

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

PATRICIA ACORDI CESCINETTO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DA SREBP-1C NA
REVERSÃO DA DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO INDUZIDO POR
DIETA HIPERLIPÍDICA.**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012

PATRICIA ACORDI CESCINETTO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DA SREBP-1C NA
REVERSÃO DA DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO INDUZIDO POR
DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para
obtenção do grau de farmacêutico no curso de
Farmácia da Universidade do Extremo Sul
Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof.º Dr. Cláudio Teodoro de
Souza

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012

PATRICIA ACORDI CESCONETTO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DA SREBP-1C NA
REVERSÃO DA DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO INDUZIDO
POR DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de farmacêutico, no Curso de farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Bioquímica.

Criciúma, 03 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Cláudio Teodoro de Souza – Unesc - Orientador

Professora Dra. Vanessa de Moraes Andrade - UNESC

Professor Msc. Hugo da Silva Dal Ponte - UNESC

AGRADECIMENTOS

Grata a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou. Agradeço aos meus pais Eduardo e Melania, meus maiores exemplos. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que sempre estivesse andando no caminho correto, por sempre estar ao meu lado mesmo estando distante.

Agradeço também minhas avós Ondina (in memória) e Célia pelo amor, carinho e sabedoria, pelo incentivo de sempre ir em frente, enfrentar os obstáculos e conquistar os meus sonhos.

Ao meu namorado Kevin por todo amor, carinho, paciência e compreensão que tem me dedicado. Obrigada pela super paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem você.

A todos os meus amigos por todo apoio e cumplicidade, porque mesmo quando distantes estavam presentes em minha vida. Aos colegas de sala por todos os momentos em que fomos estudiosos, brincalhões, festeiros e cúmplices.

Ao Professor Cláudio pela paciência e atenção dedicadas nesta caminhada e neste trabalho. A toda equipe do LAFIBE que compartilhei conhecimentos e risadas. Ao Marcelo que além de amigo, companheiro de laboratório, colega de classe, é o irmão que nunca tive.

A todos os professores que fizeram parte da minha vida, pela contribuição na minha vida acadêmica, pelos conhecimentos e por tanta influência na minha futura vida profissional.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice.

¹Patrícia A. Cesconetto, ¹Marisa JS Frederico, ¹Marcelo F. Vitto, ¹Julia Engelmann, ¹Daniela R. Souza, ¹Ricardo A. de Pinho, ²Eduardo R. Ropelle, ²Dennys E. Cintra, *¹Cláudio T. De Souza.

¹Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.

²Faculty of Applied Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Limeira, SP, Brazil.

RUNNING HEAD: Inhibition of SREBP-1c reverses steatosis.

Abstract

Objective. The present study investigated the level of Sterol regulatory element binding proteins (SREBP-1c) and related proteins in obese mice treated with SREBP-1c oligonucleotide to observe a reversal of steatosis. **Materials and methods.** Swiss mice were fed on chow containing 61 kJ% saturated fat for 8 weeks to develop obesity. After this period, one group of animals was used to assess the molecular effects of SREBP-1c antisense oligonucleotide treatment by immunoblot analysis in a dose–response curve (0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 nmol/day). After the dose (3.0 nmol/day) was determined, another group was treated for 14 days. Twenty-four hours after the last injection mice were killed and plasma and hepatic tissue were obtained to evaluate plasma triglycerides and total liver fat. Samples were blotted with anti-SREBP-1c, FAS, SCD-1, PPAR γ , ACC[Ser79] phosphorylation, CPT1, and [Thr172]-phosphorylation of AMPK antibodies. Livers were stained using the haematoxylin method for histological analysis. **Results.** Body weight, epididymal fat and glucose levels were not affected by one daily dose of SREBP-1c/AS. However, total plasma triglycerides and total liver fat were significantly reduced. Also, this treatment inhibited SREBP-1c and reduced protein levels of a series of proteins involved in lipogenesis, including ACC, FAS, SCD-1. Moreover, mice treated with SREBP-1c/AS presented a significant reduction in macroscopic and microscopic features of hepatic steatosis. **Conclusion.** Our results demonstrate that the inhibition of SREBP-1c decreased the expression of lipogenic enzymes, reducing the accumulation of triglycerides and, finally, reversing hepatic steatosis. Thus, SREBP-1c is an attractive target for pharmacological therapeutics in fatty liver.

Keywords: SREBP-1c; steatosis; obesity; liver.

Introduction

The worldwide prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently estimated to affect 30% of the general population, and occurs in the majority of patients with obesity [1,2]. Moreover, deregulation in hepatic lipid synthesis has been associated with NAFLD [for a review, see 3]. Triglyceride levels in livers of mice fed on high-fat diets are high, probably due to increased lipogenesis. Other variables also influence triglyceride levels in livers, like elevated mRNA expression and higher enzymatic activity of several lipogenic enzymes such as fatty acid synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and ATP citrate lyase [4,5]

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) have been described as master transcription factors that belong to the basic helix-loop-helix leucine zipper family. SREBPs regulate enzymes responsible for the synthesis of cholesterol, fatty acids, and triglycerides [6,7]. To date, three SREBP isoforms, SREBP-1a, -1c, and -2, have been proved to be expressed in liver. Whereas SREBP-2 is relatively selective in transcriptionally activating cholesterol biosynthetic genes, SREBP-1c plays a more important role in the regulation of fatty acid synthesis [8,9].

SREBP-1c plays a pivotal role in the dietary regulation of most hepatic lipogenic genes such as FAS, ACC, and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). Studies on gene expression, associated with fatty acid metabolism in NAFLD, observed that *de novo* fatty acid synthesis increases, in association with the increased accumulation of fatty acids in hepatocytes [for a review, see 3]. In the process of fatty acid synthesis, ACC converts acetyl-CoA, an essential substrate of fatty acids, to malonyl-CoA. FAS utilize both acetyl-CoA and malonyl-CoA to form palmitic acid. In addition, SCD-1, through the conversion of saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids, contributes to abnormal partitioning of fatty acids by increasing ACC activity and decreasing fatty acid oxidation, shunting the substrate towards fatty acid synthesis [10,11].

Based on the premise that obesity-associated NAFLD is primarily driven by high fat diet, inducing triglyceride accumulation within the liver, we put forward the hypothesis that blocking the crucial transcription factor responsible for lipogenesis should reverse hepatic steatosis. Some techniques have been developed to achieve direct or indirect inhibition of SREBP-1c, such as liver-specific SREBP-1 knockout mice [12] or mice germline knocked out for SREBP-1a and 1c [8] and SREBP-1c [5]. However, the pharmacological inhibition of this protein by antisense oligonucleotide has not yet been investigated. This technique is similar to pharmacological treatment in humans,

since the treatment begins after the onset of the disease. Thus, concerning the development of NAFLD and its related syndromes, the evaluation of the possible involvement of SREBP-1c bears pathophysiological and clinical relevance, since SREBP-1c could be a potential therapeutic target in these pathological states.

Materials and methods

Sense and antisense oligonucleotide treatment protocols

Sense and antisense oligonucleotides (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were diluted to a final concentration of 3.0 nmol/L in dilution buffer containing 10mmol/L Tris-HCl and 1.0 mmol/L EDTA. The mice were injected intraperitoneally with one daily dose of 500 μ L dilution buffer (vehicle - saline) containing or not sense (SREBP-1c/S) or antisense (SREBP-1c/AS) oligonucleotides. Phosphorothioate-modified oligonucleotides sense (5'- CGG TGA GGC GGC TCT GGA AC-3') and antisense (5'- GTT CAA GAG CCG CCT CAC CG -3') were designed according to the *Mus musculus* and C57BL/6 of sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*Srebf1*) sequences deposited in NIHNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) under the designation NM 011480, chromosome 11.

Experimental protocols

Four-week-old male Swiss mice were obtained from our breeding colony (UNESC) and kept housed in individual cages under a 12-h artificial light-dark cycle. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies. After the acclimatization period (3 days), the animals were randomly divided into two groups; control mice (lean) fed on standard rodent chow, and obese mice, fed on a high-fat diet for 2 months (DIO) (Table1). Eight weeks of fat-rich diet feeding was set as the time by which all mice should have developed obesity [13]. After installation/achievement of diet-induced obesity, a dose-response curve was constructed. For this, 20 mice were divided in five groups (0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 nmol/day), which received SREBP-1c antisense oligonucleotide treatment administrated intraperitoneally for four days (n = 4 per dose). After the oligonucleotide dose was determined, another set of 24 mice was divided in four groups (six per group) treated with (I) a daily dose of oligonucleotide dilution vehicle (Lean); (II) a daily dose of oligonucleotide dilution vehicle (DIO); (III) Sense (DIO/S) oligonucleotides, and (IV) antisense (DIO/AS) oligonucleotides (3.0 nmol/day) anti-SREBP-1c, starting from the

8th week after the beginning of the diet. In this phase of the experiment, six mice per group were used for biochemical analysis and protein analysis, but for histology analysis only four mice per group were used. On the 14th day of oligonucleotide treatment, the animals were decapitated and blood and hepatic tissue was extracted for measurement of protein levels by Western blot, liver histology, plasma triglyceride and liver fat content.

Biochemical measurements

Feeding serum glucose was measured using a glucometer. Total liver fat was measured according to the gravimetric method [13]. Serum triglycerides were assessed according to colorimetric assays (Wako Chemicals, Neuss, Germany).

Protein analysis by immunoblotting

The animals were decapitated and hepatic tissue was homogenized immediately in extraction buffer at 4 °C using a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35). The extracts were centrifuged at 11 000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification, using the Bradford method [14]. Aliquots of 0.2 mg of protein extracts, obtained from each tissue, were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-SREBP-1, anti-PPAR γ , anti- β -actin, anti-ACC, anti-AMPK, anti-FAS, anti-SCD1, anti-CPT-1 antibodies, from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho [Thr172]AMPK antibodies, from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), and anti-phospho [Ser79]ACC, from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA). The original membrane was stripped and reblotted with β -actin loading protein. Chemiluminescent detection was performed with horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies. Visualization of protein bands was performed by exposure of membranes to RX-films. Band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD) of the developed autoradiographs.

Liver histology

Hydrated, 5.0- μm sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver fragments were stained with haematoxylin–eosin and analyzed and photo-documented using an Olympus BX60 microscope.

Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SEM. Differences between the DIO and SREBP-1c/AS groups after treatment were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a *Bonferroni* post hoc test was performed.

Results

The potency of the phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide to SREBP-1c (SREBP-1c/AS) was tested in a dose–response experiment. As shown in Fig. 1A, a daily dose of 4.0 nmol SREBP-1c/AS was sufficient to inhibit SREBP-1c expression by $93 \pm 7\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$), while 2.0 nmol/day resulted in a $76 \pm 11\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$) inhibition of SREBP-1c expression in the liver. One daily dose of 3.0 nmol SREBP-1c/AS was sufficient to inhibit SREBP-1c expression by $84 \pm 12\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$), and no statistically significant difference was observed using the 4.0-nmol dosage, and was therefore adopted in the remaining experiments. SREBP-1c/AS promoted no significant changes in the expression of the structural β -actin proteins in the liver (Fig 1A). The SREBP-1c expression did not change with sense oligonucleotide treatment, when compared with DIO saline/vehicle group (Fig 1B). Therefore, the DIO group was excluded from the other experiments.

After the optimal dose was established, the next step was to evaluate the effect of the inhibition of SREBP-1c/AS expression on metabolic and physiological parameters in DIO mice. Higher body weight as well as increased epididymal fat, feeding glucose, total plasma triglycerides and total liver triglycerides were observed in DIO mice, as compared to age-matched controls. Treatment with SREBP-1c/AS did not alter body weight, epididymal fat and serum glucose, but we observed a reduction in total plasma triglycerides and total liver fat (Table 2). These results indicate that the inhibition of SREBP-1c was sufficient to alter plasma and hepatic lipids, suggesting that this treatment reduced accumulation of fat in liver of obese mice. There was no significant difference in food intake in the group treated with antisense SREBP-1c (data not shown).

To elucidate the underlying mechanisms for the amelioration of fatty livers by SREBP-1c/AS treatment in DIO mice, we evaluated the hepatic expression of various lipogenic enzymes by Western blot analysis. These enzymes used were ACC, FAS and SCD-1. Fat-rich diet led to a 5.0-fold decrease in ACC phosphorylation, while treatment with SREBP-1c/AS caused a 3.0-fold increase in ACC phosphorylation. In the liver of DIO/S mice, FAS expression increased by 4.6 times, when compared with control group. Antisense treatment reduced this expression by 1.6 times, as compared with the DIO group (Fig 2B). Figure 2C demonstrates that SCD-1 increased by 5.5 times in the DIO/S mice group, while that treatment with antisense reduced this expression by 2.2 times. In addition, PPAR γ expression was analyzed because it has been associated with hepatic steatosis development [15] and may stimulate lipogenesis [16]. PPAR γ expression increased by 4.2 times in the DIO/S group, though the antisense treatment reduced this expression by 1.7 times (Fig 2D).

In DIO/S mice, phosphorylation underwent a 5.4-fold decrease, while the antisense treatment increased phosphorylation of AMPK (by 3.7 times, Fig 3A). Livers of the DIO/S group showed a 3.3-fold drop in CPT1 expression, when compared with the control group (Fig 3B). Treatment with SREBP-1c/AS increased CPT1 expression by 2.5 times (Fig 3B). In all figures, the membrane was stripped and immunoblotted with anti- β -actin, as a loading protein.

Four obese mice treated with SREBP-1c/AS were randomly selected for histological analysis of the liver. As shown in Figure 4B, DIO/S presented a steatotic liver, with intra-hepatocyte fat deposits predominantly in the perivenular zone that extended to the external areas of the lobule. Treatment with SREBP-1c/AS partially restored the microscopic aspect of the liver (Fig 4C).

Discussion

The fatty liver is a precursor to more advanced nonalcoholic steatohepatitis liver disease, a condition that may progress to cirrhosis [17]. Unfortunately, as a rule positive changes in lifestyle are notoriously difficult to sustain, and therefore the development of additional strategies for the treatment of NAFLD have become necessary. In this sense, studies have shown that the accumulation of fat in the liver can be associated with high protein levels of SREBP-1c [18,19]. Thus, in the present study we analyzed the impact of the antisense oligonucleotide-mediated reduction of SREBP-1c protein levels in DIO mice.

A previous study used the technique of homologous recombination to generate mice with disruptions in the gene encoding the SREBP-1c, and found that fatty acid synthesis was decreased in livers of these mutant mice [8]. Under a normal diet, livers of SREBP-1c^(-/-) mice manifested reductions in multiple mRNAs, encoding enzymes involved in fatty acid and triglyceride synthesis, including ACC and FAS. Yahagi and colleagues (2002) showed that disruption of SREBP-1 caused a reduction in hepatic expression in many lipogenic genes and prevented fatty livers in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice, indicating that SREBP-1 controls triglyceride accumulation in the liver by regulating the protein levels of lipogenic enzymes. In addition, mice that overexpressed SREBP-1c presented a significant increase in fatty acid synthesis and in levels of lipogenic genes [8,9]. SREBP-1c induces transcription of almost all genes encoding the enzymes involved in both *de novo* fatty acid synthesis and esterification of fatty acids into TG [20]. In our model of steatosis induced by a high-fat diet, the SREBP-1c protein level was found to increase in livers.

The antisense oligonucleotide is an effective treatment that has been used in several studies [21], including some investigations conducted by our research group [13,22,23]. In the present study, treatment with oligonucleotide was effective in reducing the expression of SREBP-1c. Similarly, fatty acid synthetic enzymes such as ACC, FAS, SCD-1, which are directly transcribed by SREBP-1c, were also changed. ACC catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA to form malonyl-CoA. In the present study, we observed higher ACC phosphorylation; thus, we suggest that production of malonyl-CoA is less intense, diminishing the availability of substrate for the synthesis of long chain saturated fatty acids by FAS. In agreement with this finding, FAS expression decreased. Moreover, lower malonyl-CoA production rates decrease the allosteric inhibition of CPT-1, thereby increasing fatty acid entry into the mitochondria for oxidation. Accordingly, etomoxir, a CPT-1 inhibitor, inhibits fatty acid oxidation and induces steatosis [24]. Since the results suggested that the oligonucleotide treatment may decrease substrates for fatty acid synthesis, the next step was to evaluate the expression of SCD-1, an enzyme precursor used in the synthesis of monoacylglycerols. In a previous study [25], SCD-1-knockout mice demonstrated decreased *de novo* lipogenesis with increased mitochondrial fat oxidation; these mice were protected from fatty liver. Oligonucleotide inhibition of SCD-1 in liver and adipose tissue also showed similar results [22]. In the present study, SCD-1 protein level was reduced possibly due to the reduction in SREBP-1c protein levels. Previous studies have demonstrated that

PPAR γ overexpression is both necessary and sufficient to induce fatty liver [15,26,27]. Hepatic PPAR γ expression is up-regulated in animal models of steatosis. This positive association between PPAR γ and liver fat storage is supported by studies by Yu *et al.* (2003), in a study that showed that PPAR γ 1 overexpression in liver causes hepatic steatosis. Our results demonstrated that treatment with oligonucleotides SREBP-1c reduced PPAR γ expression.

The overexpression of AMPK α 1 ameliorates fatty liver [28] and a role for AMPK in this mechanism has been confirmed by the decrease in liver TG content in lean and obese rodents during AICAR infusion [29] and treatment with the direct AMPK activator, A-769662 [30]. Treatment with SREBP-1c increased AMPK phosphorylation. Moreover, studies show that the phosphorylation of AMPK inactivates ACC [31,30,29]. Nevertheless, the mechanisms involved in the process of increased AMPK phosphorylation, induced by antisense oligonucleotide, remain uncertain.

In summary, we demonstrate that the inhibition of SREBP-1 attenuates the incidence of fatty liver in DIO mice. The inhibition with antisense oligonucleotide may represent a pharmacological treatment in humans, leading to the reversible inhibition of certain proteins/enzymes after the onset of disease. The present work, and others conducted on this subject, produce more evidence that SREBPs play an important role in regulating lipogenesis and should be an attractive target for pharmacological therapeutics in fatty liver.

Conflict of interest

There is no conflict of interest. The authors only are responsible for the content and writing for the paper.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

References

- [1] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98:960-7.

- [2] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-95.
- [3] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-38.
- [4] Shimano HN, Yahagi M, Amemiya-Kudo AH, Hasty J, Osuga Y, Tamura F. et al. Sterol regulatory element binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 1999;274:35832-9.
- [5] Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002;277:9520-8.
- [6] Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993;75:187-97.
- [7] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-40.
- [8] Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 1997;5:846-54.
- [9] Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 1998;273:35299-306.
- [10] Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;17:6409-14.
- [11] Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2005;4:251-61.
- [12] Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates

- fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem* 2002;277:19353-7.
- [13] De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 2005;48:1860-71.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [15] Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003.278:34268-76.
- [16] Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000;106:1221-8.
- [17] Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterol* 1994;107:1103-9.
- [18] Rebrin KG, Steil M, Getty L, Bergman RN. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 1995;44:1038-45.
- [19] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345-53.
- [20] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.
- [21] Jiang G, Li Z, Liu F, Ellsworth K, Dallas-Yang Q, Wu M, et al. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Clin Invest* 2005;115:1030-8.
- [22] Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, De Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 2008;48:628-37.

- [23] Ropelle ER, Pauli JR, Prada P, Cintra DE, Rocha GZ, Moraes JC, et al. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol* 2009;587:2341-51.
- [24] Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:89-104.
- [25] Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandell BS, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11482-6.
- [26] Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) overexpression. *J Biol Chem* 2003;278:498-505.
- [27] Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003;111:737-47.
- [28] Seo E, Park EJ, Joe Y, Kang S, Kim MS, Hong SH, et al. Overexpression of AMPK α 1 Ameliorates Fatty Liver in Hyperlipidemic Diabetic Rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13:449-54.
- [29] Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell 3rd RR, Young LH, Effect of 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-d ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 2001;50:1076–1082.
- [30] Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2006;3:403-16.
- [31] Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin Invest* 2006;116:1776-83.

Legends

Fig. 1. Molecular effects of antisense oligonucleotide treatment. **A**, Dose–response to SREBP-1cAS; doses employed are depicted in the panel (n = 4). **B**, Immunoblot evaluation of SREBP-1c expression in the liver of control (Lean), obese (DIO) and obese mice treated with sense oligonucleotide (DIO/S) or antisense oligonucleotide SREBP-1c (DIO/AS) (the dose was 3.0 nmol/day). In **B** liver extracts were obtained after 14 days of treatment (n = 6) and samples containing 0.2 mg protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-SREBP-1c or anti- β -actin antibodies. Results are presented as means \pm SEM *p < 0.05 DIO/S vs. Lean and [#]p < 0.05 DIO/AS vs. DIO/S.

Fig. 2. Effects of SREBP-1c/AS on lipogenic molecules in the liver. ACC[Ser79] phosphorylation (**A**), protein levels of FAS (**B**), SCD-1(**C**), PPAR γ (**D**), and were measured in the livers of Lean, DIO/S and DIO/AS by immunoblot (IB) of nitrocellulose membranes containing the transfers of liver total protein extracts resolved by SDS-PAGE. Results are presented as means \pm SEM for n = 6 *p < 0.05 DIO/S vs. Lean and [#]p < 0.05 DIO/AS vs. DIO/S.

Fig. 3. Effects of SREBP-1c/AS lipolytic enzymes in the liver. The amount of [Thr172]-phosphorylation of AMPK (**A**) and CPT1 (**B**) protein were measured in the livers of Lean, DIO/S and DIO/AS by immunoblot (IB) of nitrocellulose membranes containing the transfers of liver total protein extracts resolved by SDS-PAGE. Results are presented as means \pm SEM for n = 6 *p < 0.05 DIO/S vs. Lean and [#]p < 0.05 DIO/AS vs. DIO/S.

Fig. 4. Haematoxylin staining (n = 4) of 5.0- μ m sections of livers obtained from of lean, DIO/S and DIO/AS mice (**A**, **B** and **C**).

TABLE 1. Macronutrients composition of diets

	Control Diet		High-fat diet	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	20	18	19	12
Carbohydrate	62	73	45	27
Total fat	4	9	36	61
kJ/g	15.8		24.5	

TABLE 2. Metabolic characteristics

	Lean	DIO	DIO/S	DIO/AS
Body weight (g)	38.19 ± 1.10	52.11 ± 1.57*	50.21 ± 1.31*	47.14 ± 1.48*
Epididimal fat (%of BW)	1.61 ± 0.32	4.84 ± 0.78*	4.46 ± 0.18*	4.72 ± 0.95*
Plasma Glucose (mg/dL)	101.8 ± 9.41	191.7 ± 11.81*	202.5 ± 13.81*	199.2 ± 15.81*
Total plasma triglycerides (mmol/L)	1.12 ± 0.22	2.82 ± 0.24*	2.54 ± 0.60*	0.98 ± 0.12 [#]
Liver total fat (mg/100mg tissue)	2.1 ± 0.31	15.6 ± 2.32*	16.2 ± 1.62*	4.9 ± 0.51 [#]

Symbols represent statistical significance. n = 6, *p < 0.05 DIO with or without sense treatment versus controls and [#]p < 0.05; DIO with antisense treatment versus DIO and DIO with sense treatment.

Figures

Figure 1

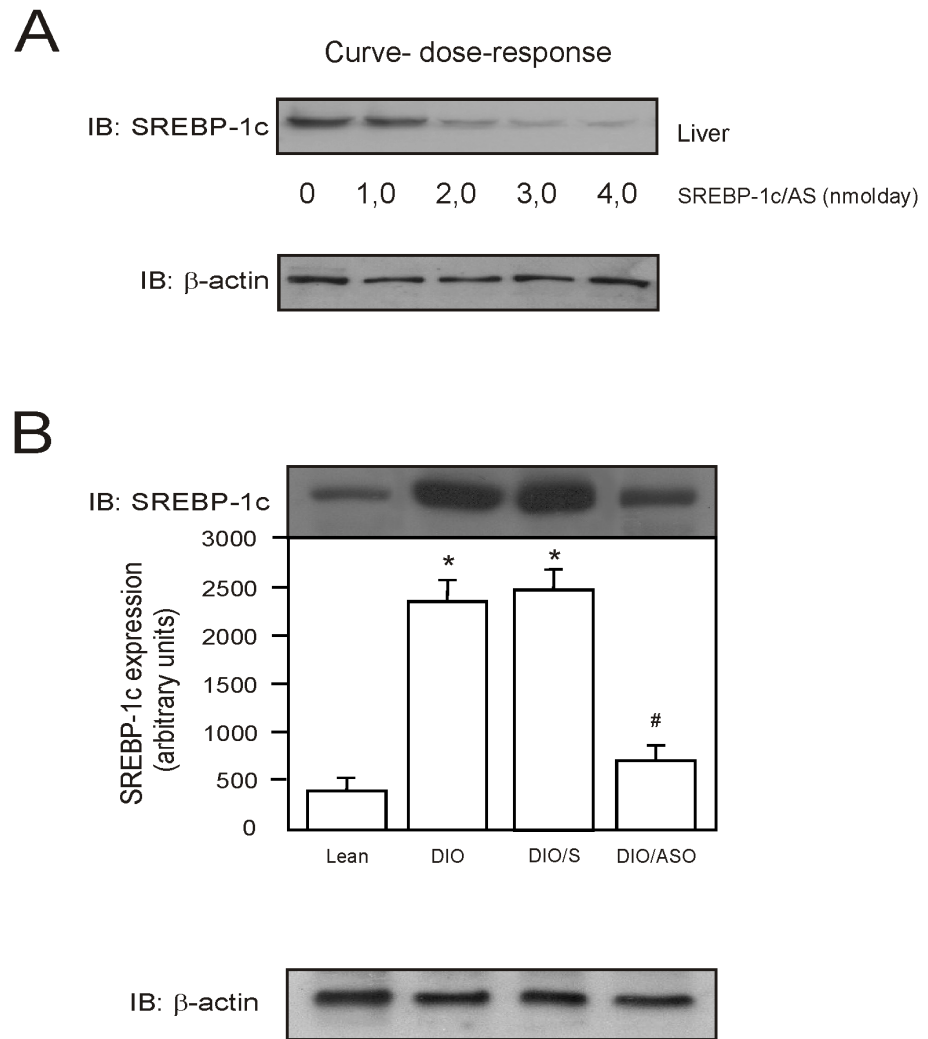


Figure 2

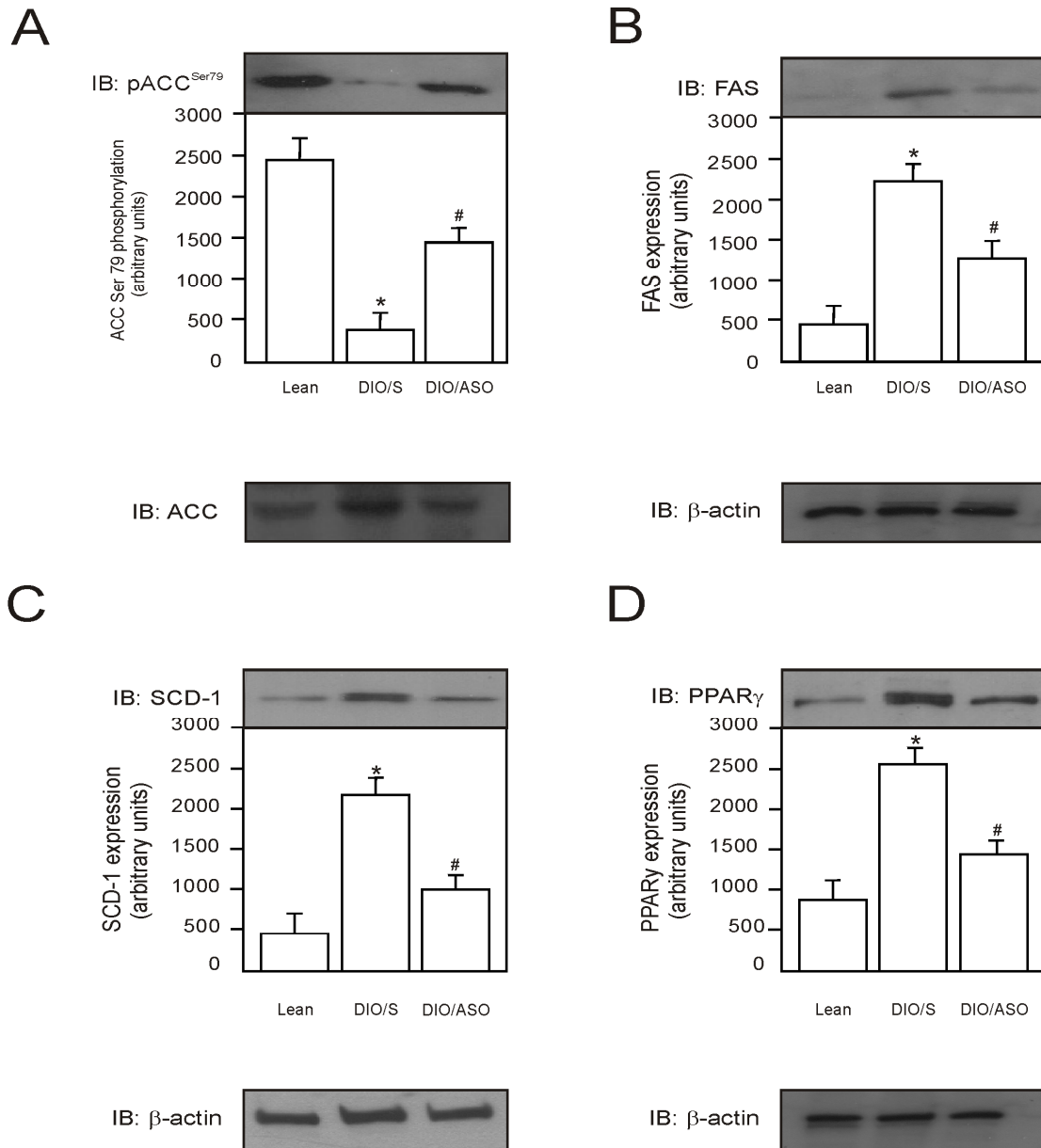


Figure 3

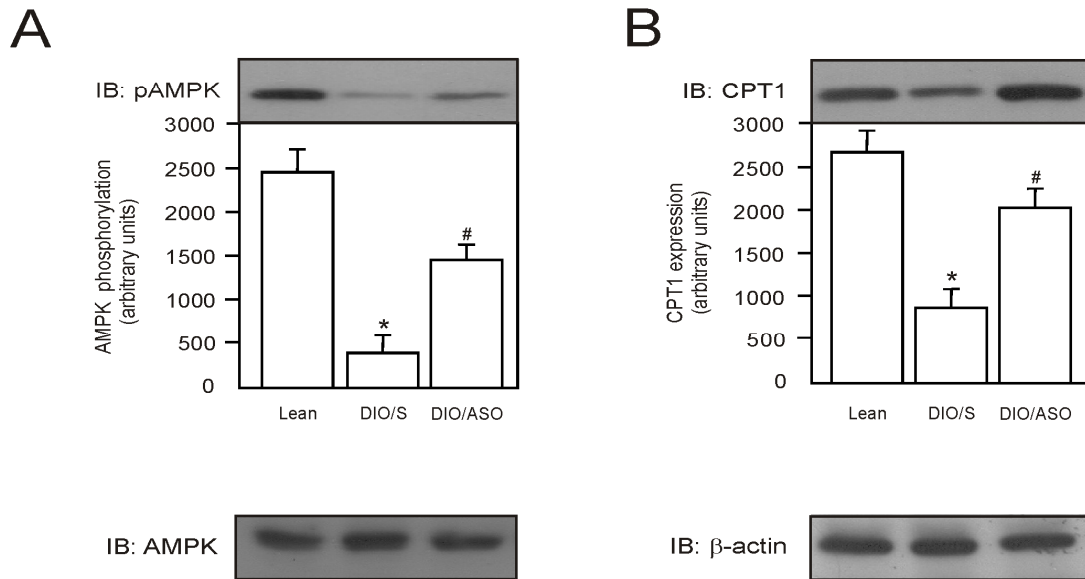
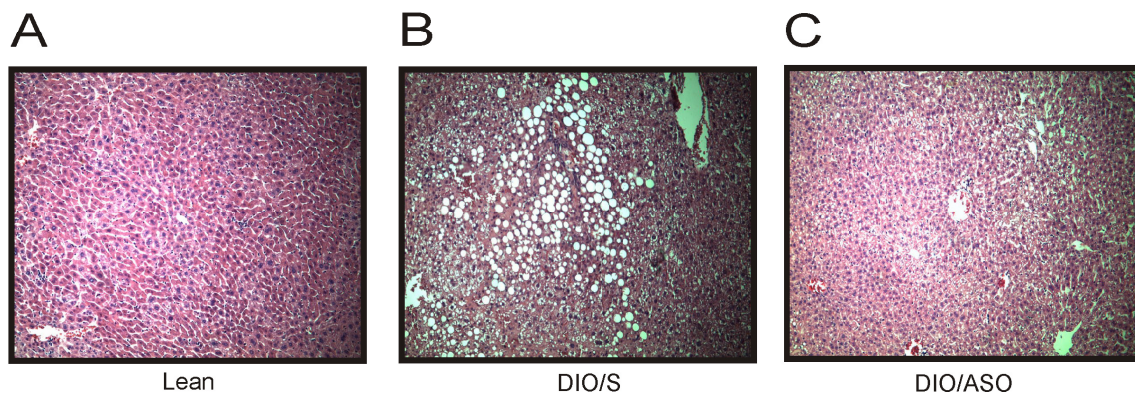


Figure 4



Efeito da inibição da expressão da SREBP-1c na reversão da doença do fígado gorduroso induzido por dieta hiperlipídica.

¹Patrícia A. Cesconetto, ¹Marisa JS Frederico, ¹Marcelo F. Vitto, ¹Julia Engelmann, ¹Daniela R. Souza, ¹Ricardo A. de Pinho, ²Eduardo R. Ropelle, ²Dennys E. Cintra, ^{*}¹Cláudio T. De Souza.

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Unidade de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

²Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade de Campinas – UNICAMP, Limeira, SP, Brasil.

Resumo

Objetivo. O presente estudo investigou os níveis proteicos da proteína 1c ligadora ao elemento regulatório de esterol (SREBP-1c) em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO) tratados com oligonucleotídeo antisense para SREBP-1 c (ASO) na tentativa de reverter a esteatose hepática. **Materiais e métodos.** Camundongos Swis foram alimentados com ração contendo 61 kJ% de gordura saturada durante 8 semanas para desenvolver a obesidade. Após este período, um grupo de animais foi utilizado para avaliar a curva de dose-resposta (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 nmol/dia) do oligonucleotídeo antisense SREBP-1c, através de immunoblot. Após determinada a dose (3.0 nmol/dia), outro grupo foi tratado por 14 dias e, 24 h após a última aplicação, foram mortos e foram coletados sangue e fígado para avaliar triglicerídeos plasmáticos e hepáticos e gordura total. Foi realizado Western blot para avaliar a expressão SREBP-1c, FAS, SCD-1, PPARg, CPT1, AMPK [Thr172] e fosforilação de ACC [Ser79]. Os Fígados também foram corados com hematoxilina e eosina para análise histológica. **Resultados.** Peso corporal, gordura epididimal e níveis séricos de glicose não foram alterados pelo tratamento com antisense. No entanto, os triglicérides séricos e gordura hepática total foram significativamente reduzidos. Além disso, este tratamento inibiu SREBP-1c e reduziu várias proteínas envolvidas na lipogênese, incluindo ACC, FAS e SCD-1. Além disso, camundongos tratados com ASO apresentaram uma redução significativa nas características macroscópica e microscópicas de esteatose hepática (histologia). **Conclusão.** Nossos resultados demonstram que a inibição do SREBP-1c diminuiu a expressão das enzimas lipogênicas, reduzindo o acúmulo de triglicerídeos e, finalmente, revertendo a esteatose hepática em camundongos obesos.

Palavra-chave: SREBP-1c; esteatose; obesidade; fígado.

Introdução

A doença hepática não-alcoólica (NAFLD, do inglês) é uma causa comum de doença hepática crônica e sua prevalência global continua a aumentar com a crescente epidemia de obesidade [1,2]. No mais, a desregulação na síntese de lipídios hepáticos tem sido associado a NAFLD [3]. Níveis de triglicerídeos em fígados de ratos alimentados com dietas com alto teor de gordura podem estar associado a tal ocorrência. Além disso, foi demonstrado que várias enzimas lipogênicas, como ácido graxo sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC) e ATP citrato liase modulam os níveis de triglicerídeos em tecido hepático [4,5].

A proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBPs) têm sido descritas como fatores de transcrição cruciais de enzimas lipogênicas. SREBPs regulam enzimas responsáveis para a síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicérides [6,7]. Até o momento, três isoformas de SREBP, SREBP-1a, -1c e -2, tem sido encontradas no fígado. Considerando que a SREBP-2 é relativamente seletiva em transcrição de genes na biossíntese do colesterol; SREBP-1c desempenha um papel muito importante na regulação da síntese de ácidos graxos. SREBP-1c desempenha um papel fundamental na regulação hepática da maioria dos genes lipogênicos como FAS, ACC e STEAROIL-CoA desaturase-1 (SCD-1). Estudos sobre expressão gênica associada com o metabolismo de ácidos graxos em NAFLD, observou que a aumentada síntese de ácidos ocorre em associação com o maior acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos [3]. No processo de síntese de ácidos graxos, ACC converte a acetil-CoA, um substrato essencial de ácidos graxos, para malonyl-CoA. FAS utiliza acetil-CoA e malonyl-CoA para formar ácido palmítico. Em acréscimo, SCD-1, participa da conversão de ácidos graxos saturados em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), contribuindo para reduzido exportação de ácidos graxos e conseqüente acúmulo no fígado [10,11].

Várias abordagens têm sido desenvolvidas para a inibição direta ou indireta do SREBP-1c, como nocaute da SREBP-1 fígado específico [12] ou nocaute total SREBP-1a e 1c [8] e [5] SREBP-1c. No entanto, inibição farmacológica desta proteína por oligonucleotídeo antisense ainda não foi investigada. Como o desenvolvimento de esteatose hepática e doenças relacionadas tem grande impacto sobre a qualidade de vida de pessoas acometidas, a tentativa de inibição da SREBP-1c parece ser uma abordagem terapêutica bastante promissora. Partindo do pressuposto que a esteatose hepática está relacionada a obesidade e que isso de-se a aumentada lipogênese hepática, com

consequente acúmulo de triglicérideo; nós levantamos a hipótese que inibir o fator de transcrição crucial para a lipogênese, poderia reverter a doença do fígado gorduroso.

Materiais e métodos

Protocolos de tratamento de oligonucleotídeos Sense e antisense

Os oligonucleotídeos sense e antisense (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram diluídos para uma concentração final de 3,0 nmol/L em tampão de diluição contendo 10 mmol/L Tris-HCl e 1,0 mmol/L de EDTA. Nos camundongos foram injetados uma dose diária de 500 μ L de tampão de diluição (veículo - salina) contendo ou não oligonucleotídeos sense ou antisense, intraperitonealmente. O oligonucleotídeo portando modificação fosforotioato da SREBP-1c (5'-GGC TGA CCG TCT GGC GGA AC-3') e antisense (5'-GAG CAA CCG GTT CCT CAC CG -3') foram projetados de acordo com o *Mus musculus* e C57BL/6 da proteína SREBP-1c depositados em NIH.NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), sob a designação NM 011480, no cromossomo 11.

Protocolo experimental

Camundongos machos, da linhagem Swiss, foram fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), mantidos alojados em gaiolas individuais no âmbito de um ciclo artificial de 12-h claro-escuro. A investigação seguiu as orientações da Universidade para o uso de animais em estudos experimentais. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (Lean) alimentados com ração padrão para roedores e camundongos obesos, alimentados com uma dieta rica em gordura durante 2 meses, caracterizando obesidade induzida por dieta (DIO) (Tabela 1). Oito semanas de alimentação rica em gordura, foi definido como o tempo em que todos os camundongos deverão ter desenvolvido obesidade [13]. Depois da instalação da obesidade (DIO), uma curva dose-resposta foi construída. Para isso, 20 camundongos foram divididos em cinco grupos (0; 1,0; 2,0, 3,0 e 4,0 nmol/dia), que receberam tratamento de ASO administrado por via intraperitoneal, durante quatro dias ($n = 4$ por dose). Após determinada a dose, 24 camundongos foram divididos em quatro grupos ($n=6$): i) veículo de diluição oligonucleotídeo (Lean); ii) veículo de diluição oligonucleotídeo (DIO); iii) oligonucleotídeo Sense (DIO/S); e iv) oligonucleotídeo antisense para SREBP-1C (DIO/ASO) 3,0 nmol/dia. Nesta fase do experimento, seis camundongos por grupo foram usados para análise bioquímica e análise de proteínas,

mas para análise histológica apenas quatro camundongos por grupo foram utilizados. No 14º dia de tratamento com oligonucleotídeo, os animais foram decapitados e tecidos sanguíneo e hepático foram extraídos para a avaliação de níveis de proteína por Western blot, histologia do fígado, triglicerídeos do plasma e teor de gordura no fígado.

Determinações bioquímicas

Sem jejum prévio (estado alimentado), a glicemia dos camundongos foi avaliada usando um glicosímetro. Gordura no fígado total foi extraído por solução metanol/clorofórmio (proporção 1:2) utilizado de acordo com o método gravimétrico [14]. No Soro foi avaliado triglicerídeos de acordo com os ensaios colorimétricos (Wako Chemicals, Neuss, Alemanha).

Análise de proteínas por immunoblotting

Os animais foram decapitados e o tecido hepático foi homogeneizado imediatamente em tampão de extração, a 4°C utilizando um Polytron PTA 20S gerador (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm e a 4°C em centrífuga Beckman 70,1 rotor Ti (Palo Alto, CA) durante 40 min para remover material insolúvel, e os sobrenadantes destes tecidos foram utilizados para a quantificação de proteína, utilizando-se o método de Bradford [15]. Alíquotas de 0,2 mg de extratos de proteína, obtidos a partir de cada tecido, foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e blotadas com anticorpos anti-SREBP-1c e anti-PPAR γ , anti- β -actina, anti-ACC, anti-AMPK, anti-FAS, anti-SCD1, anti-CPT-1, adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), anti fosfo[Thr172] anticorpos AMPK, comprados da Cell Signaling Biotechnology (Beverly, MA, EUA), e anti phospho ACC [Ser79], da Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, EUA). A membrana original foi estripada e reblotada com β -actina como proteína controle. A detecção foi realizada por quimioluminescência através de anticorpo secundário conjugado peroxidase. A visualização das bandas de proteína foi realizada por exposição das membranas a filmes de RX. A intensidade das bandas foram quantificadas por densitometria óptica das autoradiografias. (Scion software de imagem, ScionCorp, Frederick, MD).

Histologia hepática

Foram confeccionadas lâminas de cortes de fígado (cortes de 5.0 mm emblocados em parafina) e coradas com hematoxilina/eosina, analisados e as fotos foram documentadas usando um microscópio Olympus BX60.

A análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média. Diferenças entre os grupos foram avaliados utilizando Oneway análise de variância (ANOVA). Quando o ANOVA indicou significância, um teste post hoc Bonferroni foi realizado. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativa. O software utilizado para análise dos dados foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para Windows.

Resultados

O oligonucleotídeo antisense com modificação fosforotioato para SREBP-1c foi testado numa curva dose-resposta. Como mostrado na fig. 1A, uma dose diária de 4,0 nmol de ASO foi suficiente para inibir a expressão de SREBP-1c por $93 \pm 7\%$ ($n=4$, $p < 0,05$), enquanto que 2,0 nmol/dia resultaram numa inibição $76 \pm 11\%$ ($n=4$, $p < 0,05$) da expressão de SREBP-1c. Uma dose diária de 3,0 nmol ASO foi suficiente para inibir a expressão de SREBP-1c por $84 \pm 12\%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), e não foi observada diferença estatisticamente significativa com a dose de 4.0 nmol, e por isso foi adotado nos demais experimentos. Como esperado, a expressão SREBP-1c não se alterou com o tratamento com oligonucleotídeo sense, quando comparado com o grupo DIO (Fig. 1B). Portanto, o grupo DIO foi excluído das outras experiências.

Após a dose estabelecida, o passo seguinte foi avaliar o efeito da inibição da expressão de SREBP-1c em parâmetros metabólicos e fisiológicos em camundongos DIO. Maior peso corporal, bem como aumento da gordura epididimal, de glicose, dos triglicerídeos e lipídeos totais em fígados foram observados em ratos DIO, em relação ao grupo magro. O tratamento com ASO não alterou o peso corporal, gordura epididimal e a glicose no soro, mas observou-se uma redução total de triglicerídeos plasmático e de gordura total no fígado (Tabela 2). Estes resultados indicam que a inibição da SREBP-1c foi suficiente para alterar lipídeos plasmáticos e hepáticos, sugerindo que este tratamento reduziu a acumulação de gordura no fígado de camundongos obesos. Não houve diferença significativa na ingestão de alimentos no grupo tratado com ASO (dados não mostrados).

Para elucidar os mecanismos envolvidos na melhoria do fígado gorduroso por tratamento ASO, avaliamos a expressão de algumas enzimas hepáticas lipogênicas. No fígado de camundongos DIO/S, observou-se uma diminuição 5,0 vezes na fosforilação da ACC, quando comparado com o grupo magro. No grupo DIO/ASO foi observada um aumento de 3,0 vezes na fosforilação ACC, quando comparado com o grupo DIO/S. Em camundongos DIO/S, a expressão FAS foi aumentada (4,6 vezes) quando comparado com o grupo magro. O tratamento antisense reduziu esta expressão em 1,6 vezes, em comparação com o grupo DIO/S (Fig. 2B). A Figura 2 demonstra que SCD-1 aumentou 5,5 vezes no grupo DIO/S, quando comparado com o grupo magro, enquanto que no DIO/ASO uma diminuição de 2,2 vezes foi observada, quando comparado com o grupo DIO/S. Além disso, a expressão PPAR γ foi analisada porque tem sido associado com o desenvolvimento esteatose hepática [16], e pode estimular lipogênese [17]. A expressão PPAR γ aumentou 4,2 vezes no grupo DIO/S, em relação ao grupo magro, embora o tratamento antisense reduziu esta expressão em 1,7 vezes (Fig. 2D), quando comparado com o grupo DIO/S.

Em camundongos DIO/S, a fosforilação da AMPK diminuiu 5,4 vezes quando comparado com o grupo magro. O tratamento antisense aumentou a fosforilação da AMPK (3,7 vezes, Fig. 3A), em DIO/ASO, quando comparado com o grupo DIO/S. Os fígados do grupo DIO/S mostraram uma queda de 3,3 vezes na expressão de CPT1, quando comparado com o grupo magro (Fig. 3B). O tratamento com ASO aumentou a expressão CPT1 em 2,5 vezes (Fig. 3B), em comparação com o grupo DIO/S. Em todas as figuras, a membrana foi estripada e imunoblottada com anti- β -actina.

Quatro camundongos obesos tratados com ASO foram selecionados aleatoriamente para análise histológica do fígado. Como mostrado na Figura 4B, DIO/S apresentou um fígado esteatótico, com depósitos de gordura intra-hepatócitos predominantemente na zona perivenular que se estendia para as áreas externas do lóbulo. O tratamento com ASO parcialmente restaurou o aspecto microscópico do fígado (Fig. 4C).

Discussão

O fígado gorduroso pode ser um precursor de doença hepática não-alcoólica para esteato-hepatite, e que pode evoluir para cirrose [18]. Infelizmente, como uma mudança no estilo de vida são notoriamente difíceis de manter; o desenvolvimento de estratégias adicionais (farmacológicas) para o tratamento de NAFLD é necessário. Neste sentido,

os estudos mostraram que a acumulação de gordura no fígado pode ser associada com níveis elevados de proteína SREBP-1c [19,20]. No presente estudo foram analisadas o impacto da inibição da proteína SREBP-1c por oligonucleotídeo antisense em camundongos DIO.

Em um estudo prévio foi utilizada a técnica de recombinação homóloga para gerar camundongos com perturbações no gene que codifica a SREBP-1c, e descobriu que a síntese de ácido graxo diminuiu em fígados de camundongos mutantes [8]. Sob dieta normal, fígados de SREBP-1c^(-/-) manifestam reduções múltiplas em mRNAs, que codifica as enzimas envolvidas na síntese de ácido graxo e de triglicerídeos, incluindo ACC e FAS. Yahagi e colaboradores (2002) mostraram que menor expressão de SREBP-1 c causou uma redução na expressão hepática em muitos genes lipogênicos e evitou desenvolvimento de fígado gorduroso em camundongos Lep^{ob} / Lep^{ob}, indicando que SREBP-1 está envolvida no acúmulo de triglicerídeos no fígado, através da regulação dos níveis de proteínas lipogênicas [12]. Além disso, os camundongos com superexpressão de SREBP-1c apresentaram um aumento significativo na síntese de ácido graxo e em níveis de genes lipogênicos [8,9]. SREBP-1c induz a transcrição de quase todos os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de ambos, ácido graxo *de novo* e esterificação de ácidos graxos em TG [21]. Em nosso modelo de esteatose induzida por uma dieta rica em gordura, o nível de proteína SREBP-1c foi encontrado aumentado no fígado.

No presente estudo, o tratamento com oligonucleotídeo foi eficaz na redução da expressão de SREBP-1c. Do mesmo modo, as enzimas sintetizadoras de ácidos graxos, tais como ACC, FAS, SCD-1, que são diretamente transcritos por SREBP-1c, também foram alterados. ACC catalisa a carboxilação de acetil-CoA para formar malonil-CoA. No presente estudo, observou-se maior fosforilação ACC, assim, sugerem que a produção de malonil-CoA é menos intensa, diminuindo a disponibilidade de substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa saturados pela FAS. Além disso, menores taxas de produção de malonil-CoA diminuiu a inibição alostérica da CPT-1, aumentando assim a entrada de ácido graxo para a mitocôndria para a oxidação. Tem sido demonstrado que etomoxir, um inibidor da CPT-1, reduz a oxidação de ácido graxo e induz esteatose [22]. Uma vez que os resultados sugeriram que o tratamento com oligonucleotídeo antisense pode diminuir a disponibilidade dos substratos para a síntese de ácido graxo, o passo seguinte foi o de avaliar a expressão de SCD-1, um precursor de enzima utilizada na síntese de monoacilgliceróis. Em um estudo anterior [23], nocaute

de camundongos para SCD-1 demonstraram diminuição da lipogênese *de novo* com a oxidação mitocondrial com aumento de gordura; esses camundongos foram protegidos de fígado gorduroso. A inibição do oligonucleotídeo de SCD-1 no fígado e tecido adiposo também mostrou resultados semelhantes [24]. No presente estudo, o nível de proteína SCD-1 diminuiu, possivelmente devido à redução nos níveis de proteína de SREBP-1c. Em adição, estudos anteriores demonstraram que a superexpressão PPAR γ é necessário e suficiente para induzir o fígado gorduroso [16,25,26]. Expressão hepática de PPAR γ está superexpressada em modelos animais de esteatose. Esta associação positiva entre o PPAR γ e o armazenamento de gordura no fígado é apoiada por estudos realizados por Yu et al. (2003), em um estudo que mostrou que a superexpressão da PPAR γ isoforma 1 no fígado causa esteatose hepática [25]. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com oligonucleotídeo antisense SREBP-1c reduziu a expressão PPAR γ .

A superexpressão de AMPK α 1 melhora o fígado gorduroso [27] isto foi confirmado pela diminuição do teor de TG no fígado em roedores obesos e magros durante a infusão de AICAR [28] e com o tratamento direto AMPK ativador, A-769662 [29]. O tratamento com oligonucleotídeo antisense SREBP-1c aumentou AMPK e fosforilação ACC. O mecanismo pelo qual o tratamento com oligonucleotídeo antisense aumenta a fosforilação AMPK é incerta, no entanto, é difícil de acreditar que isto ocorre diretamente, uma vez que SREBP-1c como controlador da ativação AMPK não tem sido relatada na literatura. Por outro lado, a adiponectina tem sido relatado para controlar a fosforilação de AMPK [30,31,32], o que pode explicar a elevada fosforilação de AMPK no presente estudo. Adiponectina é uma das adipocinas derivadas do adipócito com efeito potente sobre AMPK. Evidência crescente demonstrou que o desenvolvimento de fígado gorduroso está associado com reduzido nível de adiponectina, diminuição da expressão do receptor hepático da adiponectina e sinalização hepática de adiponectina [para uma revisão ver 33]. Dois receptores hepáticos de adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) são expressos e regulam a fosforilação e ativação da AMPK, e desempenham efeitos sobre o metabolismo lipídico do fígado [33]. Baixos níveis de adiponectina circulante foram associadas com esteatose hepática, enquanto a administração de adiponectina promoveu maior oxidação lipídica e menor síntese de lipídios em fígado de camundongos [34]. A estimulação da atividade AMPK por adiponectina leva à inibição da atividade de ACC. Por inibir de ACC (fosforilação aumentada), AMPK aumenta a oxidação de ácido graxo por meio de regulação negativa

de malonil-CoA, resultando em transferência elevada de cadeia longa de acil-CoA para a mitocôndria (através de CPT-1). No presente estudo, os níveis séricos e receptores de expressão de adiponectina não foram avaliados, mas vários estudos têm demonstrado a associação entre a reversão da esteatose hepática, níveis séricos elevados e expressão de receptores de adiponectina [30,31,32,34].

Vários estudos demonstraram que o tratamento com oligonucleotídeo antisense representa uma estratégia eficaz para tratar doenças diferentes em roedores [13,24,30,31], no entanto, o oligonucleotídeo antisense não é um tratamento estabelecido nos seres humanos, e estudos adicionais são necessários. Em resumo, demonstramos que a inibição da SREBP-1 atenua a incidência de fígado gorduroso em camundongos DIO. Isso foi possível devido a menores níveis de proteína de SREBP-1c e redução em várias proteínas envolvidas na lipogênese, incluindo ACC, FAS, SCD-1.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse. Os autores só são responsáveis pelo conteúdo e a redação do papel.

Agradecimentos

Este estudo foi suportado por concessões do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

Referências

- [1] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98:960-7.
- [2] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-95.
- [3] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-38.

- [4] Shimano HN, Yahagi M, Amemiya-Kudo AH, Hasty J, Osuga Y, Tamura F. et al. Sterol regulatory element binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 1999;274:35832-9.
- [5] Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002;277:9520-8.
- [6] Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993;75:187-97.
- [7] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-40.
- [8] Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 1997;5:846-54.
- [9] Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 1998;273:35299-306.
- [10] Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;17:6409-14.
- [11] Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2005;4:251-61.
- [12] Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *J Biol Chem* 2002;277:19353-7.
- [13] De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 2005;48:1860-71.

- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [15] Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003;278:34268-76.
- [16] Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000;106:1221-8.
- [17] Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterol* 1994;107:1103-9.
- [18] Rebrin KG, Steil M, Getty L, Bergman RN. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 1995;44:1038-45.
- [19] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345-53.
- [20] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.
- [21] Jiang G, Li Z, Liu F, Ellsworth K, Dallas-Yang Q, Wu M, et al. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Clin Invest* 2005;115:1030-8.
- [22] Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, De Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 2008;48:628-37.
- [23] Ropelle ER, Pauli JR, Prada P, Cintra DE, Rocha GZ, Moraes JC, et al. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol* 2009;587:2341-51.
- [24] Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:89-104.
- [25] Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11482-6.

- [26] Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) overexpression. *J Biol Chem* 2003;278:498-505.
- [27] Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003;111:737-47.
- [28] Seo E, Park EJ, Joe Y, Kang S, Kim MS, Hong SH, et al. Overexpression of AMPK α 1 Ameliorates Fatty Liver in Hyperlipidemic Diabetic Rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13:449-54.
- [29] Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell 3rd RR, Young LH, Effect of 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-d ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 2001;50: 1076–1082.
- [30] Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2006;3:403-16.
- [31] Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin Invest* 2006;116:1776-83.

Legendas

Fig. 1. Efeitos moleculares do tratamento com oligonucleotídeo antisense. **A**, Dose-resposta para oligonucleotídeo antisense SREBP-1c; doses utilizadas são demonstradas no painel inferior (n = 4). **B**, Immunoblot da expressão de SREBP-1c no fígado de controle (Lean), obesos (DIO) e camundongos obesos tratados com oligonucleotídeo sense (DIO/S) ou antisense (DIO/ASO). Em **B**, extratos de fígado foram obtidas após 14 dias de tratamento (n = 6) e amostras contendo 0,2 mg de proteína foram corridas em SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e blotadas com anti-SREBP-1c, ou anticorpos anti- β actina. Os resultados são apresentados como média \pm SEM *p <0,05 DIO/S vs Controle e [#]p <0,05 DIO/ASO vs DIO/S.

Fig.2. Efeitos do oligonucleotídeo antisense SREBP-1c em moléculas lipogênicas no fígado. Fosforilação de ACC [Ser79] (**A**), os níveis de proteína FAS (**B**), SCD-1 (**C**), PPAR γ (**D**), foram medidos nos fígados dos Controle, DIO/S e DIO/ASO. Os resultados são apresentados como médias \pm EPM para n = 6 *p <0,05 DIO/S vs Controle e [#]p <0,05 DIO/ASO vs DIO/S.

Fig. 3. Efeitos da SREBP-1c/AS sobre enzimas oxidativas no fígado. A quantidade de [Thr172]-fosforilação da AMPK (**A**) e CPT1 (**B**) de proteínas foi avaliada nos fígados dos Lean, DIO/S e DIO/ASO. Os resultados são apresentados como médias \pm EPM para n = 6 *p <0,05 DIO/S vs Controle e [#]p <0,05 DIO/ASO vs DIO/S.

Fig.4. Coloração de Hematoxilina/eosina (n = 4) das seções de 5.0 μ m de fígados obtidos a partir de camundongos magros, DIO/S e DIO/ASO (**A**, **B** e **C**, respectivamente).

TABELA 1. Composição das dietas de macronutrientes

	Dieta controle		Dieta rica em gordura	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Proteína	20	18	19	12
Carboidrato	62	73	45	27
Gordura total	4	9	36	61
kJ/g	15.8		24.5	

TABELA 2. Características metabólicas

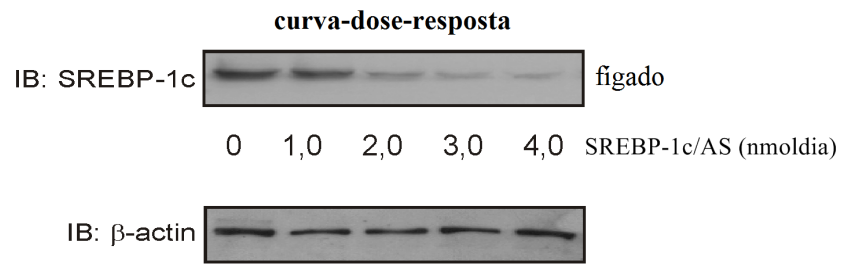
	Controle	DIO	DIO/S	DIO/AS
Peso Corporal (g)	38.19 ± 1.10	52.11 ± 1.57*	50.21 ± 1.31*	47.14 ± 1.48*
Gordura Epididimal (% BW)	1.61 ± 0.32	4.84 ± 0.78*	4.46 ± 0.18*	4.72 ± 0.95*
Glicose do Plasma (mg/dL)	101.8 ± 9.41	191.7 ± 11.81*	202.5 ± 13.81*	199.2 ± 15.81*
Triglicerídeos Totais no Plasma (mmol/L)	1.12 ± 0.22	2.82 ± 0.24*	2.54 ± 0.60*	0.98 ± 0.12 [#]
Gordura Total no Fígado (mg/100mg por tecido)	2.1 ± 0.31	15.6 ± 2.32*	16.2 ± 1.62*	4.9 ± 0.51 [#]

Símbolos representados estatisticamente significativo. n = 6, *p < 0.05 DIO com ou sem tratamento sense versus controle e [#]p < 0.05; DIO com tratamento antisense versus DIO e DIO com tratamento sense.

Figuras

Figura 1

A



B

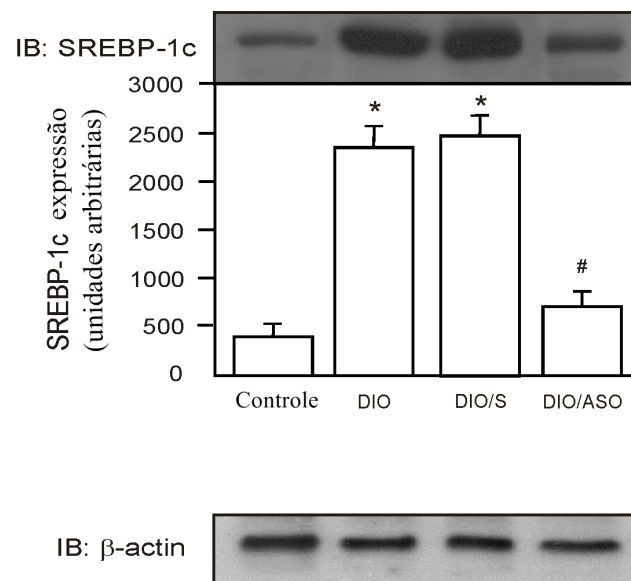
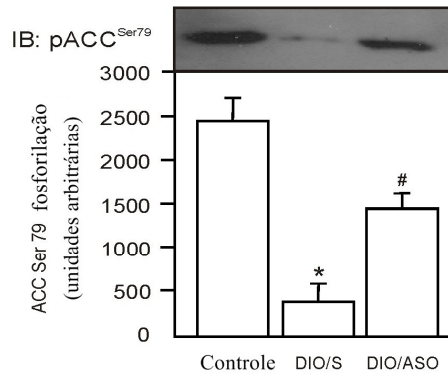


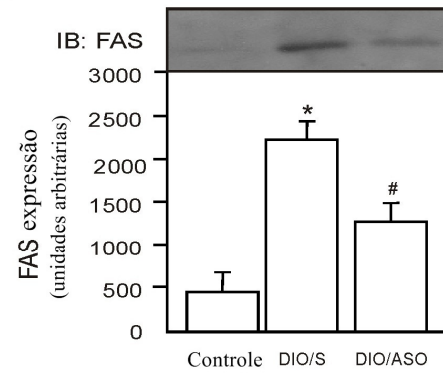
Figura 2

A



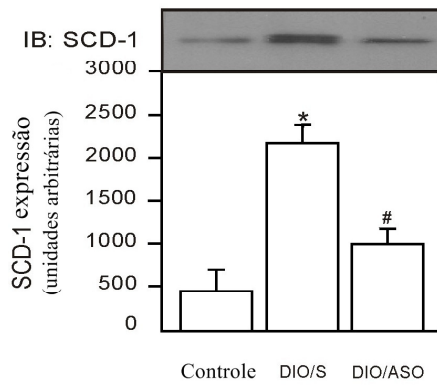
IB: ACC

B



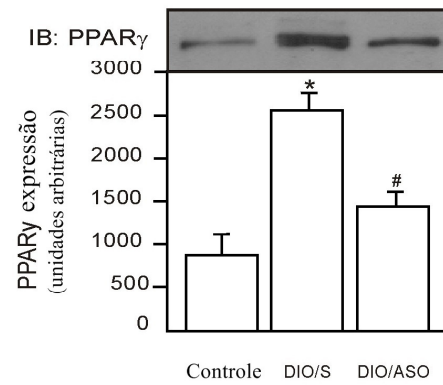
IB: β -actin

C



IB: β -actin

D



IB: β -actin

Figura 3

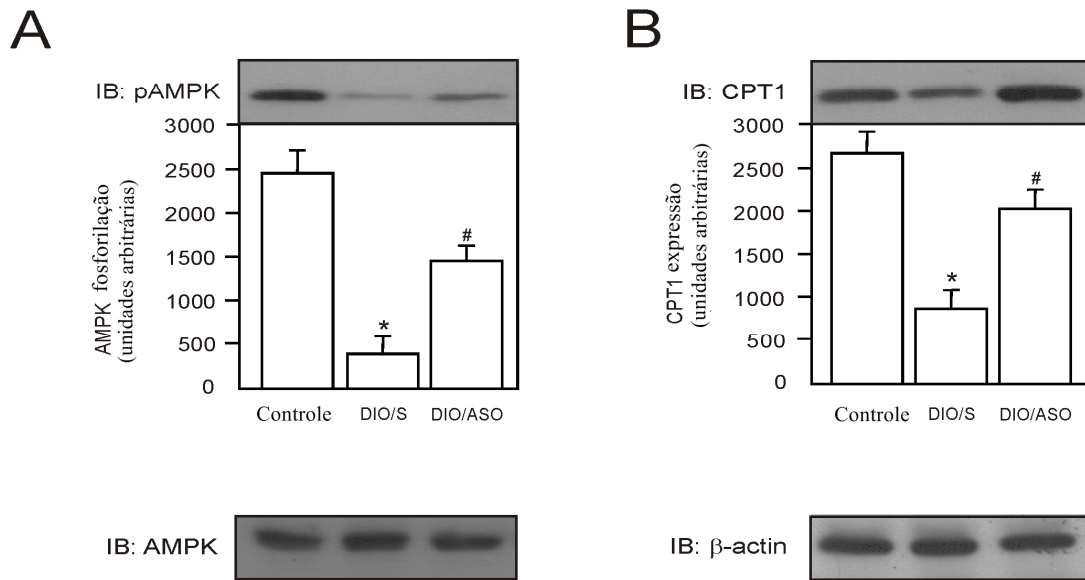
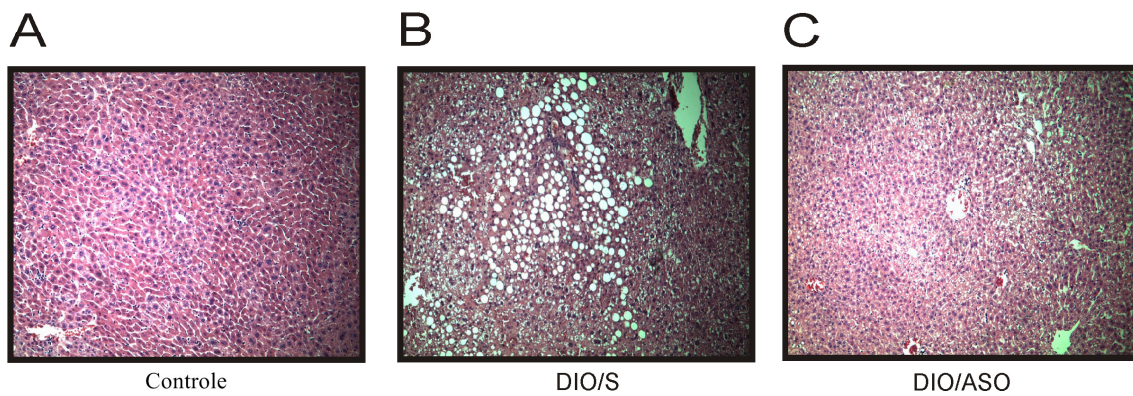


Figura 4



Normas da revista: Scandinavian Journal of Gastroenterology

2011 Impact Factor: 2.019

© Thomson Reuters, *Journal Citation Reports*® 2012

Instructions for Authors

Manuscripts

Manuscripts should follow the guidelines set out in “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” (Ann Intern Med 1997;126:36-47) and in the “Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers“, 6th ed. (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994). They must be clearly written in English.

Present the text in 12 pt font, double spaced and with margins of at least 3 cm. Begin each of the following sections on separate pages: title page, abstract and key words, text, acknowledgements, references, tables (each on a separate page) and figure legends. Number the pages consecutively, beginning with the title page. Divide the text of Original Articles under the following main headings: Introduction, Methods, Results and Discussion. Subheadings may also be used at the author’s discretion. Indicate the approximate positions of Figures and Tables with a cross reference. Submit the manuscript in its final, fully corrected, form and on the express condition that it has not been published, simultaneously submitted or already accepted for publication elsewhere. Alterations made in proof are expensive, and authors will be required to pay the costs of such alterations.

Articles should not exceed 5 printed pages. A page charge of USD 155 will be charged for each exceeding printed page or part thereof. The charges are to be borne by the author(s).

The editors encourage authors to list three or four potential referees along with their full addresses, telephone and fax numbers and e-mail addresses.

Conflict of interest and funding

Authors are responsible for recognising and disclosing financial and other conflicts of interest that might bias their work. They should acknowledge in the

manuscript all financial support for the work and other financial or personal connections to the work.

Ethics and consent

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Papers including animal experiments or clinical trials must be accompanied by an approval by the local ethics committee. Please give date of issue and registration number. Make sure that reporting of random controlled trials complies with the CONSORT guidelines, and that such manuscripts include a flow chart along with a completed checklist when submitted -- both available on the world wide web (<http://www.consort-statement.org>). For statistical guidelines, see the Special Article in the June 1990 issue (Vol. 25, No. 6, pp. 545-547).

Title Page

The title page contains: (1) The title of the article, concise but informative. Subtitles may be used if necessary, but must be short. (2) A short title not exceeding 40 letters and spaces for use as a running headline. (3) The full name of each author. (4) The departments and institutions to which the work should be attributed and their addresses.

Abstracts and Key Words

An abstract not exceeding 250 words structured under the following section titles: Objective, Material and Methods, Results, Conclusions. Use only standard abbreviations. Enter some key words (not more than 10) in alphabetic order below the Abstract. Use terms from the Medical Subject Headings list from Index Medicus. Give the name, current address, fax number and e-mail address of the author(s) to whom correspondence, proofs and offprints are to be addressed.

Acknowledgements

Acknowledge only persons who have made a substantive contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone

acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Acknowledge the source of any financial support.

Tables

Type each table, double-spaced, on a separate page. Do not format tables as photographs. Number them consecutively in roman numerals and give each a short descriptive heading. Place explanatory matter in footnotes to the table, including any non-standard abbreviations. Omit internal horizontal and vertical rules (lines). If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. Make sure that tables are self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

Figures

Submit each figure as a separate file and in TIFF or EPS format with a resolution of at least 300 dpi. Number figures consecutively using Arabic numerals. Prepare the figures in proportion to each other, so that lettering, numerals and symbols in different figures will be roughly the same size after reduction. Decide whether a figure is to cover one, one-and-a-half or two columns of the journal in print, and then plan accordingly. Submit photographs scaled as near to printed size as possible. If magnification is significant, indicate using a bar on the print rather than a magnification factor in the figure legend. If someone appears in a photograph, either s/he must not be identifiable or written permission for use of the photograph must accompany the manuscript. Give each figure a legend containing sufficient information to make the figure intelligible without the reader having to refer to the text. Key all the legends together. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it. Print copy color reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for color is USD 2300 per article.

References

Present the reference list with entries numbered in the order in which they are first mentioned in the text, i.e. consecutively, and include all works cross-referred in the text and in the tables and legends. Give the names of the first SIX authors in the case of multi-author works. If there are seven or more authors, give the names of the first six

followed by et al. Verify accuracy of the reference list before submitting the manuscript for publication and abbreviate titles of journals in accordance with the style used in Index Medicus.

Identify reference indicators in the text, tables and legends using Arabic numerals in parentheses. For example, in the text, give the name of the author followed by the appropriate number in parentheses, e.g. 'Hansen (1) has reported . . .', 'Hansen & Olsen (2) have reported . . .', or by simply giving the appropriate number in parentheses, e.g. 'As has recently been reported (1, 2) . . .'. When there are more than two authors, give only the name of the first author followed by 'et al.'. Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as 'Unpublished observations' (in parentheses).

Abbreviations

Please consult the CBE Manual for standard abbreviations. Explain any non-standard abbreviations (to be avoided if possible) in the text the first time they are used. Avoid abbreviations in the title of the article. Express quantities and units in accordance with the recommendations of the Système International d'Unités (SI).

Letters to the Editor

Correspondence concerning articles in the journal, short reports, etc., will be considered for publication under the heading "Correspondence". Do not exceed 500 words, and include no more than one table/illustration and 10 references (and no Abstract).

Copyright

It is a condition of publication that authors vest copyright in their articles, including abstracts, in Informa UK Ltd. This ensures full copyright protection and dissemination of the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after publication provided that prior permission is obtained from Informa UK Ltd. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. Please click on the link to view '[Copyright Transfer Frequently Asked Questions](#)'.

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE-UNESC
CURSO DE FARMÁCIA**

PATRICIA ACORDI CESCO NETTO

**EFEITO INIBIDOR DA EXPRESSÃO DE SREBP-1C NA
REVERSÃO DA DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO INDUZIDO
POR DIETA HIPERLIPÍDICA.**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2012

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE-UNESC
CURSO DE FARMÁCIA**

PATRICIA ACORDI CECONETTO

**EFEITO INIBIDOR DA EXPRESSÃO DE SREBP-1C NA
REVERSÃO DA DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO INDUZIDO
POR DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Projeto de trabalho de conclusão de curso, apresentado para a disciplina de TCC I, da 7ª fase do curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Orientador: Profº Dr. Cláudio Teodoro de Souza

CRICIÚMA, JUNHO DE 2012

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que aproximadamente um terço da população dos Estados Unidos são obesas (Mokdad 2003). Esta doença decorre de um distúrbio multifatorial, porém determinado pelo padrão alimentar ou ausência de exercício físico ou ambos. Trata-se de um risco potencial para todas as populações, especialmente nos grandes centros urbanos. A obesidade está associada a diversas outras doenças tais como: diabetes mellitus tipo 2 e a doença do fígado gorduroso não-alcoólica, uma das doenças hepáticas que mais acometem pessoas nos países ocidentais (Clark., 2006 e Marchesini & Babini., 2006).

Vários autores têm observado grande associação entre resistência à insulina e a elevada deposição de gordura em tecido hepático; designada como doença do fígado gorduroso não-alcoólica (NAFLD do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*) (Saloranta et al., 1993; Rebrin et al., 1995; Lam et al., 2003 e Samuel et al., 2004). NAFLD afeta cerca de 20 milhões de pacientes nos Estados Unidos dos quais 75% são obesos e possuem diabetes (Ahmed & Byrne., 2007). O risco de NAFLD é quase 5 vezes mais elevado em pessoas com índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Bellentani et al., 2000). O espectro de NAFLD pode variar de um simples fígado gorduroso (esteatose hepática), com prognóstico benigno; para a forma potencialmente progressiva, a esteatohepatite não-alcoólica (NASH do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*), a qual pode levar a uma fibrose hepática e cirrose resultando num aumento da morbidade e mortalidade. Day & James (1998) propuseram um modelo que envolve duas fases na progressão desta patologia. Na primeira fase é o desenvolvimento da esteatose hepática: acúmulo de triglicérides nos hepatócitos. Na segunda fase ocorre a transição de NAFLD para NASH como resultado das ações de moléculas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. No entanto, a inflamação em si é o principal fator na transição de NAFLD para NASH (Jansen., 2004).

Poucos estudos têm sido desenvolvidos para determinar a contribuição da lipogênese na evolução da esteatose hepática. Donnelly e colaboradores (2005) estimaram a contribuição da síntese do conteúdo de gorduras hepáticas em pacientes com NAFLD. O conteúdo de triglicérides contido no fígado destes pacientes, 60% surgiu a partir de ácidos graxos não esterificados, um pouco mais de 10% da dieta, e próximo de 30% vieram da lipogênese *de novo*, ressaltando a importância da síntese de gordura na patologia de NAFLD.

A lipogênese é a síntese de ácidos graxos no organismo a partir da acetil CoA. A glicose derivada do metabolismo dos carboidratos da dieta é o substrato básico para a síntese de ácidos graxos. No fígado, essa síntese também pode ocorrer a partir de frutose, galactose, aminoácidos, lactato e piruvato. Assim, os ciclos que envolvem esses substratos estão em dinâmica inter-relação com a lipogênese (Girard et al., 1997). As principais reações de síntese de ácidos graxos envolvem a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido-graxo sintase (FAS) ocorrem no citoplasma. Elas catalisam a conversão de acetil CoA a palmitato. Sob as condições que favorecem a síntese de ácidos graxos, a citrato sintase mitocondrial catalisa a formação de citrato a partir de acetil-CoA e oxaloacetato. Esse citrato deixa a mitocôndria através da lançadeira de citrato e é clivado a acetil-CoA e oxaloacetato em uma reação catalisada pela ATP-citrato-liase. Esse acetil-CoA é substrato para a síntese de ácidos graxos. O outro substrato, o NADPH, é sintetizado em 2 ciclos no citoplasma. O oxaloacetato oriundo da clivagem do citrato é reduzido a malato pela NAD-malato desidrogenase do citosol. Esse malato sofre descarboxilação oxidativa a piruvato e CO₂, através da ação da enzima málica, o que gera NADPH. As duas primeiras enzimas do ciclo da pentose fosfato, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a 6-fosfogliconato-desidrogenase, também são fontes de NADPH para a síntese de ácidos graxos. (Goodridge, 1987). A própria glicose, por ser convertida a acetil-CoA através da via glicolítica, estimula a lipogênese pelo fato de ser um importante substrato para o processo.

Ahmed & Byrne (2007) sugerem que SREBP-1c desempenha importante função no metabolismo de triglicérides e glicose hepáticos e sua atividade pode ser fator chave envolvido na acumulação de lipídeos em esteatose hepática. SREBPs são também importantes fatores de transcrição que regulam a homeostase do colesterol no hepatócito. A superexpressão de SREBP-1c no fígado de camundongos transgênicos leva a um aumento marcante da lipogênese *de novo* e desenvolvimento de fígado gorduroso (Shimomura et al., 1999).

SREBP-1c pertence a uma família de fatores de transcrição originalmente envolvidos na regulação de genes pela disponibilidade celular de colesterol (Wang et al 1994). Três membros da família SREBPs têm sido descritos em mamíferos, SREBP-1a, -1c e -2. SREBP-1a e -1c são codificados por um único gene, através do uso de sítios iniciadores alternativos de transcrição e diferem pelo seu primeiro exon durante a tradução nos ribossomos (Hua et al., 1995). Outra grande diferença entre as isoformas -1a e -1c é a sua distribuição tecidual. SREBP-1c está expressa na maioria dos tecidos de

camundongos e humanos especialmente no fígado, tecido adiposo branco, glândula adrenal e cérebro (Shimomura et al., 1997). SREBP-1c apresenta níveis consideráveis em músculos, de ratos e humanos (Ducluzeau et al., 2001; Guillet-Deniau et al., 2002). Em contrapartida, SREBP-1a está expressa principalmente em linhagens celulares e em alguns tecidos, tais como baço e intestino (Shimomura et al., 1997). O terceiro membro da família, SREBP-2 é derivado de um diferente gene e apresenta 50% de homologia com a seqüência de aminoácidos de SREBP-1. As três isoformas têm uma estrutura comum: (i) um fragmento amino-terminal de 480 aminoácidos os quais são de fato um fator de transcrição, (ii) uma região de 80 aminoácidos contendo dois domínios transmembrana separados por 31 aminoácidos os quais se encontram no lúmen do retículo endoplasmático e um regulador C-terminal do domínio 590 aminoácidos (Shimomura et al., 1997).

A superexpressão de SREBP-1c em fígado de camundongos transgênicos produz fígado gorduroso, enquanto que a superexpressão SREBP-2 em camundongos transgênicos resultam em um aumento de 28 vezes da síntese de colesterol (Matsuda et al., 2001). Isso demonstra que essas moléculas são fatores de transcrição cruciais para a lipogênese hepática e a síntese de colesterol, respectivamente (Horton et al., 2002). Foi observado que SREBPs ativam a expressão de mais de 30 genes que regulam a síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicérides e fosfolipídios, bem como o cofator NADPH necessário a síntese destas moléculas (Horton et al., 1998 e Shimomura et al., 2000).

SREBP-1c tem sido implicada no desenvolvimento humano da fisiopatologia das síndromes metabólica tais como obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemia, aterosclerose, e lipodistrofia. Em tecido adiposo de obesos e diabéticos tipo 2, a expressão do RNA mensageiro de SREBP-1c foi diminuída em comparação a indivíduos magros (Ducluzeau et al., 2001; Kolehmainen et al., 2001; Diraison et al., 2002; Oberkofler et al., 2002; Sewter et al., 2002; Yang et al., 2004).

A insulina e o SREBP-1c estimulam genes lipogênicos chave, incluindo aqueles que codificam ACC e a FAS (Shimomura et al., 2000). Em tais condições ambas reduzem a oxidação de ácidos graxos e aumentam a síntese de ácidos graxos contribuindo para a acumulação de gordura no fígado em indivíduos insulino-resistentes. Neste sentido o aumento na atividade da ACC leva à acumulação do conteúdo de malonil-CoA. Este substrato por sua vez inibe alostericamente (quando a

atividade da enzima se modifica através de uma ligação não-covalente com uma molécula em local diferente do sítio ativo) a atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT-1), o que resulta em oxidação mitocondrial diminuída (Nicot et al., 2004; Kerner et al., 2004). CPT-1 regula a transferência de acil-CoAs de cadeia longa do citosol para mitocôndria, onde eles são oxidados. Malonil-CoA, é, portanto, o regulador crucial tanto para a síntese (Wakil et al., 1983) quanto oxidação (McGarry & Brown., 1997).

A FAS é responsável pela síntese de ácidos graxos *de novo*, sendo uma das principais enzimas lipogênicas também estimuladas pelo fator de transcrição SREBP-1c (Hillgartner et al., 1995; Wakil., 1989). FAS catalisa todos os passos da reação na conversão de acetil-CoA e malonil-CoA para palmitato. A atividade de FAS não é conhecida por ser regulada por efetores alostéricos ou modificação covalente (Volpe & Vagelos 1974).

Outra importante enzima que SREBP-1c atua como fator de transcrição é a SCD-1 (Sampath et al., 2007). Esta é uma enzima chave envolvida na síntese de ácidos graxos monoinsaturados e catalisa a inserção de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 na cadeia de ácidos graxos longos saturados. A SCD-1 possui especificidade para os substratos palmitoil e esteril-CoA, convertendo-os em palmitato e oleil-CoA, respectivamente. (Ntambi & Miyazaki 2004).

O mecanismo detalhado pelo qual a deficiência de SCD-1 afeta peso corporal e a obesidade não é totalmente compreendido. Camundongos nocaute SCD-1 tiveram aumento da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), os quais podem ser responsáveis pela regulação de alguns dos importantes genes no metabolismo lipídico (Dobrzyn et al., 2004). Dessa forma parece que AMPK tem importante papel na lipogênese hepática por estar envolvida na lipólise sendo importante neste processo (Ouadda et al., 2008

Após o maior reconhecimento da esteatose hepática e distúrbios associados como problema de saúde pública, tem crescido rapidamente o interesse de pesquisadores e clínicos envolvidos no estudo e tratamento dessa doença. Porém, a prevalência desse distúrbio tem superado em muito o avanço científico na área. Neste sentido, pesquisas que tem como objetivo investigar mecanismos alvos para novas intervenções terapêuticas é de grande importância no que concerne à esteatose hepática. Em razão do significativo papel do metabolismo hepático sobre o metabolismo corporal total acredita-se que a completa caracterização da integração entre eventos bioquímicos e moleculares induzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica e metabolismo hepático

permita que se obtenham avanços na caracterização dos mecanismos fisiopatológicos da esteatose hepática (Saloranta et al., 1993; Rebrin et al., 1995; Lam et al., 2003 e Samuel et al., 2004). Dessa forma, o presente projeto visa estudar se a inibição *in vivo* da proteína SREBP-1c reverte a esteatose em fígado de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os resultados que serão obtidos a partir deste estudo direcionam para um potencial alvo terapêutico na reversão da esteatose hepática não alcoólica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da inibição da expressão de SREBP-1c sobre a esteatose hepática em camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da inibição da expressão de SREBP-1c sobre os parâmetros lipídicos no tratamento da esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a expressão da SREBP-1c;
- Avaliar os efeitos da inibição da SREBP-1c sobre a expressão e a atividade das enzimas lipogênicas tais como ACC-1, FAS, SCD-1 bem como de enzimas lipolíticas tais como AMPK e CPT-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais: Serão utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss, com 4 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESC. Após o recebimento, os camundongos serão divididos em dois grupos, a saber: Controle (camundongos Swiss que serão alimentados com ração comercial para roedores da Nuvital, a qual será oferecida *ad libitum*) e SWHL (camundongos Swiss que serão alimentados com dieta hiperlipídica, a qual será oferecida *ad libitum*). Estudo prévio de De Souza e colaboradores (2005) utilizando a mesma linhagem de camundongos comprovou a eficiência desta dieta em induzir esteatose hepática após 2 meses de alimentação. Os animais serão mantidos em ciclo de luz controlado de 12hs. Todos os experimentos animais serão realizados em conformidade com as recomendações do comitê de ética da UNESC.

3.2. Oligonucleotídeos (sense e antisense): O oligonucleotídeo portando modificação fosforotioato da SREBP-1c (sense, 5' CGG TGA GGC GGC TCT GGA AC 3' e antisense, 5' GTT CCA GAG CCG CCT CAC CG 3') serão produzidos pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Através de imunoblot será avaliado a habilidade do oligonucleotídeo antisense em bloquear a expressão da proteína SREBP-1c no fígado. A sequência selecionada será analisada pelo programa BLAST – NCBI. Para este estudo o oligonucleotídeo será utilizado por 16 dias, com aplicação intraperitoneal (IP) diária, determinada em nmol de oligonucleotídeo diluído em veículo.

3.3. Avaliação da efetividade do composto (curva dose-resposta): Após recebimento do oligonucleotídeo sense e antisense específico; será realizada a determinação da dose a ser utilizada para avaliar a efetividade do composto. Para isso utilizaremos camundongos magros com 8 semanas de idade. Os animais receberão diferentes doses do composto (0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL), via IP e após três dias de aplicação serão sacrificados e diferentes tecidos analisados para verificação da inibição tecido-específica (tecido hepático, muscular e adiposo) (De Souza et al., 2005). Esse composto tem grande estabilidade e assim uma única dose diária é suficiente para inibição (De Souza et al., 2005).

3.4. Protocolo experimental: Após dois meses de alimentação com dieta hiperlipídica (instalação da esteatose hepática), os animais serão subdivididos em quatro grupos: camundongos Swiss alimentados com dieta padrão (Magros); camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica (Controle/SWHL); camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica que serão submetidos ao tratamento com oligonucleotídeo sense (S/SWHL); camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica que serão submetidos ao tratamento com oligonucleotídeo antisense SREBP1c (ASO/SWHL).

3.5. Determinação da massa corporal: A massa corporal será determinada através de balança de precisão, imediatamente antes do sacrifício.

3.6. Extração do tecido hepático: Os camundongos serão anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano serão usados como controle da anestesia. Amostras do fígado serão retiradas, homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado será então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante será determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (41) e posteriormente será realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoblot com anticorpo específico.

3.7. Gravimetria para determinação dos lipídeos totais: Os fragmentos de tecido hepático (0,2g) serão macerados em tubos de ensaio de 7,5 ml e a estes adicionados uma solução de metanol/clorofórmio na proporção 1:2, ambos da Merck. Os tubos serão deixados em repouso à temperatura ambiente por uma noite, tempo suficiente para a decantação dos resíduos do tecido delipidado. No dia seguinte, o extrato será filtrado em filtro de papel 50 e transferidos para frascos pré-pesados e secos. Após a total evaporação da solução de extração, os frascos serão novamente pesados e a diferença ao peso anterior considerada a gordura extraída gravimetricamente.

3.6. Histologia com coloração Hematoxilina - Eosina: Fragmentos do tecido hepático serão coletados e colocados em frasco contendo paraformaldeído à 4% por 12 horas. O órgão será então processado com álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100 %), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o tecido será incluído em blocos de parafina, onde será seccionado em cortes de 5 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas serão desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool. Em seguida será realizada a coloração com hematoxilina e eosina. A análise será realizada através de microscopia óptica (Olympos BX 60).

3.7. Westernblotting: Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra serão aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. A eletroforese será realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE será submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, serão transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 1,5 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas serão incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas serão lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpo anti UCP-2, sob agitação constante durante uma noite a 4°C. Serão então lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas a seguir em solução com proteína A, marcada com ¹²⁵I, durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A será lavado com solução basal e então, as membranas expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 5 dias, os filmes serão

revelados na forma convencional. A intensidade das bandas será determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

3.10. Análise estatística: Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação de dois grupos, será utilizado teste *t* de Student para dados não pareados, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para comparação de mais que 2 grupos de valores, será utilizado análise de variância (ANOVA), seguida de teste para comparação múltipla de médias, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

4. CRONOGRAMA

Tabela 1: Atividades realizadas no ano de 2012.

ATIVIDADES	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x	
Indução da obesidade (dieta hiperlipídica)	x	x			
Tratamento com oligonucleotídeo sense em ratos obesos		x			
Determinação da massa corporal			x		
Extração do tecido hepático			x		
Determinação do triglicérideo sérico			x		
Gravimetria para determinação dos lipídeos totais			x		
Histologia			x		
Análise das amostras (Westernblotting)				x	
Análise estatísticas				x	
Interpretação dos resultados				x	
Elaboração do TCC				x	x
Apresentação do TCC					x

5. ORÇAMENTO

Tabela 2: Gastos na execução do projeto.

Discriminação	Quantidade	Valor Unitário R\$	Valor Total R\$
Anticorpos (SREBP-1, PPAR- γ , ACC, AMPK, FAS, SCD1, CPT)	7	1.200,00	8.400,00
Albumina (100g)	1 frasco	700,00	700,00
Membrana de nitrocelulose	1 rolo	1.200,00	1.200,00
Histologia		500,00	500,00
Compra da dieta hiperlipídica (nutri experimental – Campinas – SP)	50	60	3.000,00
TOTAL			13.800,00

6. FONTE FINANCIADORA

As despesas ocasionadas pela elaboração e execução desse projeto serão financiadas pelo Laboratório LAFIBE (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício) e pela FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina).

7. REFERÊNCIAS

AHMED MH; BYRNE CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Drug Discovery Today**. 12:740–747. 2007.

BELLENTANI S; SACCOCCIO G; MASUTTI F; GROCÈ LS; BRANDI G; SASSO F; CRISTANINI G; TIRIBELLI C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in northern Italy. **Annals of Internal Medicine** 132: 112-117. 2000.

CLARK JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 40, Suppl. 1, S5–S10. 2006.

DAY CP; JAMES OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**. 114: 842-845. 1998.

DE SOUZA CT; ARAÚJO EP; PRADA PO; SAAD MJ; BOSCHERO AC; VELLOSO LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. **Diabetologia**. 48:1860-1871.b.2005.

DIRAISON F; DUSSERE E; VIDAL H; SOTHIER M; BEYLOT M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. 282: E46–E51. 2002.

DOBRZYN P; DOBRZYN A; MIYAZAKI M; COHEN P; ASILMAZ E; HARDIE DG; FRIEDMAN JM; NTAMBI JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101: 6409–6414. 2004.

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**. 115:1343–1351. 2005.

DUCLUZEAU PH; PERRETTI N; LAVILLE M; ANDREELLI F; VEGA N; RIOU JP; VIDAL H. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. **Diabetes**. 50: 1134–1142. 2001.

GIRARD J; FOUFELLE F; FERRÉ P. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. **Annual Review of Nutrition**. 17: 325. 1997.

GOODRIDGE AG. Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. **Annual Review of Nutrition**. 7: 157-185. 1987.

GUILLET-DENIAU I; MIEULET V; LE LAY S; ACHOURI Y; CARRE D; GIRARD J; FOUFELLE F; FERRÉ P. Sterol regulatory element binding protein-1c expression

and action in rat muscles: insulin- like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. **Diabetes**. 51: 1722–1728. 2002.

HILLGARTNER FB; SALATI LM; GOODRIDGE AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. **Physiological Reviews**. 75: 47-76. 1995.

HORTON JD; BASHMAKOV Y; SHIMOMURA I; SHIMANO H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95: 5987-5992. 1998.

HORTON JD; GOLDSTEIN JL; BROWN MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**. 109: 1125-1131. 2002.

HUA X; WU J; GOLDSTEIN JL; BROWN MS; HOBBS HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. **Genomics**. 25: 667–673. 1995.

JANSEN PLM. Nonalcoholic steatohepatitis. **The Netherlands Journal of Medicine**. 62: 217-224. 2004.

KERNER J; DISTLER AM; MINKLER P; PARLAND W; PETERMAN SM; HOPPEL CL. Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. **The Journal of Biology Chemistry**. 39: 41104-41113. 2004.

KOLEHMAINEN M; VIDAL H; ALHAVA E; UUSITUPA MI. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. **Obesity Research**. 11: 706-712. 2001.

LAM TK; VAN DE WERVE G; GIACCA A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. 284: E281–329. 2003.

MARCHESINI G; BABINI M. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Minerva Cardioangiologica**. 54: 229 –239. 2006.

MATSUDA M; KORN BS; HAMMER RE; MOON YA; KOMURO R; HORTON JD; GOLDSTEIN JL; BROWN MS; SHIMOMURA I. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. **Genes Development**. 10:1206-1216. 2001.

MCGARRY JD; BROWN NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **European Journal of Biochemistry/FEBS**. 244: 1–14. 1997.

MOKDAD AH; FORD ES; BOWMAN BA; DIETZ WH; VINICOR F; BALES VS; MARKS JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. **The Journal of the American Medical Association**. 1:76-79. 2001.

NICOT C; NAPAL L; RELAT J; GONZALEZ S; LLEBARIA A; WOLDEGIORGS G. MARRERO PF, HARO D. C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system. **Biochemical Biophysical Research Communications**. 3: 660-664. 2004.

NTAMBI JM; MIYAZAKI M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research** 2: 91-104. 2004.

OBERKOFER H; FUKUSHIMA N; ESTERBAUER H; KREMLER F; PATSCH W. Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1575: 75-81. 2002.

OUADDA ABD; LEVY E; ZIV E; LALONDE G; SANÉ AT; DELVIN E; ELCHEBLY M. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and type 2 diabetes is associated to AMPK signaling pathway upregulation in Psammomys obesus. **Bioscience Reports**. 2008.

REBRIN K; STEIL GM; GETTY L; BERGMAN RN. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. **Diabetes**. 44:1038-1045. 1995.

SALORANTA C; KOIVISTO V; WIDEN E; FALHOLT K; DEFRONZO RA; HARKONEN M; GROOP L. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. **The American Journal of Physiology**. 264: E599-605. 1993.

SAMUEL VT; LIU ZX; QU X; ELDER BD; BILZ S; BEFROY D; ROMANELLI AJ; SHULMAN GI. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **The Journal of Biology Chemistry**. 31: 32345-32353. 2004.

SAMPATH H; MIYAZAKI M; DOBRZYN A; NTAMBI JM. Stearoyl-CoA Desaturase-1 Mediates the Pro-lipogenic Effects of Dietary Saturated Fat. **The Journal of Biology Chemistry**. 4: 2483-2493. 2007.

SEWTER C; BERGER D; CONSIDINE RV; MEDINA G; ROCHFORD J; CIARALDI T; HENRY R; DOHM L; FLIER JS; O'RAHILLY S; VIDAL-PUIG AJ. Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. **Diabetes**. 51: 1035-1041. 2002.

SHIMOMURA I; BASHMAKOV Y; HORTON JD. Increased levels of nuclear srebp-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **The Journal of Biology Chemistry**. 274: 30028-30032. 1999.

SHIMOMURA I; MATSUDA M; HAMMER RE; BASHMAKOV Y; BROWN MS; GOLDSTEIN JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular Cell**. 6: 77-86. 2000.

SHIMOMURA I; SHIMANO H; HORTON JD; GOLDSTEIN JL; BROWN M. Differential expression of exons1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. **The Journal of Clinical Investigation**. 99: 838–845. 1997.

VOLPE JJ; VAGELOS PR. Regulation of mammalian fatty-acid synthetase. The roles carbohydrate and insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 3:889-93. 1974.

WAKIL SJ; STOOPS JK; JOSHI VC. Fatty acid synthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**. 52: 537–579. 1989.

WANG X; SATO R; BROWN MS; HUA X; GOLDSTEIN JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. **Cell**. 77: 53–62. 1994.

YANG X; JANSSON PA; NAGAEV I; JACK MM; CARVALHO E; SUNNERHAGEN KS; CAM MC; CUSHMAN SW; SMITH U. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 317:1045–1051. 2004.