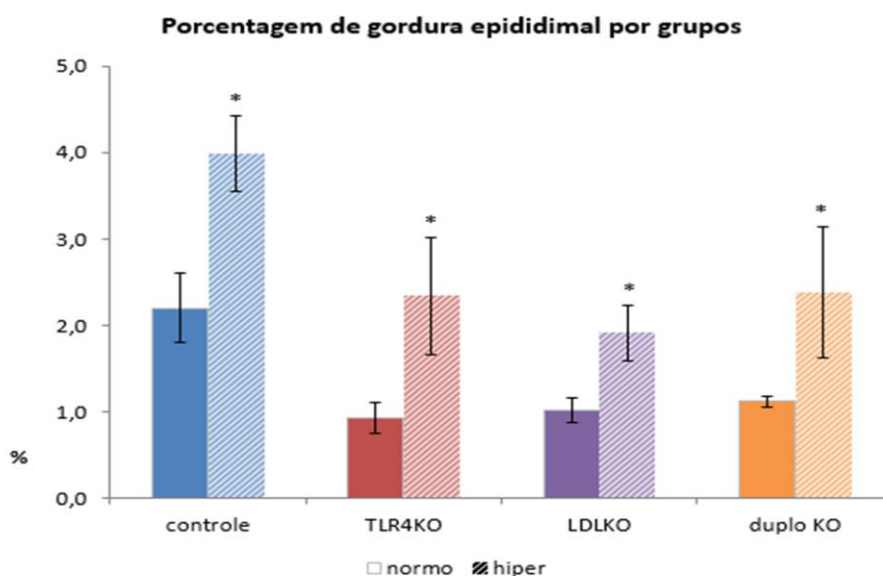


Figura 2: Proporção de gordura epididimal nos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO tratados com dieta normo ou hiperlipídica por 12 semanas. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDL KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL, Normo: dieta normolipídica, hiper: dieta hiperlipídica. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o mesmo grupo que recebeu dieta normo.

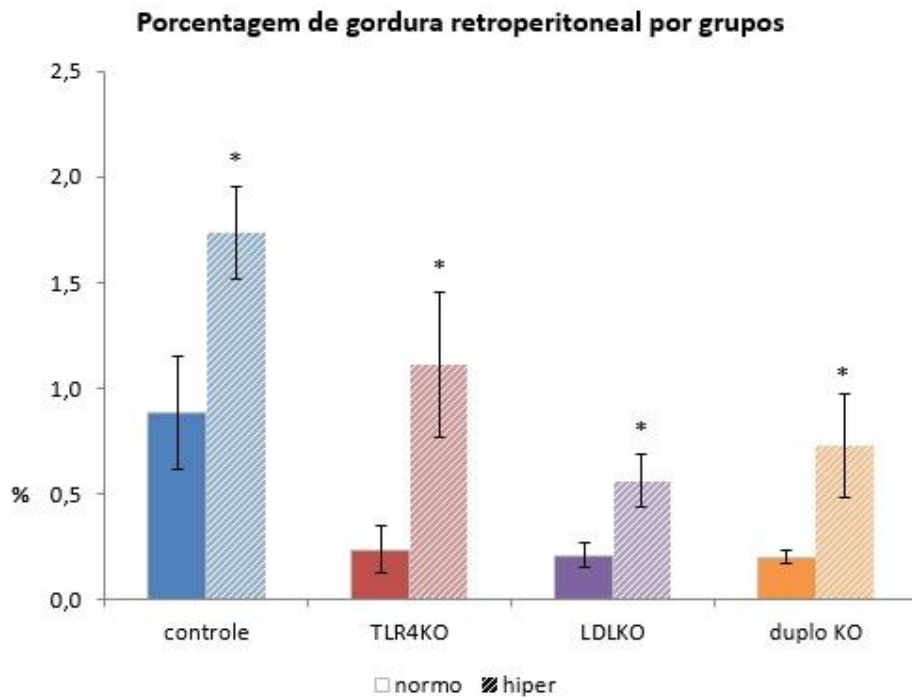


Figura 3: Proporção de gordura retroperitoneal nos animais do grupo controle, TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO tratados com dieta normo ou hiperlipídica por 12 semanas. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL, Normo: dieta normolipídica, hiper: dieta hiperlipídica. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o mesmo grupo que recebeu dieta normo.

5.3 - Perfil plasmático de lipídios

5.3.1 – Triglicérides

Notamos que a ausência do receptor de LDL promove um aumento da trigliceridemia nos grupos LDLr KO e Duplo KO a partir de 4 semanas, mesmo quando estes animais são alimentados com a dieta normolipídica. Os animais LDLr KO ainda apresentam maiores níveis de triglicérides comparados aos animais Duplo KO em todos os períodos avaliados (Figura 4).

Após o tratamento com a dieta hiperlipídica, também observamos que a ausência do receptor de LDL favorece a maior concentração plasmática de triglicérides nos animais dos grupos Duplo KO e LDLr KO em 4 semanas, quando comparamos esses animais ao grupo controle. Essa concentração de triglicérides mantém-se elevada nos animais LDLr KO até o final do tratamento (12 semanas). No entanto, nos animais Duplo KO, observa-se queda significativa na trigliceridemia a partir de 8 semanas em comparação com o grupo LDLr KO. Essa diferença se mantém em de semanas de tratamento (Figura 5).

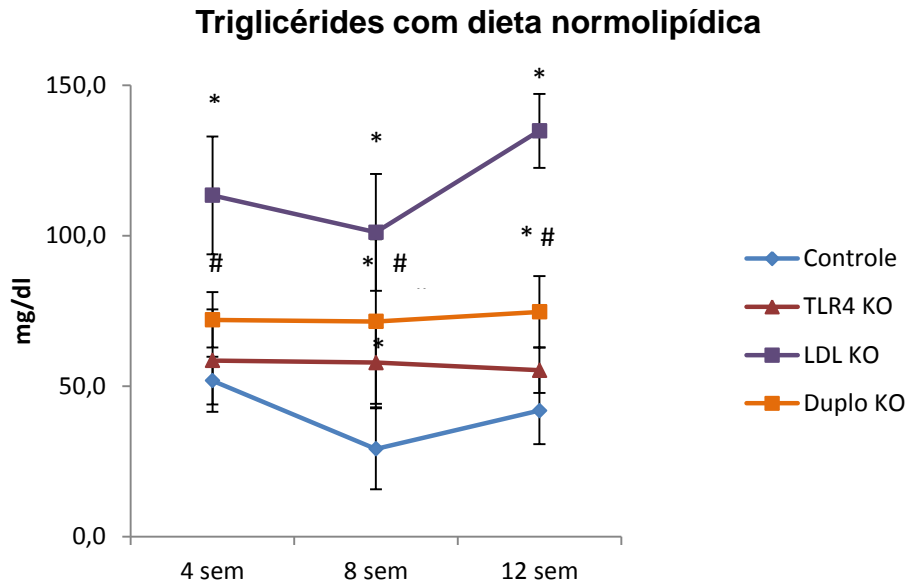


Figura 4: Concentração de triglicérides plasmático após ingestão de dieta normolipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle. # p<0,05 em comparação com o grupo LDL KO.

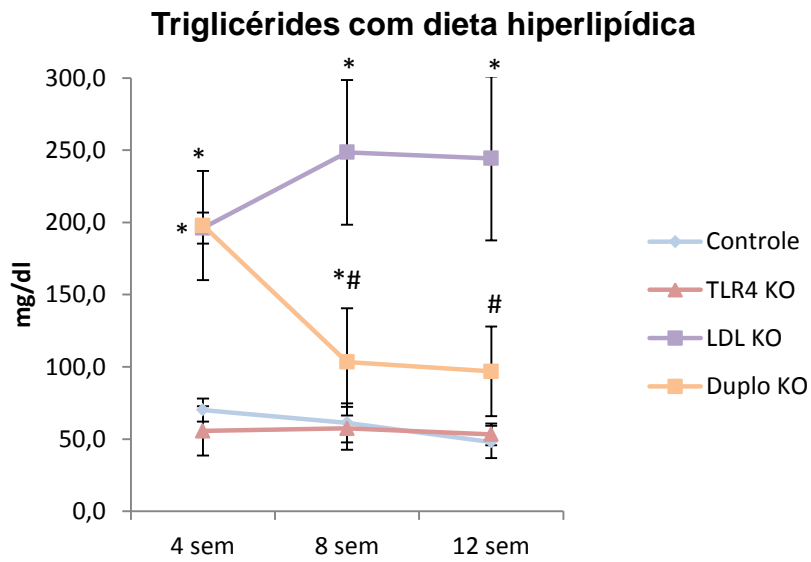


Figura 5: Concentração de triglicérides plasmático após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle. # p<0,05 em comparação com o grupo LDL KO.

5.3.2 - Colesterol total

Semelhante aos triglicérides, os animais deficientes para o receptor de LDL apresentam uma maior colesterolemia em comparação aos animais do grupo controle, mesmo quando são tratados com a dieta normolipídica, desde 4 semanas de tratamento. Também observamos que o grupo Duplo KO exibe níveis de colesterol total significativamente menores comparados ao grupo LDLr KO em todas as semanas no tratamento (Figura 6).

Após o tratamento com a dieta hiperlipídica, verificamos que a ausência do receptor de LDL favorece um aumento significativo da colesterolemia em todas as semanas de tratamento quando comparamos com o grupo controle. Entretanto, quando comparamos os grupos LDLr KO e Duplo KO entre si, não encontramos diferenças significativas na concentração de colesterol total induzida pela dieta hiperlipídica (Figura 7).

Colesterol total com dieta normolipídica

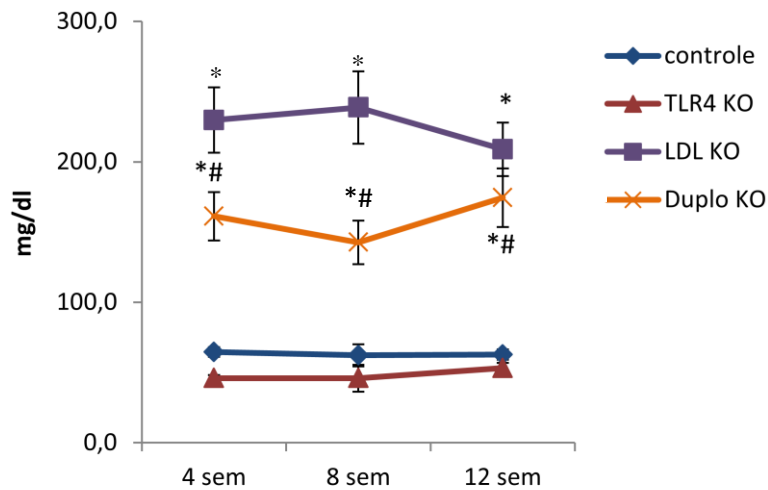


Figura 6: Concentração de colesterol total plasmático após ingestão de dieta normolipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle. # p<0,05 em comparação com o grupo LDL KO.

Colesterol total com dieta hiperlipídica

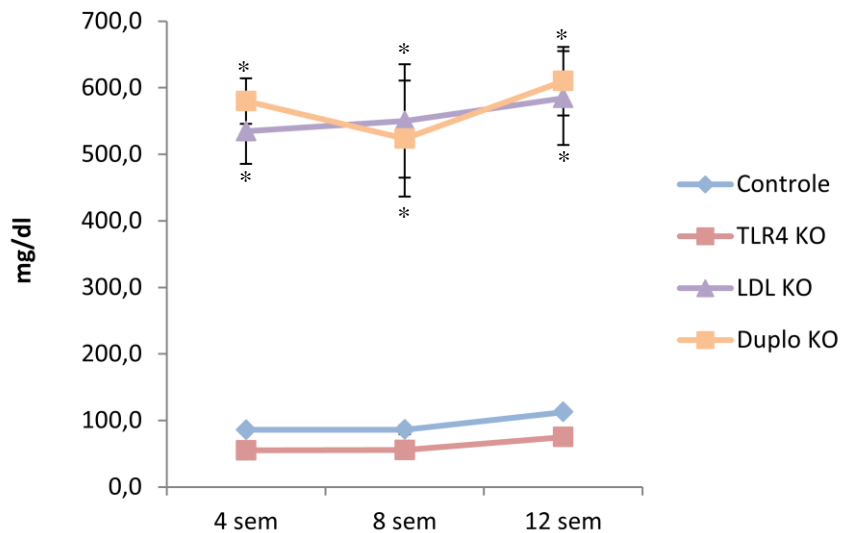


Figura 7: Concentração de colesterol total plasmático após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle.

5.3.3 - Ácidos graxos livres

Observamos níveis significativamente inferiores de ácidos graxos livres nos grupos que não apresentam o receptor de LDL ao final de 12 semanas de tratamento quando comparamos com o grupo controle. No entanto não há diferença entre os grupos LDLr KO e Duplo KO (Figura 8).

Após o tratamento com a dieta hiperlipídica, observamos que os animais deficientes para o receptor LDL apresentam níveis plasmáticos de ácidos graxos livres superiores aos do grupo controle a partir de 4 semanas. Os animais do grupo LDLr KO mantêm esses níveis elevados até o final do tratamento, entretanto observamos no grupo Duplo KO queda acentuada de ácidos graxos livres, chegando em 12 semanas a níveis semelhantes de ácidos graxos livres dos grupos controle e TLR4 KO (Figura 9).

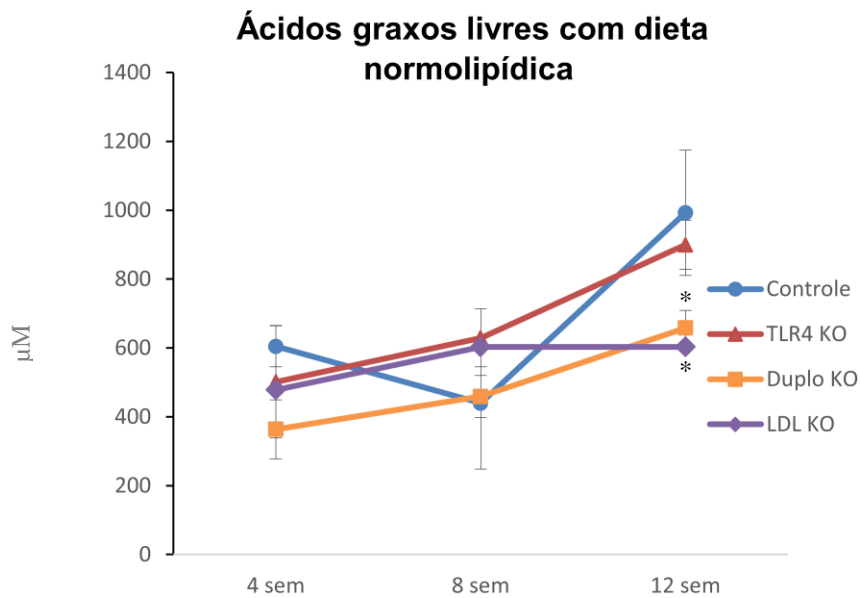


Figura 8: Concentração plasmática de ácidos graxos livres após ingestão de dieta normolipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLrKO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle.

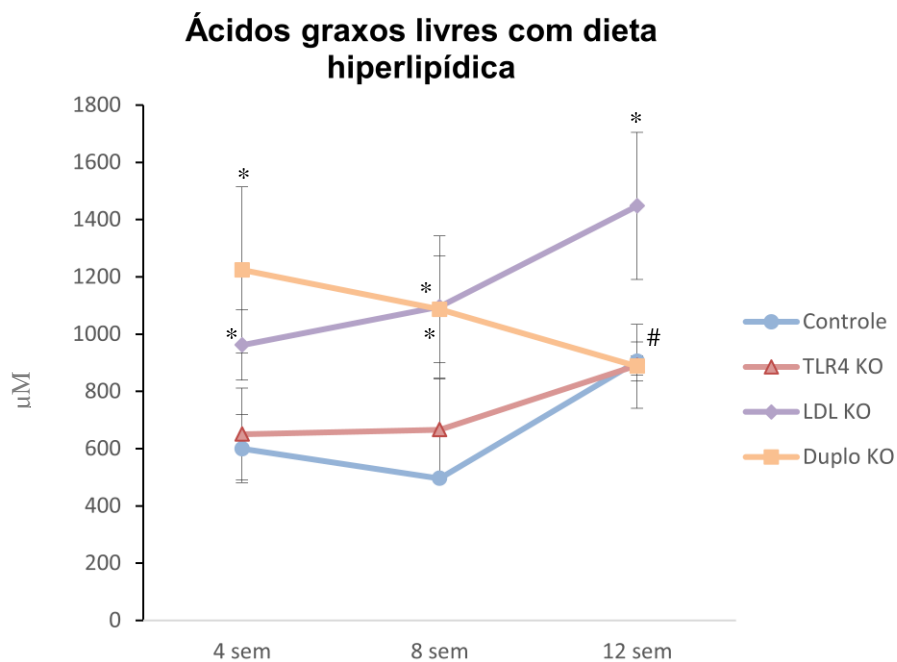


Figura 9: Concentração plasmática de ácidos graxos livres após ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLrKO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação com o grupo controle. # p<0,05 em comparação com o grupo LDL KO.

5.4 - Perfil hepático de lipídios

5.4.1 – Triglicérides

A ingestão de dieta hiperlipídica por 12 semanas levou ao acúmulo de triglicérides no fígado de todos os grupos comparados aos animais desses mesmos grupos tratados com dieta normolipídica. Não houve influência do genótipo no acúmulo de triglicérides no fígado dos animais (Figura 10).

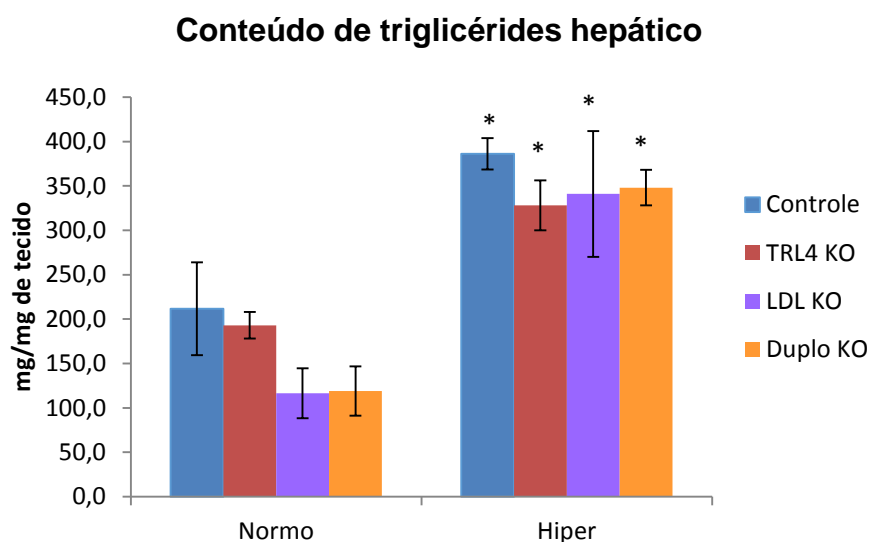


Figura 10: Concentração de triglicérides hepático dos diferentes grupos após 12 semanas. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLrKO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL, Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação ao mesmo grupo que ingeriu dieta normolipídica.

5.4.2 – Colesterol

Após 12 semanas de tratamento, observamos que a dieta hiperlipídica induziu acúmulo de colesterol no fígado de todos os grupos de animais. No entanto, este acúmulo de colesterol hepático foi maior nos animais dos grupos LDL KO e Duplo KO, sem diferença entre eles (Figura 11).

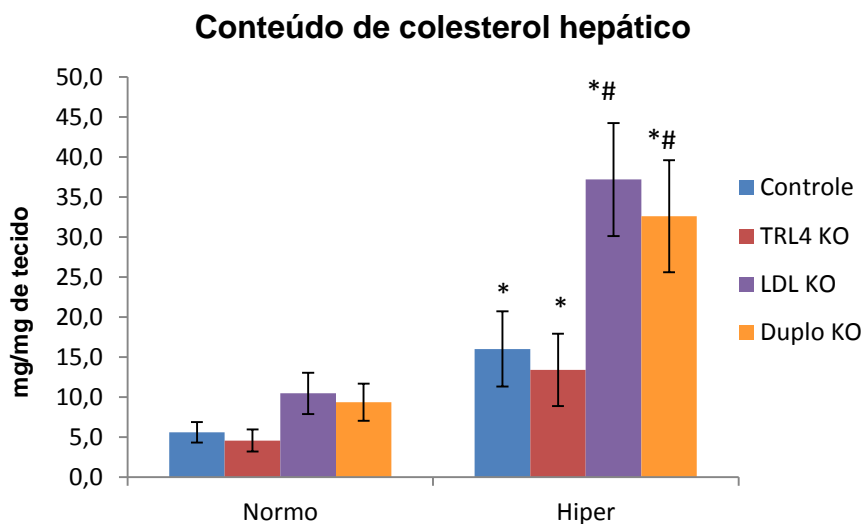


Figura 11: Concentração de colesterol hepático dos diferentes grupos após 12 semanas. TLR4 KO: deficiente para o receptor TLR4, LDLr KO: deficientes para o receptor de LDL, Duplo KO: deficientes para os receptores TLR4 e LDL, Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n=7 por grupo. * p<0,05 em comparação ao mesmo grupo que ingeriu dieta normolipídica. # p<0,05 em comparação ao grupo controle que ingeriu dieta hiperlipídica.

5.5 - Modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese de triglicerídeos pelo fígado

5.5.1 - Apolipoproteína B100 (ApoB100)

Não encontramos diferenças na expressão de ApoB100 entre os grupos, independente da dieta utilizada (Figura 12).

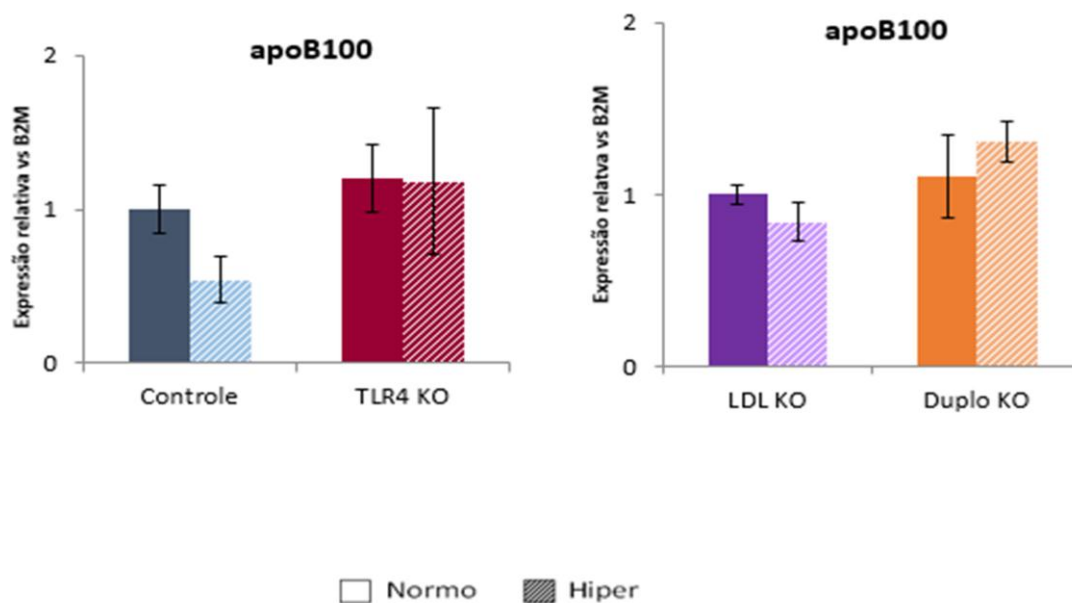


Figura 12: Expressão de apoB100 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). n= 7 por grupo. Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica.

5.5.2 - Glicerol 3 fosfato aciltransferase 1 (GPAT 1)

Não observamos diferenças na expressão de GPAT1 entre os animais do grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta oferecida (Figura 13).

De modo semelhante, não houve diferença na expressão de GPAT1 entre os animais LDLr KO e Duplo KO, independente da dieta. A dieta hiperlipídica inibiu a expressão dessa enzima nos animais LDLr KO, mas não exerceu efeito nos animais Duplo KO (Figura 13).

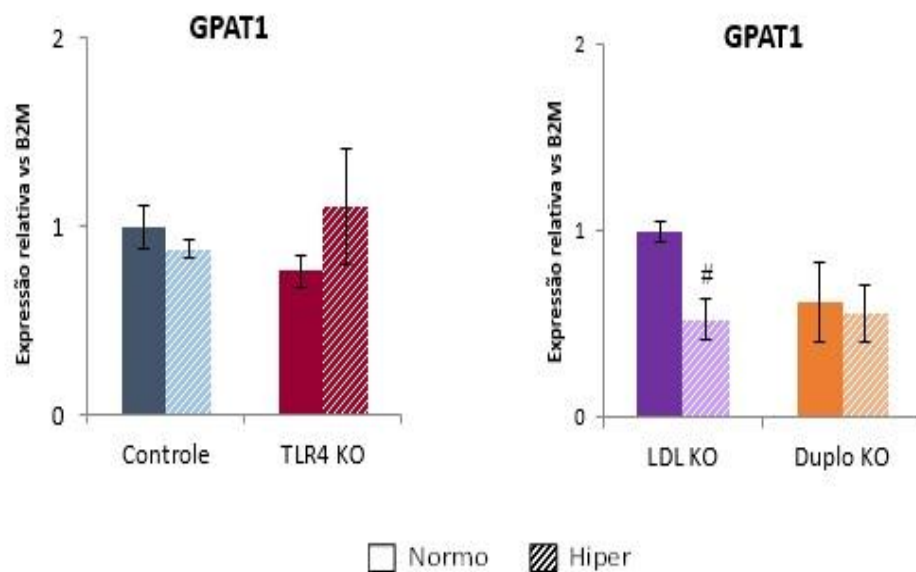


Figura 13: Expressão de GPAT1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica.

5.5.3 - Glicerol 3 fosfato aciltransferase 4 (GPAT 4)

Observamos uma menor expressão de GPAT4 nos animais do grupo TLR4 KO tratados com dieta normolipídica, e a dieta hiperlipídica estimulou a expressão desta enzima neste grupo (Figura 14).

Nos animais deficientes para o receptor de LDL observamos expressão significativamente elevada de GPAT 4 quando os mesmos receberam a dieta hiperlipídica. No entanto, a ausência do receptor TLR4 não modifica este efeito (Figura 14).

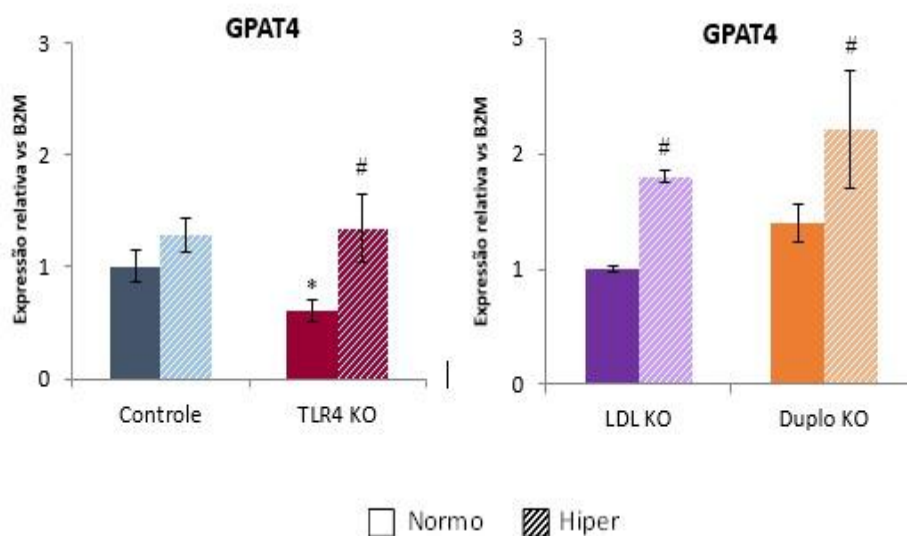


Figura 14: Expressão de GPAT4 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica.

5.5.4 - Proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTTP)

Não encontramos diferenças na expressão de MTTP entre os grupos, independente da dieta utilizada (Figura 15).

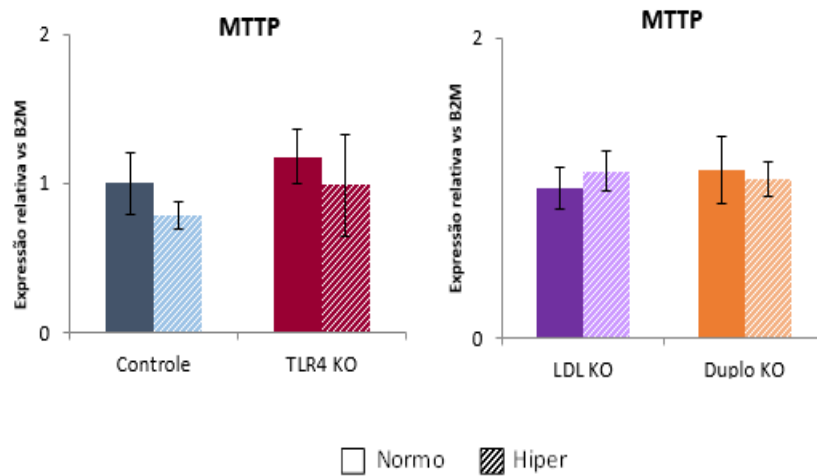


Figura 15: Expressão de MTTP nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). n= 7 por grupo. Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica.

5.6 - Modulação da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação de triglicerídeos pelo fígado

5.6.1 - Carnitina palmitoil transferase 1 (CPT 1)

Encontramos maior expressão de CPT 1 nos animais do grupo TLR4 KO em comparação aos animais do grupo controle, independente da dieta. Entretanto, a dieta hiperlipídica não altera a expressão desta enzima nestes grupos (Figura 16).

Entre os animais dos grupos LDLr KO e Duplo KO, encontramos maior expressão de CPT 1 nos animais Duplo KO, independente da dieta. Observamos também que o tratamento com a dieta hiperlipídica estimula a expressão de CPT 1 nos animais dos grupos LDLr KO e Duplo KO (Figura 16).

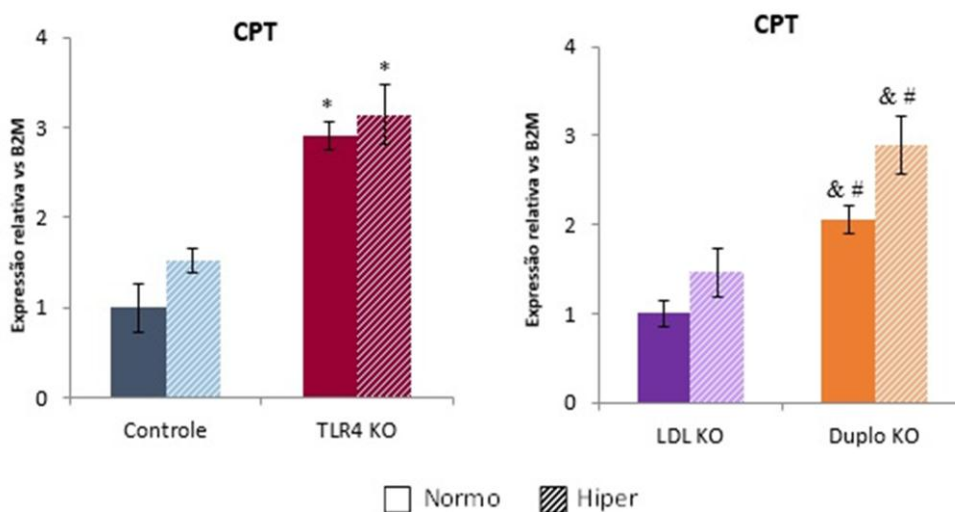


Figura 16: Expressão de CPT 1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

5.6.2 - Proteína trifuncional mitocondrial (MTP)

Não encontramos diferenças na expressão da subunidade α de MTP entre os grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta. Entre os grupos LDLr KO e Duplo KO, observamos maior expressão de MTP- α no grupo Duplo KO tratado com a dieta hiperlipídica em comparação ao grupo LDLr KO (Figura 17).

Observamos que a ausência do receptor TLR4 leva a um aumento significativo na expressão de MTP- β nos grupos TLR4 KO comparado ao grupo controle e no grupo Duplo KO comparado ao grupo LDLr KO. Este efeito não é modulado pela dieta hiperlipídica (Figura 18).

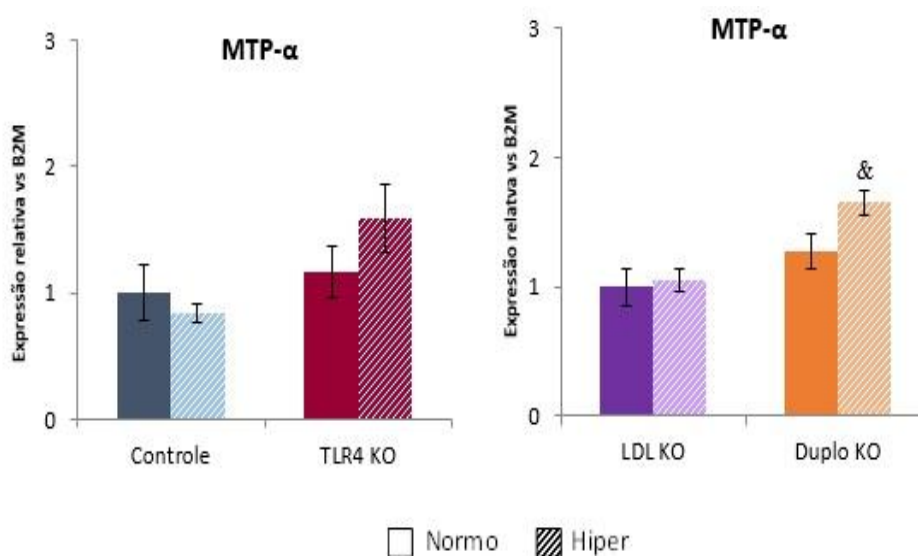


Figura 17: Expressão de MTP- α nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

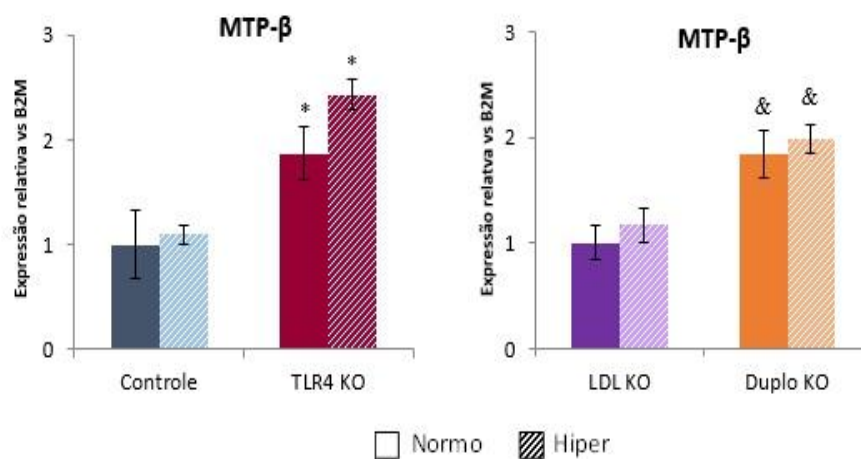


Figura 18: Expressão de MTP- β nos grupos de animais controle e deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLrKO) e deficientes para o receptor TLR4 e LDL (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

5.6.3 - Acil-CoA oxidase (ACOX)

A dieta hiperlipídica induz um aumento significativo na expressão de ACOX nos animais TLR4 KO, embora não exerça efeito no grupo controle (Figura 19).

Entre os animais LDLr KO e Duplo KO, também observamos que a ausência do receptor TLR4 favorece à maior expressão de ACOX, independente da dieta utilizada. Ainda notamos que a dieta hiperlipídica promoveu um aumento na expressão de ACOX em ambos os grupos, LDLr KO e Duplo KO (Figura 19).

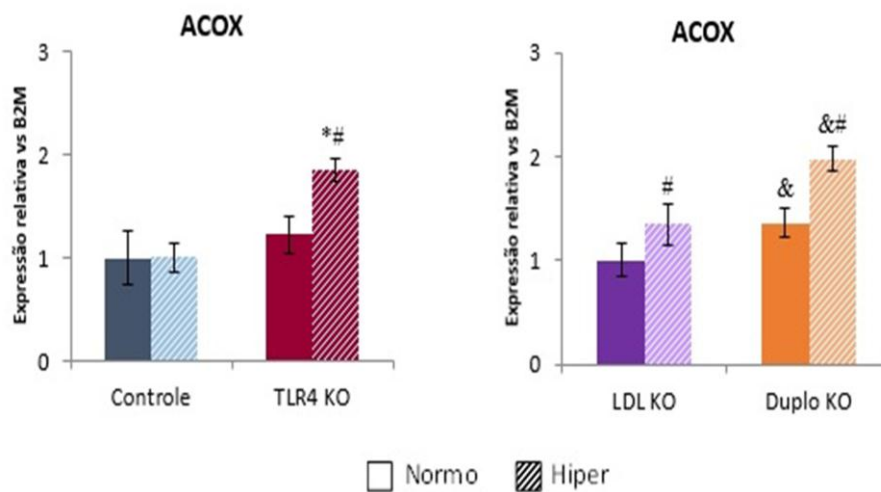


Figura 19: Expressão de ACOX nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDL KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

5.6.4 - Proteína β -bi/multifuncional (PBE)

Não encontramos diferenças na expressão de PBE entre os grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta. Nos grupos LDLr KO e Duplo KO, observamos maior expressão de PBE no grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO apenas quando os animais Duplo KO receberam a dieta hiperlipídica (Figura 20).

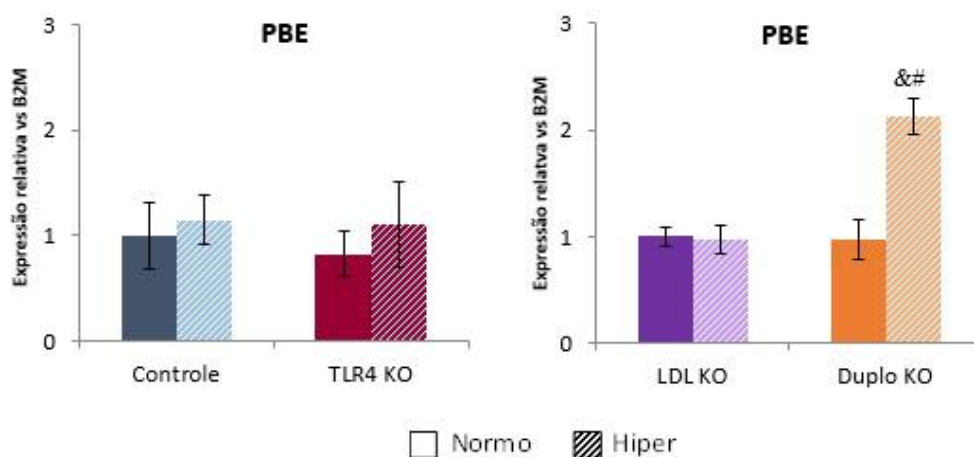


Figura 20: Expressão de PBE nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDL KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

5.6.5 - 3-cetoacil-CoA tiolase (Tiolase)

A expressão de tiolase é menor nos animais TLR4 KO em comparação aos animais controle que receberam dieta normolipídica. A dieta hiperlipídica reverteu esse efeito do genótipo, de modo que a expressão de tiolase não é diferente entre estes grupos após a ingestão da dieta hiperlipídica (Figura 21).

Ainda encontramos uma expressão significativamente elevada de tiolase induzida pela dieta hiperlipídica no grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO (Figura 21).

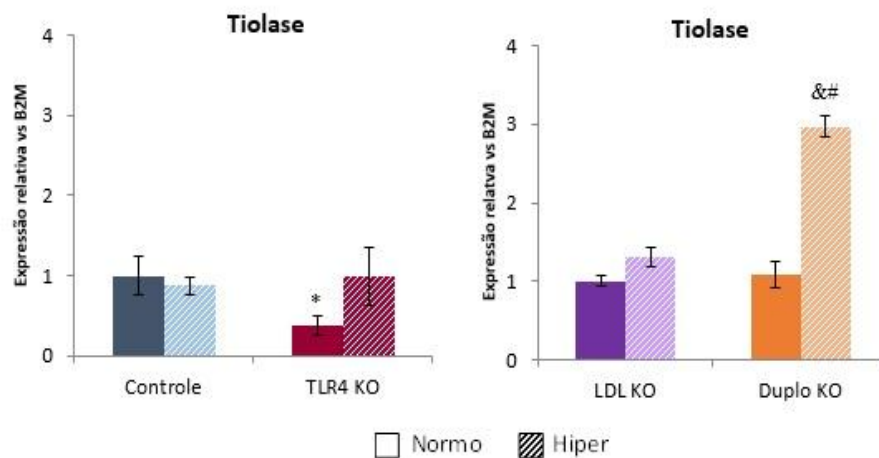


Figura 21: Expressão de tiolase nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

5.7 - Modulação da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação de colesterol pelo fígado

5.7.1 - Colesterol 7 alfa-hidroxilase (CYP7a1)

Após doze semanas, observamos maior expressão de CYP7a1 nos animais TLR4 KO em comparação ao grupo controle tratados com a dieta normolipídica. A dieta hiperlipídica não alterou a expressão desta enzima nos animais controle e TLR4 KO (Figura 22).

Entre os grupos LDLr KO e Duplo KO, encontramos uma expressão significativamente elevada de CYP7a1 no grupo Duplo KO, independente da dieta oferecida. A dieta hiperlipídica induziu aumento significativo na expressão de CYP7a1 somente nos animais Duplo KO (Figura 22).

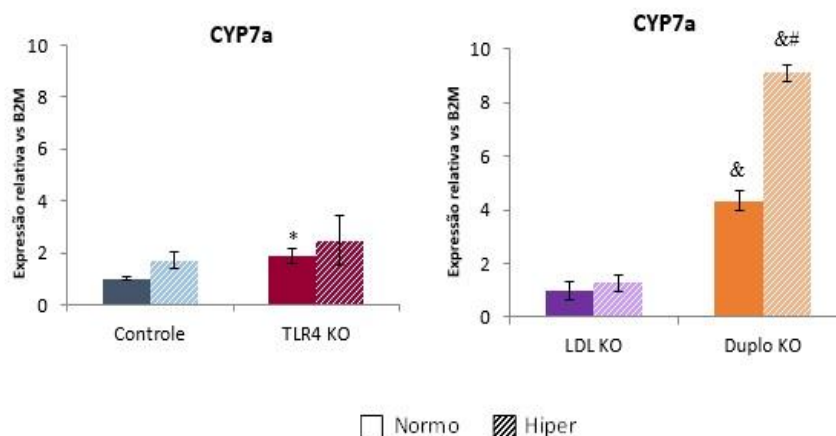


Figura 22: Expressão de CYP7a1 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica.

5.8 - Modulação da inflamação no fígado

5.8.1 - F4/80

Não encontramos diferenças na expressão de F4/80 nos grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta fornecida (Figura 24).

Observamos que os animais LDLr KO tratados com a dieta hiperlipídica exibem expressão aumentada de F4/80 após 12 semanas de tratamento em comparação ao grupo Duplo KO tratado com a mesma dieta (Figura 23). Não há diferença nos animais que receberam dieta normolipídica.

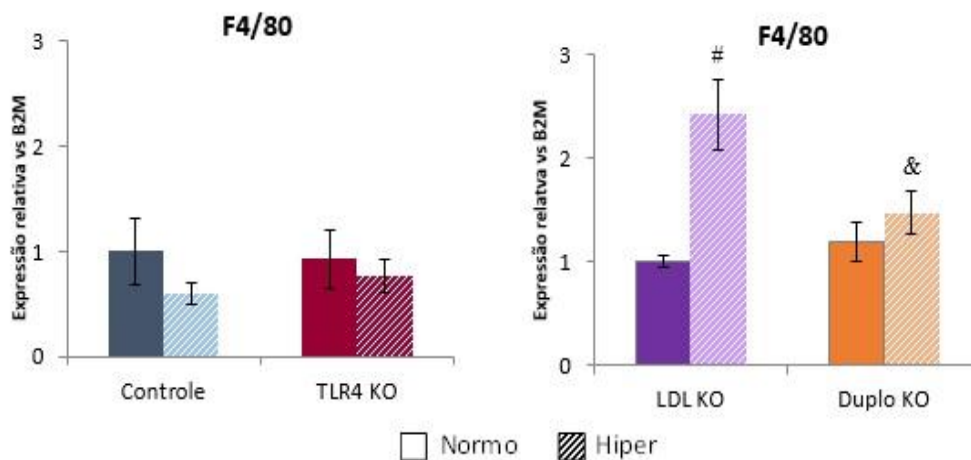


Figura 23: Expressão de F4/80 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. & p < 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta. # p < 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica.

5.8.2 - Interleucina-1 β (IL-1 β)

Não observamos diferenças na expressão de IL-1 β entre os animais dos grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta (Figura 24).

Após 12 semanas de tratamento, observamos que a dieta hiperlipídica levou a maior expressão de IL-1 β nos animais deficientes para o receptor de LDL, e este efeito foi significativamente superior nos animais Duplo KO (Figura 24).

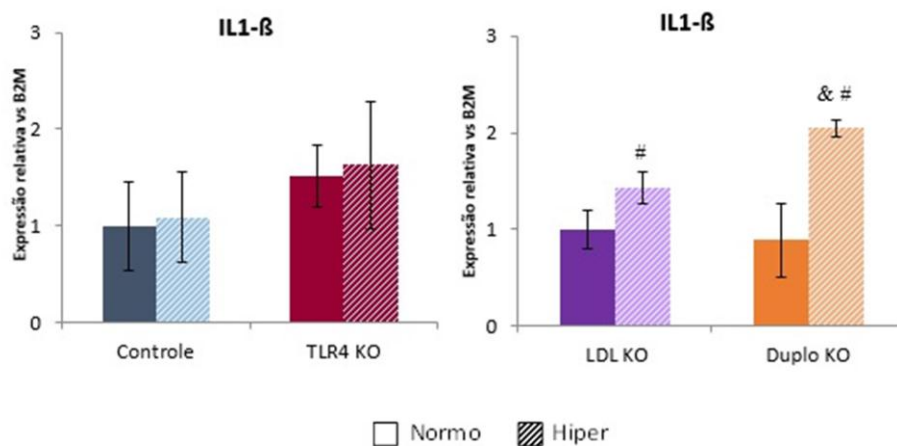


Figura 24: Expressão de IL-1 β nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica.

5.8.3 - Interleucina 6 (IL-6)

Não notamos diferenças na expressão da IL-6 entre os animais dos grupos controle e TLR4 KO, independente da dieta oferecida (figura 25).

Observamos maior expressão de IL-6 nos animais do grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO, independente da dieta fornecida. Os animais Duplo KO apresentaram uma diminuição na expressão de IL-6 quando receberam a dieta hiperlipídica comparados aos animais do mesmo grupo tratados com a dieta normolipídica (figura 25).

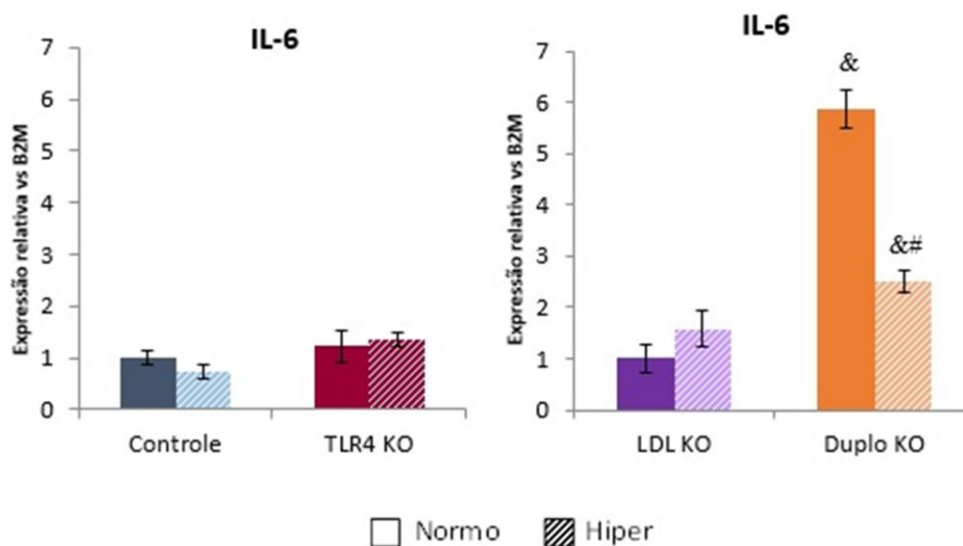


Figura 25: Expressão de IL-6 nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4 KO), deficientes para o receptor de LDL (LDLr KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica.

5.8.4 - Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

Não notamos diferenças na expressão de TNF- α entre os animais dos grupos controle e TLR4 KO tratados com dieta normolipídica. No entanto, a dieta hiperlipídica levou ao aumento da expressão de TNF- α somente no grupo TLR4 KO (figura 26).

Observamos uma maior expressão de TNF- α nos animais do grupo Duplo KO em comparação aos animais do grupo LDLr KO, independente da dieta utilizada. A dieta hiperlipídica estimulou a expressão dessa citocina em ambos os grupos deficientes para o receptor LDL, mas este efeito é mais evidente nos animais LDLr KO (figura 26).

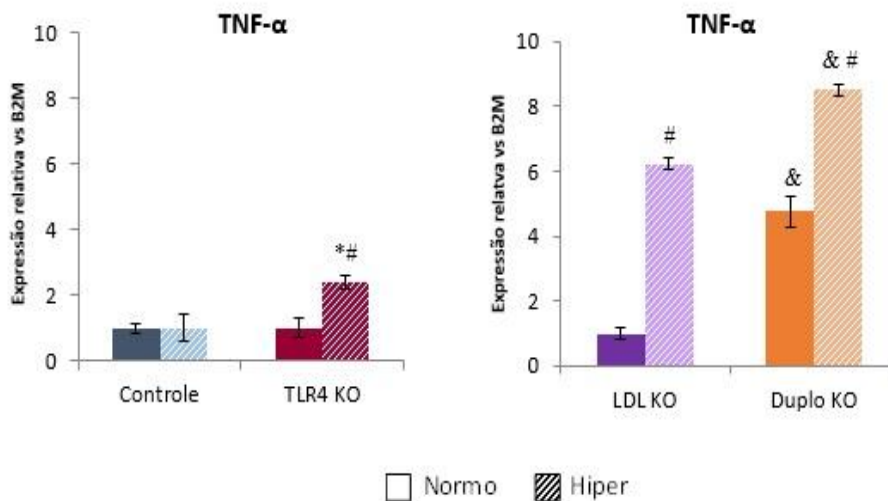


Figura 26: Expressão de TNF- α nos grupos de animais controle, deficientes para o receptor TLR4 (TLR4KO), deficientes para o receptor de LDL (LDL KO) e deficientes para os receptores de LDL e TLR4 (Duplo KO). Normo: dieta normolipídica, Hiper: dieta hiperlipídica. n= 7 por grupo. * p< 0,05 em comparação ao grupo controle tratado com a mesma dieta. # p< 0,05 em comparação ao mesmo grupo tratado com a dieta normolipídica. & p< 0,05 em comparação ao grupo LDL KO tratado com a mesma dieta.

6. DISCUSSÃO

6.1 - Considerações sobre o modelo experimental utilizado

Estudos de NAFLD/NASH em humanos têm limitações devido ao longo tempo necessário entre a ocorrência e progressão da NAFLD/ NASH. Além disso, existem limitações éticas na administração de drogas e na coleta de tecidos hepáticos dos pacientes para o estudo da doença. Modelos animais de NAFLD/NASH fornecem informações cruciais não apenas na elucidação da patogênese da doença, mas também na avaliação dos efeitos terapêuticos dos vários agentes utilizados (48).

A NAFLD é um componente da síndrome metabólica e está frequentemente associada a hiperlipidemia e aterosclerose (9). Um dos modelos mais usados para os estudos de aterosclerose é o camundongo knockout para o receptor da LDL (LDLr KO). Diferente do perfil de lipoproteínas do camundongo selvagem, em que a maior parte do colesterol está presente na fração HDL, o perfil de lipoproteínas do camundongo LDLr KO é similar ao perfil de lipoproteínas humano, em que o colesterol é principalmente encontrado na fração LDL (49). Esses animais, quando alimentados com uma dieta rica em gorduras e colesterol, desenvolvem hipercolesterolemia (50).

Além do emprego em estudos de aterosclerose, esse modelo animal tem sido utilizado em estudos de NAFLD e NASH. Bieghs e colaboradores (51) encontraram achados histológicos hepáticos compatíveis com esteatose em camundongos LDLr KO após três meses de alimentação com uma dieta rica em gorduras e colesterol. Observaram ainda inflamação e fibrose, além de

aumento na atividade de enzimas relacionadas à apoptose, sugerindo que este é um modelo promissor para o estudo da NAFLD/ NASH em todas as formas da doença.

Com isso, consideramos útil o emprego desse modelo animal em nosso estudo devido ao mesmo mimetizar as condições para o desenvolvimento da NAFLD, o que nos possibilitou avaliar o papel do receptor TLR4 no metabolismo de lipídios no fígado.

Observamos neste estudo que todos os grupos tiveram ganho de peso similar após 12 semanas recebendo as dietas. Entretanto, observamos aumento na porcentagem de gordura epididimal e retroperitoneal em todos os grupos, indicativo que a quantidade de gordura (18%) fornecida na dieta hiperlipídica é capaz de induzir obesidade nos animais.

Estudos relacionando o papel protetor da deficiência do receptor TLR4 no desenvolvimento da obesidade têm sido relatados. Tsukumo e colaboradores, encontraram menor ganho de peso em camundongos TLR4^{mut} (com perda da função do TLR4) tratados com uma dieta hiperlipídica (55% de calorias provenientes de gordura) por 8 semanas. Os autores ainda observaram um ganho 40% menor de gordura epididimal no camundongo TLR4^{mut} comparado ao controle após a ingestão da dieta hiperlipídica (52). Pierre e colaboradores (2013), num estudo comparativo entre camundongos selvagens e TLR4 KO, encontraram um ganho de peso 81% maior nos animais do grupo selvagem em comparação aos animais deficientes para o TLR4 após 18 semanas de alimentação com uma dieta hiperlipídica (45% de calorias provenientes de gordura). As diferenças no ganho de peso e de gordura visceral encontradas em nosso estudo em comparação aos citados podem ser

decorrentes de diferenças na composição da nossa dieta (menor quantidade de lipídios) e tempo de estudo.

6.2- A ausência do receptor TLR4 interfere no perfil plasmático de lipídios

O principal achado histológico e metabólico na patogênese da NAFLD é acúmulo de TG no fígado. Os ácidos graxos que contribuem para o acúmulo de gordura hepática derivam-se de quatro fontes: ácidos graxos livres liberados da lipólise do tecido adiposo periférico, ácidos graxos formados no hepatócito através da lipogênese, ácidos graxos provenientes da dieta que são captados pelo fígado através da interação de quilomícrons remanescentes com os receptores hepáticos específicos e ácidos graxos livres liberados da hidrólise de quilomícrons circulantes pela lipase de lipoproteínas (53).

Em nosso estudo utilizamos um modelo animal que não remove o LDL da circulação de modo eficiente e pudemos observar que a deficiência no receptor de LDL promoveu um aumento da trigliceridemia e da colesterolemia nos grupos LDLr KO e Duplo KO, desde o tratamento com a dieta controle. Em relação aos níveis de AG livres só encontramos aumento nesses grupos após o tratamento com a dieta hiperlipídica. Estes efeitos da dieta hiperlipídica no grupo LDLr KO se mantiveram até o final do tratamento. Entretanto, no grupo Duplo KO observamos que esse padrão se manteve apenas em relação ao colesterol total. Animais deficientes para os dois receptores apresentaram queda significativa nos níveis de TG e AG livres após 8 semanas de tratamento, atingindo valores aproximados aos dos animais que receberam a dieta controle. Estes dados sugerem que a ausência do receptor TLR4 confere

um mecanismo adaptativo a esses animais em relação ao metabolismo de AG quando a oferta de gordura aumenta. Dados semelhantes aos nossos foram descritos previamente. Ding e colaboradores (54) encontraram menor aumento na hipercolesterolemia e, especialmente, na hipertrigliceridemia no grupo Duplo KO alimentado com dieta diabetogênica por 12 e 24 semanas comparado com seu grupo controle, os animais LDLr KO. O estudo de Frisard e colaboradores mostrou que animais com TLR4^{mut} apresentavam níveis plasmáticos inferiores de TG e AG livres em comparação aos animais do grupo controle devido à maior capacidade basal de oxidação de AG pelo músculo dos mesmos após estimulação por LPS (55).

Além de um maior consumo de lipídios pelos tecidos periféricos, um outro mecanismo possível para a menor concentração plasmática de triglicérides dos animais Duplo KO seria uma menor capacidade de secreção e portanto acúmulo delas no fígado. Em relação ao conteúdo de lipídios hepático, observamos que todos os grupos apresentaram maior conteúdo hepático de TG e de colesterol após a ingestão da dieta hiperlipídica. O aumento observado no conteúdo hepático de colesterol dos animais LDLr KO e Duplo KO foi superior, embora sem diferença entre eles. Estes dados sugerem que a menor concentração plasmática de triglicérides dos animais Duplo KO não se deve à menor capacidade de secreção dos mesmos, em comparação com os animais LDLr KO, mas poderia estar relacionada a uma menor capacidade de produção ou maior taxa de oxidação e excreção de gorduras pelo fígado. Assim, analisamos diferentes enzimas de vias de síntese e degradação de AG que poderiam ser alteradas pela ausência da sinalização pelo TLR4 e, assim, modificar o perfil de lipídios circulantes.

6.3- A ausência do receptor TLR4 não altera a produção de TG pelo fígado

Os triglicerídeos constituem a maior forma de estoque de energia nos mamíferos. Muitos tecidos têm capacidade para sintetizar triglicérides, porém apenas adipócitos e hepatócitos são capazes de estocá-lo em grandes quantidades (56).

O fígado armazena gordura quando o suprimento de lipídios excede as demandas metabólicas orgânicas e libera de modo controlado para a periferia quando este fornecimento por outras vias encontra-se limitado. Esta liberação ocorre sob a forma de VLDLs (56) contendo triglicérides endógenos e ApoB100, que são secretadas diretamente no plasma. A formação inicial da VLDL depende primariamente do fornecimento de triglicérides hepático e da atividade da proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP). Se estes estiverem deficientes, a ApoB100 é degradada e pouca quantidade de VLDL é formada (57).

Avaliamos a síntese de TG endógeno através da análise da expressão gênica de enzimas que participam da síntese de triglicerídeos: glicerol 3 fosfato aciltransferase 1 (GPAT 1) e glicerol 3 fosfato aciltransferase 4 (GPAT4).

A síntese hepática de TG envolve quatro reações: três reações de esterificação e uma reação de hidrólise. A primeira reação consiste na acilação, ou seja, adição de grupos acil, ao glicerol 3 fosfato para formar acilglicerol 3 fosfato ou ácido lisofosfatídico. Esta reação ocorre no retículo endoplasmático ou na mitocôndria pela ação da glicerol 3 fosfato aciltransferase (GPAT) e é considerada a reação limitante na taxa de formação de TG (58). O ácido

lisofosfatídico mitocondrial é transportado no fígado pela proteína de ligação de ácido graxo (FABP) para o retículo endoplasmático onde a segunda acilação, catalisada pela ácido lisofosfatídico acil transferase produz o ácido fosfatídico. O terceiro passo na síntese de TG consiste da hidrólise do éster fosfato do ácido fosfatídico transformando-o em diacilglicerol (DAG) pela ação da ácido fosfatídico fosfatase localizada no citosol e microsomas dos hepatócitos. Essas três primeiras reações também ocorrem na síntese de fosfolipídios. A quarta e última reação é específica da síntese de TG e consiste na acilação de DAG para TG pela ação da diacilglicerol aciltransferase microsomal (DGAT) (59).

Quatro isoformas homólogas de GPATs catalisam a síntese de ácido lisofosfatídico do glicerol 3 fosfato e de acil-CoA de cadeias longas, sendo GPAT1 e 4 as mais importantes no fígado. A GPAT1 é uma proteína da membrana mitocondrial externa que parece competir com a CPT 1 por acil-CoAs de cadeia longa, canalizando-os para vias de síntese de TG (60, 61). A GPAT4 é uma isoforma encontrada na membrana do retículo endoplasmático que também catalisa a primeira reação de síntese de TG (62).

Embora não tenhamos observado diferença na expressão de GPAT1 entre os grupos, a dieta hiperlipídica aumentou a expressão de GPAT4 nos grupos TLR4 KO, LDLr KO e Duplo KO. Este resultado é esperado, visto que a dieta aumenta o suprimento de AG para o fígado e estes são utilizados na produção de TG. Não houve, no entanto, diferença na expressão de GPAT4 entre os grupos LDLr KO e Duplo KO, indicando que a via de síntese de TG não é modulada pelo receptor TLR4.

Para analisarmos se a ausência do receptor TLR4 alterou a síntese de VLDL pelo fígado, avaliamos a expressão de ApoB100 e MTTP. Nossos dados não demonstram diferenças na expressão gênica destas proteínas no grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO. Esses resultados indicam que a diminuição plasmática de TG nos animais Duplo KO não se deve a menor produção de VLDLs.

6.4- A ausência do receptor TLR4 aumenta a oxidação de AG pelo fígado

O excesso de AG pode ser direcionado para as vias de degradação através da β -oxidação mitocondrial ou peroxissomal. Devido ao fato da membrana mitocondrial ser impermeável a acil-CoAs, a entrada dos ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria é regulada pela atividade do complexo carnitina, sendo que o primeiro passo desse transporte é mediado pela carnitina palmitoil transferase (CPT 1), localizada na membrana mitocondrial externa, que converte o acil-CoA em acilcarnitina. Na matriz mitocondrial, a CPT 2 reconverte a acilcarnitina em acil-CoA que são degradados via β -oxidação (63).

A β -oxidação engloba uma série de quatro reações enzimáticas que, num processo cíclico, encurta acil-CoAs através da quebra de dois átomos de carbono da carboxila terminal na molécula de acil-CoA, liberando esses dois carbonos como unidades de acetil-CoA, cada vez que um ciclo é totalmente concluído (64). A β -oxidação mitocondrial está primariamente envolvida na oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, média ou longa derivados da dieta e esta via constitui o maior processo pelo qual ácidos graxos são oxidados para

gerar energia. A β -oxidação peroxissomal é utilizada exclusivamente para o metabolismo de ácidos graxos de cadeia muito longa contendo 20 ou mais carbonos, que são mais tóxicos e menos abundantes (65).

A primeira reação na β -oxidação mitocondrial é a α - β desidrogenação do éster de acil-CoA por enzimas da família das acil-CoA desidrogenases. A segunda, terceira e quarta reações são catalisadas pela ação da MTP (proteína trifuncional mitocondrial) que consiste de 4 subunidades α e 4 subunidades β . Este complexo engloba a ação da 2-enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e 3-cetoacil-CoA tiolase. A 3-cetoacil-CoA tiolase (tiolase) realiza a clivagem tiolítica do 3-cetoacil-CoA produzindo unidades acil-CoA + acetil-CoA (66).

A β -oxidação peroxissomal é constituída por duas vias distintas. Uma via clássica, induzida por proliferadores de peroxissoma, que utiliza Acil-CoAs saturados de cadeia linear como substrato, e uma outra via não induzida que age em acil-CoAs ramificados. A acil-CoA oxidase de cadeia linear é responsável pela oxidação inicial de acil-CoAs graxo de cadeias muito longas para trans-2-enoil-CoAs na via regulada pelo PPAR- α , enquanto a acil-CoA oxidase de cadeia ramificada metaboliza acil-CoAs graxo de cadeias ramificadas na via não induzida por PPARs. A segunda e terceira reações da β -oxidação clássica, hidratação e desidrogenação de ésteres enoil-CoA para 3-cetoacil-CoA são catalizadas por uma única enzima, a enoil-CoA hidratase/ L -3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (L -PBE). Cetoacil-CoAs gerados pela L -PBE são convertidos em acetil-CoA e acil-CoA. A molécula de acil-CoA entra novamente para o ciclo da β -oxidação e este processo se repete por cerca de 5 ciclos, resultando na remoção de 10 átomos de carbono. As cadeias encurtadas de

acil-CoAs são então transportadas para a mitocôndria para completar a oxidação (65).

Para estudarmos se a ausência do receptor TLR4 influencia na β -oxidação de ácidos graxos, avaliamos primeiramente a expressão gênica da CPT 1 nos animais. Os dados do nosso estudo demonstraram maior expressão relativa de CPT 1 nos animais do grupo Duplo KO em comparação aos animais LDLr KO em todos os tipos de dieta utilizados, o que sugere que a ausência do receptor TLR4 favorece a β -oxidação mitocondrial por aumentar o fluxo de AG pela membrana mitocondrial através da CPT 1.

Além da CPT 1, avaliamos a expressão gênica de enzimas envolvidas na β -oxidação mitocondrial, MTP ($MTP\alpha$, $MTP\beta$) e na via clássica da β -oxidação peroxissomal, acil-CoA oxidase (ACOX), PBE (enzima Γ -bi/multifuncional) e 3-cetoacil-CoA tiolase (tiolase).

Ao analisarmos a expressão gênica das enzimas, observamos maior expressão de $MTP\alpha$ e $MTP\beta$ nos animais do grupo Duplo KO comparados aos animais LDLr KO após o tratamento com a dieta hiperlipídica. Nossos dados também revelaram maior expressão das enzimas envolvidas na β -oxidação peroxissomal no grupo Duplo KO. Esses animais apresentaram expressão de ACOX significativamente elevada em comparação aos animais LDLr KO em ambos os tipos de dieta utilizados. Também exibiram maior expressão de PBE e tiolase no tratamento com a dieta hiperlipídica, sugerindo que a ausência de sinalização pelo TLR4 altera a expressão de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos.

Não há muitos estudos na literatura avaliando diretamente o papel do TLR4 sobre enzimas do metabolismo lipídico. Frisard e colaboradores (55)

encontraram aumento significativo na atividade das enzimas citrato sintase e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase do músculo esquelético de camundongos com perda funcional da sinalização pelo TLR4 e estimulados pelo LPS, e correlacionaram esses achados com os menores níveis plasmáticos de TG e AG livres encontrados nesses animais. Especificamente em fígado, Maitra e colaboradores (67) mostraram que a ativação de TLR4 por LPS diminui a expressão de CPT 1 e da MCAD (desidrogenase de acil-CoA de cadeia média) neste tecido. Essa modulação estava relacionada com a supressão da oxidação de AG pelo LPS e conseqüente aumento nos níveis plasmáticos de TG e AG livres nos animais (67).

Em conjunto, esses dados sugerem que a ausência do receptor TLR4 influencia no metabolismo de triglicerídeos pelo fígado por favorecer a β -oxidação mitocondrial e peroxissomal de AG.

6.5- A ausência do receptor TLR4 favorece a excreção de colesterol

O excesso de colesterol do organismo é eliminado na bile. Ácidos biliares são importantes agentes fisiológicos para a absorção de nutrientes intestinais e secreção de lipídios, metabólitos tóxicos e xenobiontes. Além disso, os ácidos biliares são moléculas que ativam receptores e participam de vias de sinalização com o objetivo de regular e manter a homeostase energética e metabólica. A conversão do colesterol em ácidos biliares previne o acúmulo de colesterol, triglicérides e metabólitos tóxicos que podem causar injúria ao fígado e outros órgãos (68).

A primeira reação da chamada via clássica de síntese de ácidos biliares é catalisada pela enzima do citocromo P-450, colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7a1) (69), produzindo 7 α -hidroxil colesterol. A relevância fisiológica dessa via e da síntese de ácidos biliares em geral torna-se evidente no fenótipo de camundongos deficientes de CYP7a1 (69). Estes animais demonstram uma alta incidência de letalidade pós natal em consequência de falência hepática e má absorção de vitaminas e gorduras.

Ao analisarmos a expressão de CYP7a1 em nosso estudo, observamos que os animais Duplo KO apresentaram uma expressão dessa enzima significativamente mais elevada que os animais LDLr KO, mesmo tratados com a dieta controle. Estes dados sugerem que a ausência do TLR4 também altera o metabolismo do colesterol, favorecendo sua excreção através de ácidos biliares.

6.6- A ausência do receptor TLR4 altera a inflamação e produção hepática de citocinas

Além do padrão metabólico, neste estudo também avaliamos o perfil inflamatório hepático, visto que o TLR4 é um receptor da imunidade inata e muitos de seus efeitos podem ser atribuídos a ativação de leucócitos nos tecidos.

Observamos aumento na infiltração de macrófagos no fígado dos animais LDLr KO recebendo a dieta hiperlipídica, sendo que não houve aumento significativo na expressão de F4/80 no grupo Duplo KO. A sinalização via TLR4 é importante para o recrutamento de macrófagos para os tecidos.

Este papel é evidenciado principalmente em estudos de endotoxemia, onde se observa o aumento da expressão de diversos fatores quimiotáticos para macrófagos após a estimulação com LPS (70, 71). Além do nosso estudo, o trabalho de Ding e colaboradores (54) também mostra diferenças na infiltração de macrófagos em animais LDLr KO comparados a Duplo KO. Nesse estudo, os autores encontraram níveis de mRNA de F4/80 no fígado de animais LDLrKO significativamente mais elevados do que nos animais Duplo KO tratados com uma dieta diabetogênica. Em conjunto, nossos dados sugerem que o TLR4 tem um papel relevante na infiltração de macrófagos para o fígado.

O aumento no número de macrófagos no fígado de animais que recebem dieta hiperlipídica é normalmente relacionado com maior produção de citocinas pró-inflamatórias nos mesmos, ativando as células estelares hepáticas a produzirem colágeno, causando fibrose tecidual (11, 19, 30). Podemos associar o maior número de macrófagos dos animais LDLr KO após a ingestão da dieta hiperlipídica com a maior expressão de IL-1 β e TNF- α encontrado no fígado desses animais. Acreditávamos que a ausência do receptor TLR4, ao inibir a infiltração de macrófagos no fígado dos animais Duplo KO, também diminuiria a expressão das citocinas pró-inflamatórias. No entanto, encontramos expressão significativamente superior de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos animais Duplo KO após receberem a dieta hiperlipídica.

Embora muitos trabalhos impliquem o TNF- α como um mediador responsável pelas alterações do metabolismo lipídico encontradas em condições inflamatórias (ex. sepse), como hipertrigliceridemia, diminuição da oxidação de ácidos graxos e inibição da síntese de sais biliares (72-74), esta citocina tem papel fundamental na homeostase hepática. Watanabe e

colaboradores (75) demonstraram que o TNF- α regula a proliferação de hepatócitos primários de camundongos, induzindo a formação de matriz extracelular e a sinalização de fatores de crescimento nestas células, favorecendo a regeneração do tecido. Além disso, foi demonstrado por Schnyder-Candrian e colaboradores (76) que a ausência de TNF- α leva a hepatomegalia e esteatose grave em camundongos que receberam dieta rica em colesterol, por diminuir a expressão do receptor scavenger de colesterol (SR-B1), que é responsável pela eliminação do colesterol em ácidos biliares. Desse modo, a maior expressão de TNF- α nos animais Duplo KO, independente da dieta, pode estar relacionada com a melhor capacidade de produção de ácidos biliares, refletindo numa menor concentração plasmática de triglicérides nesses animais.

Assim como na expressão de TNF- α , observamos maior expressão de IL-1 β no grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO após receberem a dieta hiperlipídica. A IL-1 β também regula a produção de ácidos biliares, por modular a expressão do gene da colesterol 7 α hidroxilase (CyP7a1). A CyP7a1 é a enzima limitante para a síntese de ácidos biliares pelo fígado, controlando a concentração plasmática de colesterol. Kojima e colaboradores (77, 78) mostraram que animais deficientes para IL-1 β apresentam expressão reduzida de CyP7a1 e maior concentração plasmática de colesterol quando comparados com animais C57bl do mesmo sexo. Encontramos aumento na expressão de ambas as proteínas nos animais Duplo KO, indicando que a ausência do receptor TLR4 pode estar aumentando a expressão de CyP7a1 via IL-1 β , e desse modo favorecendo a eliminação do excesso de TG plasmáticos nesses animais.

Ainda observamos maior expressão de IL-6 no grupo Duplo KO em comparação ao grupo LDLr KO, porém essa expressão foi superior nos animais alimentados com a dieta controle. Injeções de IL-6 em 3 modelos animais de fígado gorduroso mostraram que essa citocina melhora a esteatose por aumentar a β -oxidação mitocondrial de AG e melhorar a exportação hepática de TG e colesterol (79). Portanto, a menor trigliceridemia dos animais Duplo KO pode estar relacionada a regulação de enzimas de β -oxidação de AG pela IL-6 aumentada.

Juntos, esses dados evidenciam que a ausência de TLR4 modifica o perfil de citocinas inflamatórias do tecido hepático, de forma não diretamente relacionada com a quantidade de macrófagos no tecido. A maior expressão de citocinas inflamatórias vistas no grupo Duplo KO pode estar associada às mudanças metabólicas encontradas nesse grupo e desse modo pode estar exercendo efeitos benéficos ao invés dos efeitos deletérios previamente relatados na literatura.

Resumidamente, nossos dados sugerem que a ausência de sinalização através do TLR4 está associada a um menor aumento da trigliceridemia de animais submetidos a uma dieta hiperlipídica devido à maior expressão de genes associados ao catabolismo de ácidos graxos e produção de sais biliares. Além disso, observamos menor infiltração de macrófagos e alterações na expressão de citocinas inflamatórias no fígado de animais que não expressam esse receptor quando comparados com animais deficientes somente para o receptor de LDL.

7. CONCLUSÕES

O receptor TLR4 está envolvido nas alterações do metabolismo lipídico observados na esteatose hepática não-alcoólica pois:

- A ausência do receptor TLR4 diminui a concentração sérica de triglicérides e ácidos graxos livres nos camundongos deficientes para o receptor de LDL após 8 semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica.
- A ausência do receptor TLR4 favorece a oxidação de AG pelo fígado através da maior expressão de enzimas envolvidas na β -oxidação mitocondrial e peroxissomal, diminuindo deste modo os níveis plasmáticos de TG.
- A ausência do receptor TLR4 favorece a excreção do colesterol através da maior expressão de enzimas de via de síntese de sais biliares.

8. REFERÊNCIAS

1. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Feb; 43(2 Suppl 1): S99-S112.
2. Reaven GM. Role of Insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec; 37: 1595-1607
3. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA*. 2001 MAY 16; 285 (19): 2486-97
4. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*. 2005; 12(6):295-300
5. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(2): 185-192
6. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology*. 2003 (5): 1202-19
7. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and Liver Disease*. 2010; 42: 320–330
8. Ahmed MH, Barakat S, Almobarak AO. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: Has the Time Come for Cardiologists to Be Hepatologists? *Journal of Obesity*. 2012; 1-9
9. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001 Aug; 50: 1844-50
10. Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Digestive and Liver Disease*. 2009; 41: 615–25
11. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two“Hits”?. *Gastroenterology*. 1998; 114(4): 842–45
12. 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. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005 May; 115(5): 1343-51
13. Svedberg J, Strömblad G, Wirth A, Smith U, Bjömtorp P. Fatty acids in the portal vein of the rat regulate hepatic insulin clearance. *J Clin Invest*. 1991; 88(6):2054–58
14. Wiesenthal SR, Sandhu H, McCall R H, Tchipashvili V, Yoshii H, Polonsky K, Shi ZQ, Lewis GF, Mari A, Giacca A. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes*. 1999 Apr; 48: 766-774
15. Balent B, Goswami G, Goodloe G, Rogatsky E, Rauta O, Nezami R, Mints L, Angeletti RH, Stein DT. Acute elevation of NEFA causes

- hyperinsulinemia without effect on Insulin secretion rate in healthy human subjects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 967: 535–543
16. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2008; 134(2):424–31
 17. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology.* 2005; 42: 987-1000
 18. Asrih M, Jornayvaz FR. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Journal of Endocrinology.* 2013; 218(3): 25–36
 19. Hijona E, Hijona L, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators of Inflammation.* 2010; 2010:1-7
 20. Laplante M, Sabatini DM. mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *PNAS.* 2010 Feb 23; 107(8) 3281–82
 21. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun Cem, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Lee C, Manning BD. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011 Jul 6; 14(1): 21-32
 22. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Häkkinen A, Olofsson S-O, Yki-Järvinen H, Borén J. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia.* 2006 Apr; 49(4):755-65.
 23. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol.* 2002 Jul;37(1): 56-62.
 24. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic Cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1998; 27(1):128-133
 25. Rao M, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and Steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease.* 2001; 21: 43–55
 26. T Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* 2011 Jul 15;412(15-16):1297-305
 27. García-Monzon C, Martín-Perez E, Iacono OL, Fernandez-Bermejo M, Majano PL, Apolmarlo A, Larrañaga E, Moreno-Otero R. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *Journal of Hepatology.* 2000; 33(5):716–724
 28. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman M, Clore J. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001; 120(5): 1183–92
 29. Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *American Journal of Gastroenterology.* 2002; 97(11): 2714–2724

30. Browning D, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul; 114(2):147–152
31. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 282: 193–199
32. Angulo P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 346(16): 1221-31
33. Castellano G. Esteatohepatitis nonalcoholica. *Gastroenterol Hepatol*. 1999; 22: 13-19
34. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010; 52: 1836-46
35. Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. The role of lipopolysaccharide/ toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int*. 2010; 4: 659-72
36. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1886-900
37. Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P. Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology*. 2006; 44:322-35
38. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*. 2008;48:322-35
39. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 Complexes. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013 Dec 6; 45: 1-9
40. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006 Feb 24; 124: 783–801
41. Mencin A, Kluwe J, Schwabe F. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 2009 May; 58(5):704-720
42. Dewei Y, Li FYL, Lam KSL, Li H, Jia W, Wang Y, Man K, Lo CM, Li X, Xu A. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut* 2012; 61:1058-67
43. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology Research*. 2013 Jul 9; 1-15
44. Pierre N, Deldicque L, Barbé C, Naslain D, Cani PD, Francaux M. Toll-like receptor 4 Knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. *PLoS One*. 2013 May 31; 8(5): e65601
45. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May; 226(1): 497-50
46. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

48. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 May 21;18(19): 2300-8
49. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and Ldlr mice. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43(5):470-9.
50. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993 Aug; 92(2):883-93.
51. Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, Hendrikx T, Gijbels MJ, van Bilsen M, Bakker J, Binder CJ, Lütjohann D, Staels B, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012; 7(1): e30668
52. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Aug; 56(8):1986-98.
53. 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 May; 115(5):1343-51.
54. Ding Y, Subramanian S, Montes VN, Goodspeed L, Wang S, Han C, Teresa AS 3rd, Kim J, O'Brien KD, Chait A. Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Jul; 32(7):1596-604.
55. Frisard MI, McMillan RP, Marchand J, Wahlberg KA, Wu Y, Voelker KA, Heilbronn L, Haynie K, Muoio B, Li L, Hulver MW. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 May; 298(5):E988-98.
56. Mensenkamp AR, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J Hepatol*. 2001 Dec; 35(6):816-22.
57. Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*. 2013; 33(4): 380-8
58. Stals HK, Top W, Declercq PE. Regulation of triacylglycerol synthesis in permeabilized rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 1994; 343: 99-102
59. Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod Nutr Dev*. 1996;36(4):375-89.
60. Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):501-6
61. Gonzalez-Baró MR, Lewin TM, Coleman RA. Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of

- triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292: G1195–G1199
62. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Jun; 296(6):E1195-209.
 63. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 1997; 244:1–14.
 64. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J.* 1996 Dec 1; 320 (Pt 2):345-57
 65. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 193–230
 66. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 May; 290(5):G852-8
 67. Maitra U, Chang S, Singh N, Li L. Molecular mechanism underlying the suppression of lipid oxidation during endotoxemia. *Mol Immunol.* 2009 Dec; 47(2-3):420-5
 68. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol.* 2013 Jul; 3(3):1191-212
 69. Arnon R, Yoshimura T, Reiss A, Budai K, Lefkowitz JH, Javitt NB. Cholesterol 7-hydroxylase knockout mouse: a model for monohydroxy bile acid-related neonatal cholestasis. *Gastroenterology.* 1998 Nov; 115(5):1223-8.
 70. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol.* 2000 Jun 1; 164(11):5564-74.
 71. Møller AS, Øvstebø R, Westvik AB, Joø GB, Haug KB, Kierulf P. Effects of bacterial cell wall components (PAMPs) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and the chemokine receptor CCR2 by purified human blood monocytes. *J Endotoxin Res.* 2003; 9(6):349-60.
 72. Grunfeld C, Dinarello CA, Feingold KR. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and interferon alpha stimulate triglyceride synthesis in HepG2 cells. *Metabolism.* 1991 Sep; 40(9):894-8.
 73. Hardardóttir I, Sipe J, Moser AH, Fielding CJ, Feingold KR, Grunfeld C. LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters *Biochim Biophys. Acta.* 1997 Feb 18; 1344 (3):210-20.
 74. Memon RA, Feingold KR, Moser AH, Fuller J, Grunfeld C. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am J Physiol.* 1998 Feb; 274(2 Pt 1):E210-7.
 75. Watanabe Y, Osaki H, Akaike T. TNF-alpha bifunctionally induces proliferation in primary hepatocytes: role of cell anchorage and spreading. *J Immunol.* 1997 Nov 15; 159(10):4840-7.

76. Schnyder-Candrian S, Czarniecki J, Lerondel S, Corpataux J, Ryffel B, Schnyder B. Hepatic steatosis in the absence of tumor necrosis factor in mice. *Cytokine*. 2005 Dec 21; 32(6):287-95.
77. Kojima M, Ashino T, Yoshida T, Iwakura Y, Sekimoto M, Degawa M. IL-1 regulates the Cyp7a1 gene and serum total cholesterol level at steady state in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6; 379(2):239-42
78. Kojima M, Ashino T, Yoshida T, Iwakura Y, Degawa M. Interleukin-1 controls the constitutive expression of the Cyp7a1 gene by regulating the expression of Cyp7a1 transcriptional regulators in the mouse liver. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(10):1644-7.
79. Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology*. 2004 Oct; 40(4):933-41.