



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

CHRISTIAN ANDRÉ FERNANDES NEVES

***O metilglioxal altera o perfil lipídico no fígado de ratos obesos,
induzindo insulino-resistência e contribuindo para a doença de
fígado gordo não alcoólico***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DOUTOR PAULO NUNO CENTEIO MATAFOME

PROFESSORA DOUTORA RAQUEL MARIA FINO SEIÇA

MARÇO/2017

Dedico este trabalho à minha Tia São,

que esteja onde estiver,

estará sempre a olhar por mim...

O METILGLIOXAL ALTERA O PERFIL LIPÍDICO NO FÍGADO DE RATOS OBESOS, INDUZINDO INSULINO-RESISTÊNCIA E CONTRIBUINDO PARA A DOENÇA DE FÍGADO GORDO NÃO ALCOÓLICO

Neves C¹, Rodrigues T¹, Sereno J², Simões C³, Castelhana J², Gonçalves J¹, Bento G¹, Gonçalves S², Domingues R³, Castelo-Branco M^{2,4}, Seiça R¹, Matafome P^{1,5}.

- 1- Laboratório de Fisiologia, Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.
- 2- Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), Universidade de Coimbra.
- 3- Centro de Espectrometria de Massa, QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal.
- 4- Laboratório de Neurociências da Visão, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra.
- 5- Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra (ESTeSC), Departamento de Ciências Complementares, Coimbra, Portugal.

Christian André Fernandes Neves

Faculdade de Medicina, Pólo III da Universidade de Coimbra, Subunidade 1, 1^o piso, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 Coimbra.

Telefone : +351239480014 ; Fax: +351239480034

Email: christianneves92@hotmail.com

Conflito de interesses: Nada a declarar

Resumo

A Doença de Fígado Gordo Não Alcoólico (NAFLD) está associada à síndrome metabólica, com alterações no conteúdo lipídico hepático e insulino-resistência. Neste trabalho estudou-se a hipótese de que os produtos glicosados da dieta intervêm no metabolismo dos lípidos no fígado em ratos obesos contribuindo para o desenvolvimento da NAFLD. Usaram-se ratos Wistar com 1 ano de idade, mantidos nos últimos 4 meses com metilglioxal (100mg/Kg/dia) (grupo MG), com dieta gorda rica em TG (grupo HFD) ou com ambas (grupo HFDMG) e comparados com os controles com dieta normal (n=6/grupo). Foram submetidos a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (*in vivo*), espectrometria de massa e cromatografia gasosa para determinar as classes lipídicas e composição de fosfolípidos e ácidos gordos (AG), respetivamente, no fígado. Foram também analisadas as vias de síntese e oxidação de lípidos e da insulina, bem como indicadores de inflamação hepática. O grupo HFD apresentou um aumento da fração lipídica no fígado, sem alterar a saturação ou esterificação dos AG, tendo uma supressão da lipogénese, níveis plasmáticos de ácidos gordos livres, glicémia e insulino-resistência. O grupo HFDMG teve um aumento similar na fração lipídica, mas com aumento de inflamação portal, saturação de AG e diminuição dos antioxidantes lipídicos e da esterificação, além de uma menor supressão da lipogénese. Estes ratos tinham ainda aumento de AG livres no plasma, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e alterações na ativação da via da insulina no fígado. Os nossos resultados sugerem que o consumo de glicotoxinas como o metilglioxal provoca dismetabolismo hepático na obesidade, contribuindo para lipotoxicidade e insulino-resistência na NAFLD.

Palavras-chave

Doença de Fígado Gordo Não Alcoólico, Lipotoxicidade, Obesidade, Insulino-resistência, Diabetes Mellitus Tipo 2, Metilglioxal, Glicação.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with the metabolic syndrome, with impaired liver lipid metabolism and insulin resistance. We hypothesized that dietary glycated products may have a role in impairing hepatic lipid metabolism of diet-induced obese rats contributing to NAFLD development. 1 year old Wistar rats were maintained during the last 4 months with methylglyoxal (MG) supplementation (100mg/Kg/day) (MG group), a high-fat diet rich in TG (HFD group) or both (HFDMG group) and compared with controls feeding a standard diet (n=6/group). They were submitted to 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (*in vivo*), HPLC/MS and GC in order to assess lipid classes, phospholipids and fatty acyl chains composition in the liver. The activation of lipid synthesis and oxidation and insulin pathways and hepatic inflammation indicators were also evaluated. HFD group had an increase of lipid fraction in the liver, but no changes were observed in fatty acid esterification and saturation. These rats had suppression of lipogenesis, normal plasma free fatty acids, glycaemia and insulin sensitivity. HFDMG group had a similar increased of lipid mass fraction, but increased portal inflammation and fatty acid saturation and decreased esterification and lipid antioxidant levels. This was consistent with lower suppression of lipogenesis pathways, increased plasma free fatty acid levels, hyperinsulinemia, glucose intolerance and activation of the insulin receptor pathway in the liver. Our data suggest that consumption of methylglyoxal impairs liver lipid metabolism in obesity, contributing to hepatic lipotoxicity and insulin resistance in NAFLD.

Keywords

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Lipotoxicity, Obesity, Insulin resistance, Type 2 Diabetes Mellitus, Methylglyoxal, Glycation.

Índice

Resumo.....	III
Abstract	IV
Lista de tabelas.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Abreviaturas	VIII
Introdução	1
Objetivos	6
Material e Métodos.....	7
Resultados	11
Discussão	21
Conclusão	25
Financiamento.....	26
Agradecimentos	27
Referências bibliográficas.....	31

Lista de tabelas

Tabela 1: Alimentação, peso corporal, peso fígad e testes de função hepática.	11
Tabela 2: Espécies de ácidos gordos presentes nas dietas administradas e respetiva quantidade por grama de dieta (mg/g), por cromatografia gasosa.	12
Tabela 3: Glicémia em jejum e hemoglobina glicada	19

Lista de figuras

Figura 1: Adaptado de Gaggini M., *et al.* (21) Interação de insulino-resistência e lipotoxicidade. 4

Figura 2: Níveis hepáticos de marcador de membrana macrofágico (A), de produto avançado de glicação e glioxalase (B), por Western Blot. Macroscopia de fígado representativa de cada grupo e análise histológica com hematoxilina e eosina (100X), evidenciando inflamação portal (setas). 13

Figura 3: Espectro de ressonância magnética completo com os valores médios por grupo (A). Fração de massa lipídica medida por RMN 1H (B). Percentagem de esterificação dos lípidos (C) e rácio ácido gordo/glicerol (D) medidos por RMN 1H e complementados com os ácidos gordos esterificados por cromatografia gasosa (E). Espécies de ácidos gordos quantificados por cromatografia gasosa (F), agrupados por classes: (G) saturados (SAT), insaturados (INSAT), monoinsaturados (MInsat) e polinsaturados (PInsat) e o rácio entre insaturados e saturados (H). A RMN 1H complementou os resultados relativamente a lípidos saturados, insaturados, mono e polinsaturados (I, J). 15

Figura 4: Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres (A) e séricos de adiponectina (B), medidos por kits específicos. Enzimas chave para a lipogénese no fígado: AceCS e FAS (C), AMPK total, ativada e rácio (D) e ACC total, ativada e rácio (E). A intensidade foi calculada por comparação ao controlo. À direita encontram-se os blots representativos. 17

Figura 5: Resultados de espectrometria de massa. Conteúdo total de fosfolípidos (A) e quantidades relativas de cada classe (B, C). Níveis totais de plasmalogenos de fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas (D) e de cardiolipinas com significância estatística. 18

Figura 6: Teste de tolerância à glicose (valores de área abaixo da curva) (A), níveis plasmáticos de insulina e índice de resistência à insulina (B). Níveis do recetor de insulina total, ativado e rácio (C) e GLUT2 (D) no fígado, analisados por western blot. A intensidade foi calculada por comparação ao controlo. À direita encontram-se os blots representativos. . 20

Abreviaturas

AG – Ácidos Gordos

AGE – Produtos Avançados de Glicação (em inglês: *Advanced Glycated End-products*)

AGL – Ácidos Gordos Livres

DMT2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2

FG – Fígado Gordo

FL – Fosfolípidos

NAFLD – Doença de Fígado Gordo Não-Alcoólico (em inglês: *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH – Esteatohepatite Não Alcoólica (em inglês: *Non-Alcoholic Steatohepatitis*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (em inglês: *Reactive Oxygen Species*)

TG – Triglicerídeos

Introdução

1. Função hepática e metabolismo lipídico

O fígado é um órgão metabolizador, destoxicador e produtor de diversos compostos, servindo como glândula exócrina e endócrina e sistema excretor. (1) O sistema reticuloendotelial, constituído por células de Kupffer, aparenta ter relação com o desenvolvimento de patologias metabólicas. (2) O hepatócito regula os níveis de glicémia consoante as necessidades energéticas, mediada pela insulina e glucagina, de modo a favorecer as fases hipoglicemiantes (glicogénese e glicólise) e hiperglicemiantes (glicogenólise e gliconeogénese) do organismo, quando necessário. (3)

Os lípidos são biomoléculas essenciais para armazenamento de energia na forma de ácidos gordos (AG) ou triglicéridos (TG), no tecido adiposo, e os lípidos ou lipoproteínas remanescentes são reciclados para oxidação ou síntese *de novo* nos hepatócitos e retransporte na circulação sanguínea (lipogénese). (4) A lipogénese é um processo de formação de AG a partir de acetil-CoA, também usado para β -oxidação ou síntese de fosfolípidos (FL) ou glicerolípidos. (5)

Os AG exógenos mais frequentes saturados e monoinsaturados são o ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1) e polinsaturados o ácido linoleico (18:2), essenciais para processos metabólicos. (6) No hepatócito, os AG saturados são desaturados e os monoinsaturados são usados para síntese de glicerolípidos e FL. (7) Os FL, componentes da membrana plasmática, são constituídos maioritariamente por fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas; as esfingomielinas, fosfatidilgliceróis, fosfatidilinositóis e lisofosfatidilcolinas são componentes *minor* na membrana com funções específicas como na sinalização da via da insulina e as cardiolipinas encontram-se principalmente na membrana

interna das mitocôndrias. (6) Os plasmalogéneos de fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas são fosfolípidos associados a funções antioxidantes na célula. (8)

2. Diabetes *Mellitus* Tipo 2 e Obesidade, Glicação e Lipotoxicidade

A Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DMT2) caracteriza-se por um estado crónico de hiperglicemia, insulino-resistência nos tecidos e hiperinsulinemia compensatória, que leva a complicações microvasculares pela acumulação progressiva de produtos avançados de glicação (AGE) e espécies reativas de oxigénio (ROS). (9,10) A obesidade é uma das grandes causas de morbidade e mortalidade, associado a alto risco de doença cardiovascular e síndrome metabólico. A prevalência de diabetes em obesos é quatro vezes maior que em doentes com índice de massa corporal normal. (11) Na glicólise e peroxidação lipídica produz-se metilglioxal (MG), um precursor dos AGE (12) que se encontra elevado no plasma de diabéticos (9,10) e está implicado nas complicações macro e microvasculares da doença. Além disso, dietas com alto teor glicémico têm impacto no organismo nos quais, embora os mecanismos fisiopatológicos ainda não estejam bem definidos, está envolvida a acumulação de MG. (12) A glioxalase-1 (GLO-1), uma enzima envolvida na destoxificação do MG, protege das ROS induzidas pela glucose através da destoxificação do MG, reduzindo o desenvolvimento das complicações diabéticas. No entanto, a normalização da glicemia em diabéticos não previne os níveis altos de MG no organismo, sugerindo a persistência dos seus níveis devido a erros metabólicos e à acumulação de AGE e ROS. (9,12)

O MG reage com lípidos e proteínas, tais como fatores de transcrição altamente suscetíveis e modificáveis, dando origem aos AGE e alterando a fisiologia celular, quer no hepatócito, quer noutras células. Os AGE ativam também recetores específicos e levam à diminuição da glioxalase. (9,12) Os níveis altos de MG também foram implicados em vários efeitos patológicos como insulino-resistência e complicações macro e microvasculares,

presente em diabéticos, obesos e hipertensos, podendo ser considerado um marcador de angiopatia e advir daí uma das principais consequências. (12-16)

Em situações de dieta hipercalórica e crônica, ocorre deposição de gordura no fígado, devido a se ter ultrapassado o limiar de armazenamento dos adipócitos, com entrada de ácidos gordos livres (AGL) no hepatócito para oxidação. No entanto, a cronicidade deste tipo de dieta provoca um aumento da resistência à insulina, com hiperinsulinemia, diminuição de adiponectina e progressivo aumento da lipólise nos adipócitos, o que agrava a acumulação de AG no hepatócito. A adiponectina é uma proteína associada a efeitos anti-inflamatórios, de sensibilidade à insulina e oxidação de lípidos e glicose no hepatócito. No entanto, encontra-se diminuída em doentes obesos e diabético. (11,17,18) Estas alterações metabólicas resultam num desequilíbrio entre entrada, síntese, exportação e oxidação de AG (1,19), designado de lipotoxicidade, que se define atualmente por um estado de hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, intolerância à glicose, produção hepática de glucose aumentada, hipoadiponectinemia e marcadores inflamatórios aumentados e que podem ocorrer anos antes do aparecimento da DMT2 (ver **Figura 1**). (20)

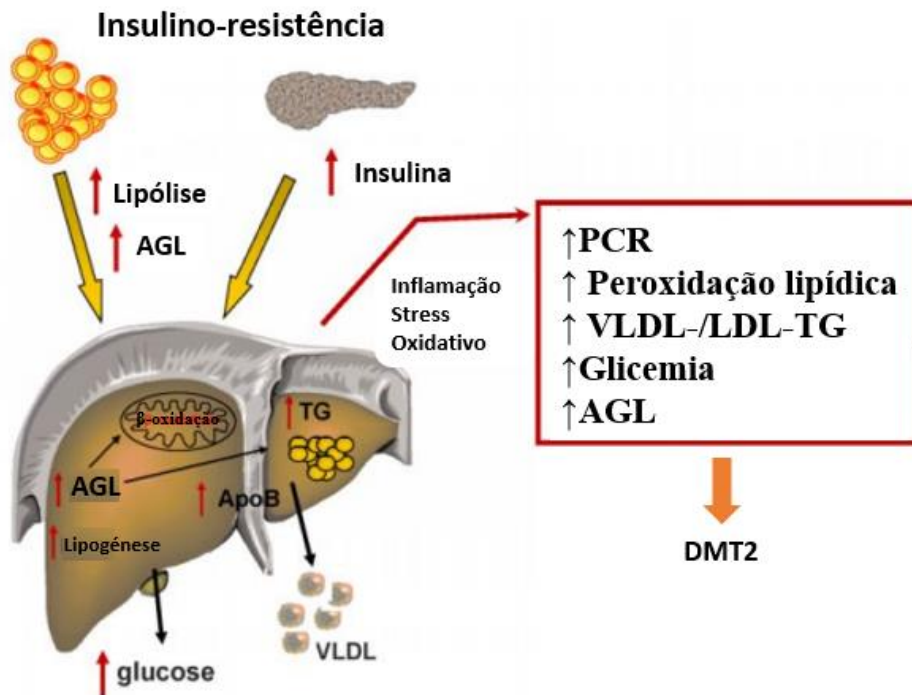


Figura 1: Adaptado de Gaggini M., et al. (21) Interação de insulino-resistência e lipotoxicidade. AGL: ácidos gordos livres, TG: triglicerídeos, ApoB: apolipoproteína B, VLDL: lipoproteína de muita baixa densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, PCR: proteína C-reativa

3. Doença do Fígado Gordo Não Alcoólico

A Doença de Fígado Gordo Não Alcoólico (NAFLD) caracteriza-se por aumento intrahepático de AGL e TG e integra-se num espectro patológico contínuo, iniciado por esteatose hepática, que ao tornar-se crónica, se desenvolve para fígado gordo (FG) e, com o envolvimento inflamatório, para esteatohepatite não alcólica (NASH) que por sua vez pode levar à cirrose e insuficiência hepática. Neste espectro incluem-se processos como inflamação, com maior produção de citocinas inflamatórias (18), bem como níveis reduzidos de fosfatidilcolinas, plasmalógenos e adiponectina. (22) Devido à hiperinsulinemia e insulino-resistência, verifica-se uma predisposição para *stress* oxidativo e produção de ROS, estimulando as peroxidases lipídicas microsossomais, que atuam nos AG polinsaturados, tornando-os derivados altamente reativos. A DMT2, o aumento de transaminases, TG,

citocinas inflamatórias, hiperinsulinemia e hipoadiponectinemia estão associadas à NASH, apesar de ser necessária uma biópsia para a diagnosticar. (16,18) O FG é a reflexão da tentativa de equilíbrio entre o efluxo de AG devido à lipólise nos adipócitos, oxidação de AG, lipogénese *de novo* e exportação no hepatócito, bem como o seu consumo na dieta. (21) Estes mecanismos resultam num excesso de AG saturados e de ácido linoleico (18:2) em e os TG acumulados induzem a formação de diacliglicerídeos, desenvolvendo inflamação nos hepatócitos; devido à sobrecarga lipídica, oxidação reativa, disfunção mitocondrial, aumento de ROS, AG não esterificados e peroxidação lipídica, este mecanismo torna-se um ciclo vicioso. Este processo aumenta também a infiltração macrofágica, de modo a combater a entrada excessiva de glucose e lípidos, no entanto a inflamação inibe a sinalização da insulina, estabelecendo a cronicidade da DMT2. (20)

Objetivos

Os doentes com Diabetes *Mellitus* tipo 2 caracterizam-se pela insulino-resistência e obesidade, aumentando o risco de desenvolvimento de esteatose hepática e o espectro da doença de fígado gordo não alcoólico. Portanto, utilizou-se um modelo animal, ratos Wistar, com administração de metilglioxal e dieta gorda para indução de glicação e obesidade, respetivamente.

Neste trabalho, os objetivos são compreender a intervenção da glicação induzida pelo metilglioxal na alteração do metabolismo dos lípidos na obesidade, bem como avaliar as implicações desses mecanismos nos parâmetros locais e sistémicos do metabolismo da glicose. De seguida, analisou-se o perfil lipídico hepático através de diversas técnicas de lipidómica e ressonância magnética. Mais, correlacionou-se estes resultados com a análise de proteínas associadas à sinalização hepática do metabolismo dos lípidos e glicose.

No final do projeto será possível compreender melhor como a glicação e a dieta gorda podem induzir ao dismetabolismo lipídico e da glicose no fígado, insulino-resistência e lipotoxicidade, envolvidas no desenvolvimento da doença do fígado gordo não alcoólico.

Material e Métodos

Reagentes e anticorpos: Os sais e solventes orgânicos usados na preparação das soluções foram comprados à Fisher scientific (Leicestershire, RU), Sigma Chemicals (Estados Unidos da América - EUA) e Merck Darmstad (Alemanha), com o maior grau de pureza disponível no mercado. Os anticorpos foram usados para marcar AMPK e (Thr172)AMPK (#2532, #2535, Cell Signaling, EUA), F4/80, GLUT2, ACC, (Ser79)ACC e (Tyr1163)IR β (ab74383, ab54460, ab72046, ab68191 e Ab60946, Abcam, RU) e IR β (sc-57342, Santa Cruz Biotechnology, EUA). Como controlo de carregamento utilizou-se Calnexin (AB0037, Sicgen, Portugal).

Manutenção animal: Os ratos Wistar da nossa colónia (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra) foram mantidos em condições padrão. (23,24) O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão Institucional sobre Cuidados e Usos de Animais local e todos os procedimentos foram realizados por utilizadores certificados pela Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Grupos experimentais: Os ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=6/grupo): 1) Controlo (Ct) com dieta padrão AO3 (5% triglicerídeos e 45% hidratos de carbono, SAFE, França); 2) Grupo Metilglioxal (MG) com dieta padrão e administração de MG; 3) Grupo com dieta gorda rica em triglicerídeos (High-Fat diet: HFD); 4) Grupo com dieta gorda rica em triglicerídeos com suplementação de MG (HFDMG).

Dieta e administração de MG: A dieta gorda (40% triglicerídeos e 10% carboidratos, 231 HF, SAFE, França) foi administrada durante 18 semanas (dos 8 aos 12 meses). De modo a aumentar os produtos glicados da dieta, o MG diário (75 mg.Kg⁻¹) foi administrado oralmente como descrito anteriormente. (24-26) Este protocolo aumenta a reação do MG com os componentes da alimentação e conseqüentemente formação de adutos de MG e AGE, que são depois absorvidos. Provámos anteriormente que leva a níveis de MG e AGE no plasma e nos

tecidos semelhantes a ratos diabéticos (24-26), sendo um protocolo mais fisiológico que a injeção subcutânea ou intraperitoneal, que resultam em doses sobrefisiológicas.

Peso corporal e perfil glicêmico: Registou-se o peso corporal e hemoglobina glicada (HbA1c) e glicémia (jejum, 1 e 2 horas após administração de glucose intraperitoneal, 1.8 g.Kg⁻¹) colhidas pela veia da cauda dos ratos em jejum durante a noite (18 horas).

Espetroscopia de Ressonância Magnética: A espectroscopia por ressonância magnética nuclear ¹H (RMN ¹H), de *magic-angle spinning* de alta resolução, no tecido hepático (técnica não invasiva), foi realizada usando o *scanner* BioSpec 9.4 T MRI (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemanha). Os ratos (n=6/grupo) foram mantidos anestesiados com isoflurano (2-3%), 100% de O₂, temperatura corporal (37°C) e monitorização respiratória (SA Instruments SA, Stony Brook, EUA). Os espectros com supressão de água do conteúdo lipídico do fígado foram analisados, com um procedimento automático de determinação de áreas de cada pico (LCModel). Implementou-se um *software* em Matlab (v2013a, Mathworks) para obter os sinais dos lípidos hepáticos corrigidos, devido ao relaxamento spin-spin (T₂). Este protocolo experimental foi descrito e otimizado pelo Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde, ICNAS, Universidade de Coimbra, Portugal. (27) A fração lipídica e saturação de AG foram determinadas como descrito anteriormente. (28,29) A percentagem de esterificação foi calculada pelo rácio entre os carbonos do glicerol (5.19 ppm) e AG esterificados (2.24 ppm). O rácio entre moléculas de glicerol e o número total de AG (1/3*0.9 ppm) foi também calculado, como um marcador de aumento provável da existência de AG não esterificados.

Colheita de sangue e fígado: Os ratos foram anestesiados e colheu-se soro e plasma, como descrito anteriormente. (23,24) Após o sacrifício por deslocamento cervical, colheram-se os fígados (-80°C e formol 10%).

Análises de sangue: Os níveis plasmáticos de AG livres e insulina foram determinados usando o FFA Assay Kit (ZenBio, NC, EUA) e Rat Insulin ELISA Kit (Merckodia, Suécia). Os

níveis de adiponectina sérica foram quantificados através do Rat Adiponectin Immunoassay Kit (Invitrogen, EUA). Os níveis plasmáticos do colesterol total, HDL, proteína total, albumina, transaminases e bilirrubina foram medidos por um analisador automático do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Portugal.

Western Blotting: O fígado (100mg) (n=6) foi homogeneizado e tratado como descrito anteriormente. (23,24) Os anticorpos secundários foram anti-mouse (GE Healthcare, Reino Unido), anti-rabbit e anti-goat (Bio-Rad, EUA). As membranas foram reveladas usando substrato de ECL no Versadoc system (Bio-Rad, EUA) e analisado com o Image Quant® (Molecular Dynamics, EUA).

Histologia: O tecido hepático seccionado (4 µm) e embebido em parafina (n=3/grupo) foi corado com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas no microscópio da Zeiss com câmara incorporada (Alemanha).

Cromatografia gasosa e HPLC/MS: O tecido hepático (n=6) foi homogeneizado em tampão fosfato (PBS), pH 7.4 e a extração dos lípidos foi realizada pelo método Folch (30), com solução de clorofórmio-metanol (2:1 v/v). A quantificação total de fosfolípidos (FL) foi realizada pelo método colorimétrico “*phosphorous assay*”, após digestão perclórica a 180°C, como descrito anteriormente. (31) Os FL foram detetados por espetrometria de massa após separação por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC; Waters Alliance 2690), usando uma coluna de silício Ascentis (15 cm x 1 mm, 3µm), como previamente descrito. (32) As amostras (20 µg de FL totais) foram separadas por HPLC, que está acoplado ao espetómetro de massa com ion trap linear (LXQ; Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA). O LXQ foi utilizado em positivo (voltagem de electrospray +5 kV) e negativo (voltagem de electrospray -4.7 kV) com temperatura capilar de 275°C e fluxo de gás de 8 U. A energia de colisão normalizada™ variou entre 20 and 27 unidades arbitrárias para realizar o MS/MS. A aquisição dos resultados foi feita com o programa Xcalibur data system (V2.0). A

quantificação relativa de cada espécie individual de FL foi determinada pelo rácio entre a área reconstruída do cromatograma iónico de um dado valor de m/z e a área reconstruída do cromatograma iónico da respetiva classe e a quantificação absoluta através de padrões internos. Os padrões internos de FL foram adquiridos na Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, EUA). As classes de FL foram identificadas no modo iónico negativo e os resultados foram feitos pela abundância relativa por classe: lisofosfatidilcolinas (LFC), fosfatidilcolinas (FC), esfingomielinas (EM), fosfatidiletanolaminas (FE), cardiolípinas (CL), fosfatidilserinas (FS), fosfatidilinositóis (FI) e fosfatidilglicerois (FG). A fragmentação por MS/MS realizou-se a cada pico iónico para identificar e confirmar a estrutura, de acordo com a fragmentação típica (33) e comparado através dos programas LIPID MAPS e LIPID Mass Spec. Prediction (v1.5, LIPID MAPS, 2009). O total de AG esterificados foi medido por cromatografia gasosa acoplado a um detetor de ionização a chama após transesterificação dos extratos lipídicos do fígado (aproximadamente 90 µg do total de FL). As amostras foram preparadas com uma solução metanólica de hidróxido de potássio (2M) de acordo com o método referenciado. (34) O éster metilado C17 (7.5 µg) foi usado como padrão interno. Injetou-se 2 µl de solução de hexano com os AG metilados no cromatógrafo. As dietas dos ratos também foram analisadas para identificação dos AG, utilizando 50 mg de cada dieta. Apenas 10 mg de cada dieta foi diluído em 100 µl (dieta *standard*) e 650 µl (dieta gorda) de solução de hexano e 3 µl de cada amostra foi injetado. O protocolo usado na injeção no cromatógrafo foi igual ao utilizado anteriormente. (35)

Análise estatística: Os resultados são apresentados pela sua média \pm erro de desvio médio (n=6 por grupo). Devido ao baixo número de amostras, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (com comparação múltipla) foi aplicado para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, através do *software* SPSS (IBM, NY, EUA). Valor $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Resultados

Peso Corporal, peso do fígado, testes de função hepática e dieta

Nos grupos com dieta gorda (HFD e HFDMG), apesar de terem comido a mesma quantidade de dieta, apenas se observou um aumento significativo de peso corporal no grupo HFD. Relativamente às análises bioquímicas do sangue, apenas se observou uma diminuição da albumina plasmática no grupo HFDMG, marcador inespecífico de disfunção hepática, e um aumento dos níveis de colesterol total e HDL no grupo HFD. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos outros parâmetros nem no grupo MG diferenças com o controlo (Ct) (ver Tabela 1).

Tabela 1: Alimentação, peso corporal, peso fígado e testes de função hepática. Ct – controlo Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG. Média \pm erro padrão. * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$; 3 símbolos $p < 0.001$.

Grupo	Ct	MG	HFD	HFDMG
Alimentação (g/rato/dia)	22,9 \pm 0,7	24,3 \pm 1,6	15,1 \pm 1,1 **##	14,4 \pm 0,7 **##
Peso corporal (g)	508,8 \pm 11,4	508,9 \pm 18,4	652,7 \pm 35,8 **##	571,6 \pm 27,3
Peso fígado (g)	13,9 \pm 0,6	12,4 \pm 0,6	13,4 \pm 0,7	13,9 \pm 0,7
Proteínas totais plasmáticas (mg/dl)	6,4 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	6,0 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1
Albumina plasmática (mg/dl)	2,81 \pm 0,1	2,85 \pm 0,1	2,62 \pm 0,1	2,47 \pm 0,1 **#
Triglicérideos (mg/dl)	75,4 \pm 5,5	69,3 \pm 10,7	77,8 \pm 5,4	62,3 \pm 3,2
Colesterol total (mg/dl)	75,1 \pm 4,6	74,3 \pm 2,7	99,2 \pm 9,4 *	91,7 \pm 8,8
Colesterol HDL (mg/dl)	44,5 \pm 2,7	45,8 \pm 1,4	58,2 \pm 4,7 *	55,7 \pm 5,1

Relativamente aos ácidos gordos da dieta, observa-se, na dieta gorda, uma concentração substancialmente maior de ácidos gordos saturados, do ácido oleico (18:1) e linoleico (18:2) comparativamente à dieta padrão (ver **Tabela 2**).

***Tabela 2:** Espécies de ácidos gordos presentes nas dietas administradas e respetiva quantidade por grama de dieta (mg/g), por cromatografia gasosa. Ct – controlo Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG.*

Ácido Gordo	Dieta Padrão	Dieta Gorda
14:0 Mirístico	-	0.312
16:1 Palmitoleico	-	0.702
16:0 Palmítico	0.251	7.058
18:2 Linoleico	0.511	4.224
18:1 Oleico	0.177	11.698
18:0 Esteárico	-	2.539
Total	0.940	26.533

Glicação, indicadores inflamatórios e macro e microscopia hepática

De modo a verificar a acumulação de produtos glicados no fígado, determinou-se os níveis de CEL, um produto avançado de glicação, formado diretamente do MG, sendo que estes estavam aumentados no grupo HFDMG. Não se observaram diferenças significativas nos níveis de glioxalase (GLO-1), a enzima destoxicadora de MG (ver **Figura 2A**).

Na análise macroscópica observa-se esteatose hepática (ver **Figura 2C**) nos grupos HFD e HFDMG, confirmada pela análise histológica, com esteatose microvesicular. No entanto, apenas nos grupos com administração de MG (MG e HFDMG) se observa infiltração inflamatória a nível portal (setas), especialmente no grupo HFDMG (ver **Figura 2D**).

Estes resultados foram consistentes com a observação de um aumento dos níveis do marcador de membrana macrofágico (células de Kupffer), F4/80, mais significativo no grupo HFDMG (ver **Figura 2B**).

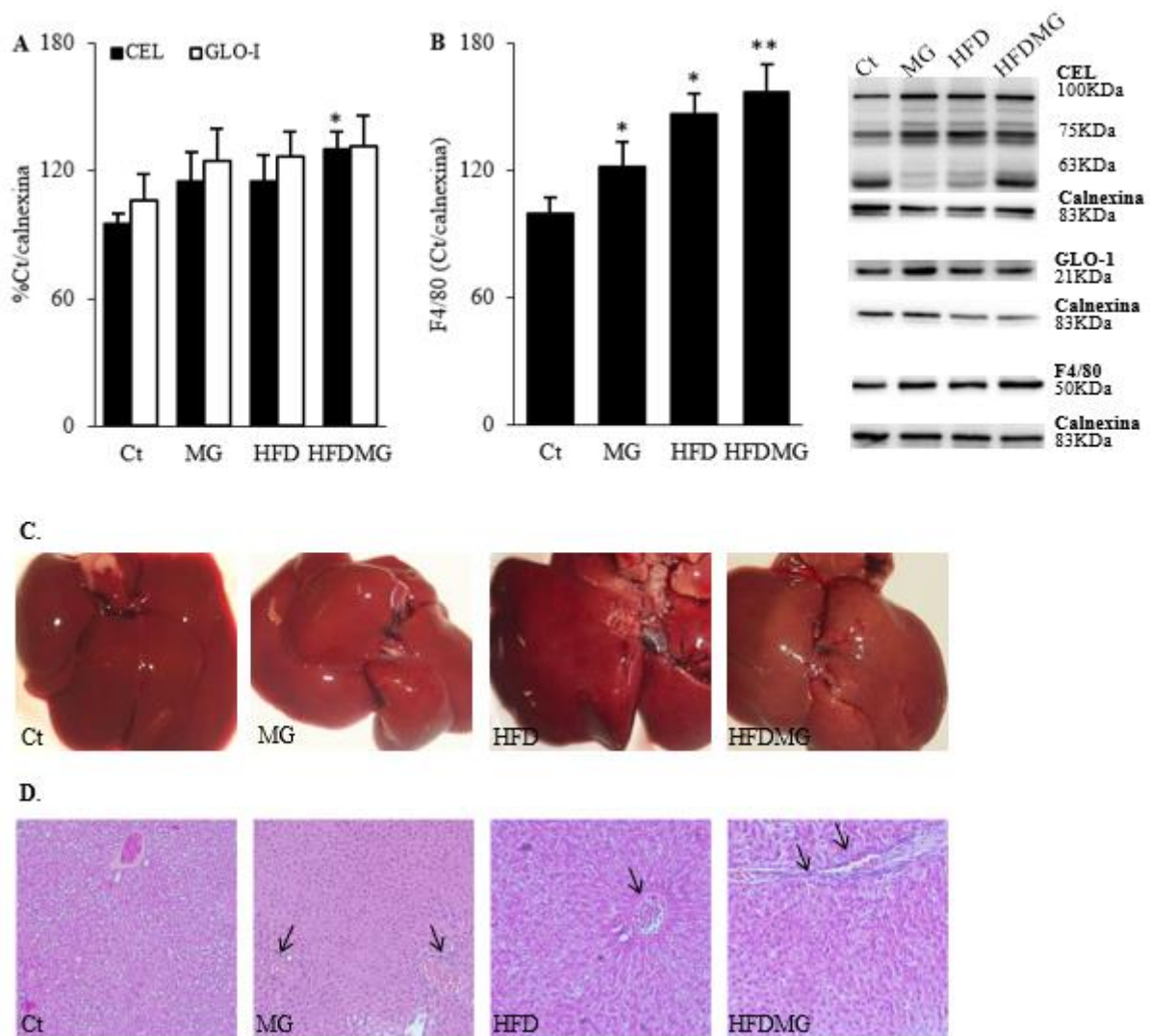


Figura 2: Níveis hepáticos de marcador de membrana macrófágico (A), de produto avançado de glicação e glioxalase (B), por Western Blot. Macroscopia de fígado representativa de cada grupo e análise histológica com hematoxilina e eosina (100X), evidenciando inflamação portal (setas). Ct – controle Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG. * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$.

Lípidos hepáticos: Espetroscopia de RMN ^1H e Cromatografia Gasosa

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a cromatografia gasosa, permitem fazer uma análise dos lípidos hepáticos. Estas técnicas complementam-se, visto a primeira ser *in vivo* e não invasiva e a segunda por ser *ex vivo*, além de que a espectroscopia deteta os lípidos, incluindo ácidos gordos não esterificados e exclui os fosfolípidos da membrana devido à diferença de relaxamento e spin e a cromatografia gasosa apenas os ácidos gordos

esterificados. Observou-se por espectroscopia semelhanças entre os espectros representativos de cada grupo (ver **Figura 3A**), excetuando em alguns picos, correspondentes ao aumento da fração lipídica, semelhante nos grupos HFD e HFDMG (ver **Figura 3B**). No entanto, apenas o grupo HFDMG teve uma diminuição da percentagem de esterificação do glicerol e aumento do rácio ácido gordo/glicerol (ver **Figura 3C,D**); o cálculo foi feito através da percentagem de carbonos do glicerol ocupados, pelo rácio do número de ácidos gordos esterificados e pelo número de carbonos do glicerol. A utilização da cromatografia gasosa permitiu detetar os ácidos gordos esterificados, que estavam significativamente aumentados no grupo HFD (ver **Figura 3E**) comparativamente ao grupo Ct e MG e que esse aumento não se verificou no grupo HFDMG, demonstrando que a glicação não altera o total de lípidos, mas diminui a esterificação de ácidos gordos. Com esta mesma técnica foi possível identificar e quantificar as espécies de ácidos gordos e as suas classes (saturados, insaturados, monoinsaturados ou polinsaturados). Assim, observou-se um aumento dos níveis de ácido gordo 18:1 no grupo HFD, de acordo com os seus níveis elevados na dieta gorda (ver **Tabela 2**). Este aumento do 18:1 não se observou no grupo HFDMG, ao contrário do aumento do 18:0. Verificou-se ainda uma diminuição dos ácidos gordos polinsaturados em ambos grupos com dieta gorda (HFD e HFDMG) (ver **Figura 3F**). No total, verificou-se um aumento dos ácidos gordos saturados e diminuição dos monoinsaturados no grupo HFDMG (ver **Figura 3G**), bem como uma diminuição do rácio de ácidos gordos insaturados/saturados (ver **Figura 3H**).

A espectroscopia também permite quantificar o número de ligações duplas na cadeia de ácidos gordos, demonstrando uma diminuição da fração de ácidos gordos insaturados no grupo HFDMG ($p < 0.08$) e polinsaturados em ambos grupos com dieta gorda (HFD e HFDMG) (ver **Figura 3I,J**). Estes resultados indicam que a glicação aumenta a saturação lipídica, particularmente pela diminuição dos ácidos gordos monoinsaturados.

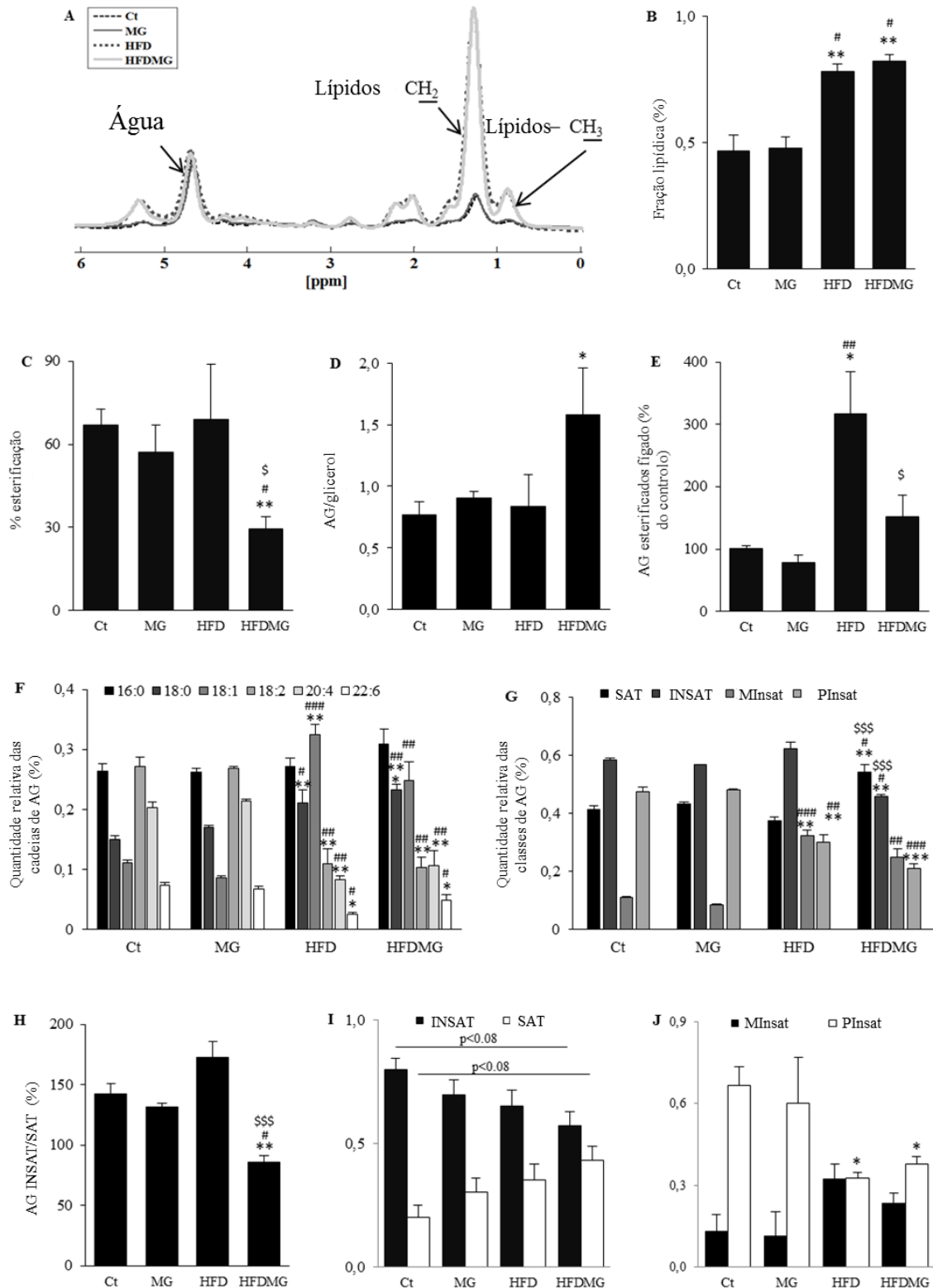


Figura 3: Espectro de ressonância magnética completo com os valores médios por grupo (A). Fração de massa lipídica medida por RMN 1H (B). Percentagem de esterificação dos lipídios (C) e rácio ácido gordo/glicerol (D) medidos por RMN 1H e complementados com os ácidos gordos esterificados por cromatografia gasosa (E). Espécies de ácidos gordos quantificados por cromatografia gasosa (F), agrupados por classes: (G) saturados (SAT), insaturados (INSAT), monoinsaturados (MInsat) e polinsaturados (PInsat) e o rácio entre insaturados e saturados (H). A RMN 1H complementou os resultados relativamente a lipídios saturados, insaturados, mono e polinsaturados (I, J). Ct – controlo Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG. Média ± erro padrão. * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$; 3 símbolos $p < 0.001$.

Ácidos gordos livres e via de síntese lipídica hepática

O grupo HFD tinha níveis normais de triglicerídeos (ver **Tabela 1**) e de ácidos gordos livres no plasma (ver **Figura 4A**), com aumento de adiponectinemia (ver **Figura 4B**). No fígado destes ratos verificou-se uma diminuição da ativação da AMPK (ver **Figura 4D**) e supressão da via de síntese de lípidos (ver **Figura 4C, F**). No grupo MG não se observaram diferenças, mas o grupo HFDMG teve um aumento dos ácidos gordos livres, níveis mais baixos de adiponectina comparado com o grupo HFD e menor supressão da via de síntese lipídica. Em particular, quando comparado com o grupo HFD, o grupo HFDMG revelou menor fosforilação (inativação) do ACC e aumento da expressão do AceCS e FAS (ver **Figura 4C, F**). Os níveis de AMPK fosforilada (ativada) foram ainda mais baixos no grupo HFDMG (ver **Figura 4D**). Estes resultados sugerem que a glicação afeta as vias de síntese e oxidação dos lípidos, possivelmente contribuindo com o aumento de ácidos gordos não esterificados no fígado e ácidos gordos livres.

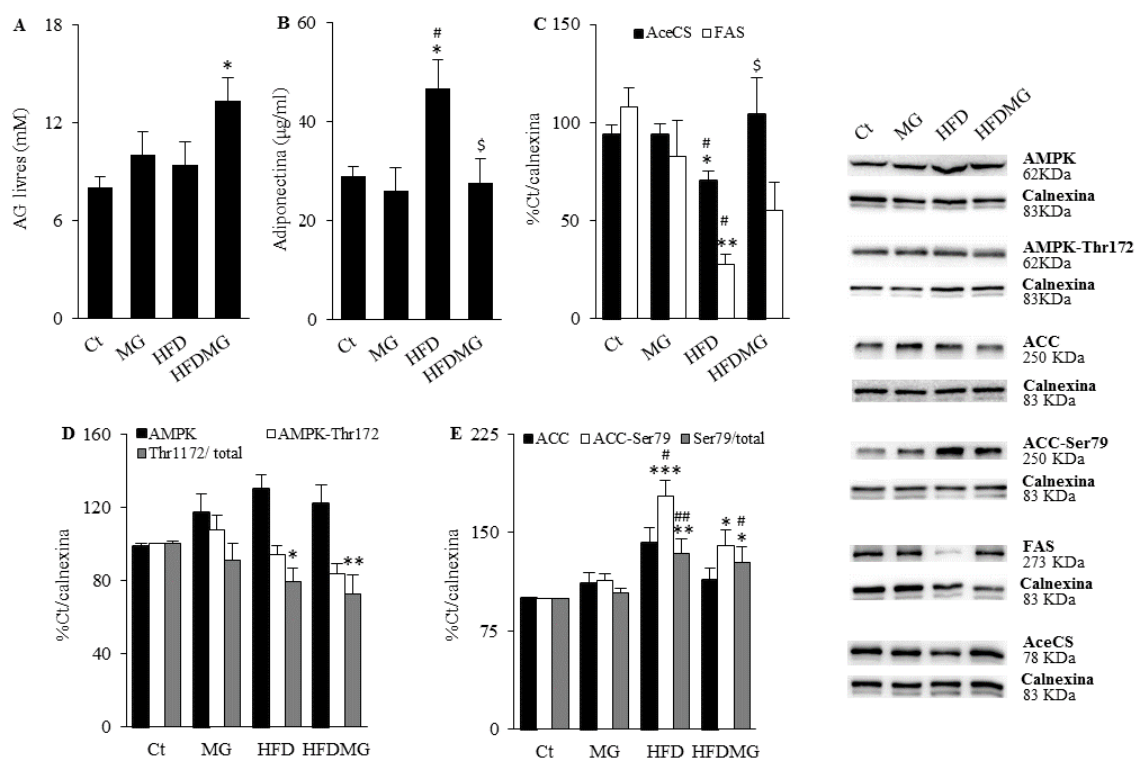
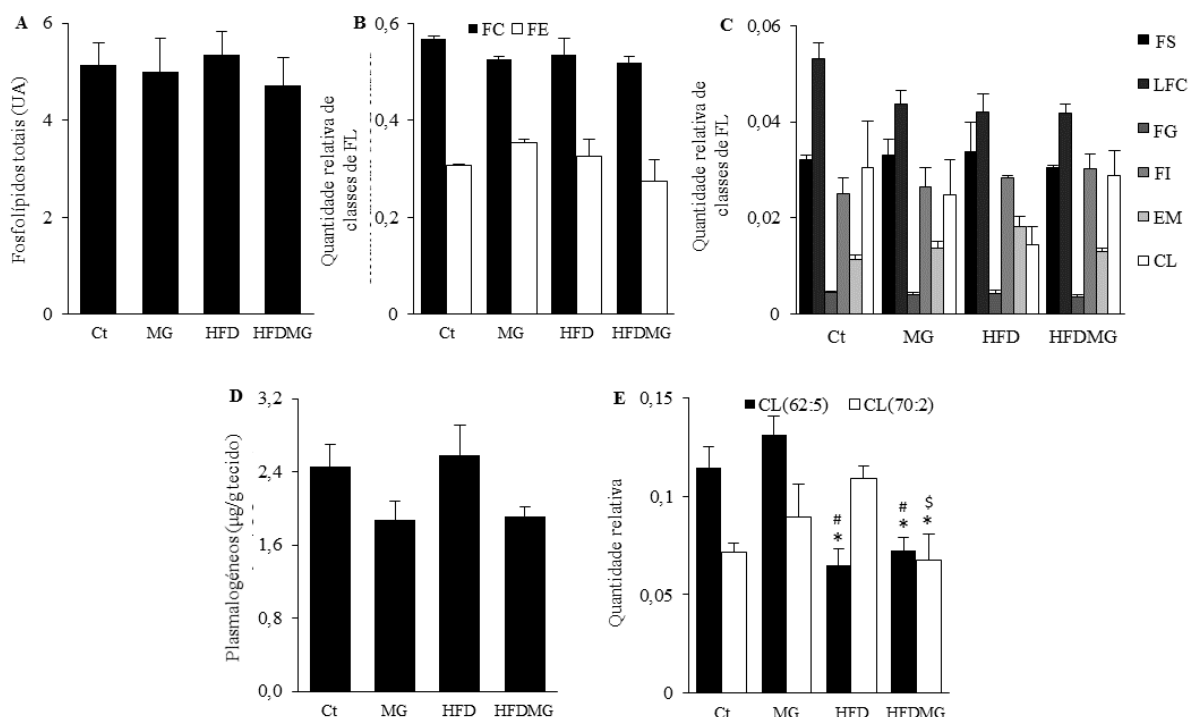


Figura 4: Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres (A) e séricos de adiponectina (B), medidos por kits específicos. Enzimas chave para a lipogênese no fígado: AceCS e FAS (C), AMPK total, ativada e rácio (D) e ACC total, ativada e rácio (E). A intensidade foi calculada por comparação ao controle. À direita encontram-se os blots representativos. Ct – controle Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG. Média ± erro padrão. * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$; 3 símbolos $p < 0.001$.

Fosfolípidos hepáticos: Espetrometria de massa

A quantidade total de fosfolípidos no fígado foi semelhante em todos os grupos (ver **Figura 5A**). Do mesmo modo, não se verificaram diferenças significativas entre o total de cada classe de fosfolípidos [fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS), lisofosfatidilcolina (LFC), fosfatidilglicerol (FG), fosfatidilinositol (FI), esfingomiéline (EM), cardiolípidina (CL)] (ver **Figura 5B, C**). Apesar de não se verificar significância estatística, observa-se uma tendência para redução dos níveis de plasmalógenos (fosfolípidos antioxidantes) nos grupos com administração de MG (MG e HFDMG) (ver **Figura 5D**). Quanto às cardiolípidinas, observou-se uma diminuição de duas espécies poliinsaturadas, CL62:5 e CL70:2, sendo que apenas a primeira estava diminuída no grupo HFD e ambas no

grupo HFDMG, sugerindo um aumento de dano oxidativo no grupo com dieta gorda e MG (ver **Figura 5E**).



Glicemia, Insulinemia e Sinalização da insulina no fígado

Os níveis de glicemia e da hemoglobina glicada não foram diferentes entre os grupos (ver **Tabela 3**). No entanto, o consumo de dieta rica em triglicerídeos (grupo HFD) resulta num aumento da intolerância à glicose (área abaixo da curva durante a prova de tolerância à glicose), mas sem alterações no índice HOMA nem na insulinemia (ver **Figura 6A, B**). No grupo MG não se observaram alterações comparativamente com o grupo controle (Ct). No entanto, o grupo HFDMG apresentou hiperinsulinemia, aumento do índice HOMA e maior intolerância à glicose comparado com o grupo HFD.

Tabela 3: Glicémia em jejum e hemoglobina glicada. Ct – controlo Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG.

Grupo	Ct	MG	HFD	HFDMG
Glicémia em jejum (mg/dl)	68,5±2,0	70,6±1,4	70,9±2,0	71,1±1,6
HbA1c (%)	3,2±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,5±0,1

No fígado, não se observaram alterações no grupo MG quanto à sinalização da insulina, mas no grupo HFD o rácio do recetor da insulina fosforilado/total foi menor (ver **Figura 6C**), associado a um aumento compensatório do GLUT2 (ver **Figura 6D**). No grupo HFDMG, o rácio do recetor da insulina fosforilado/total revelou-se mais diminuído e o aumento do GLUT2 foi inibido (ver **Figura 6C, D**), demonstrando que a sinalização da via da insulina está afetada e que contribui para a insulino-resistência e obesidade.

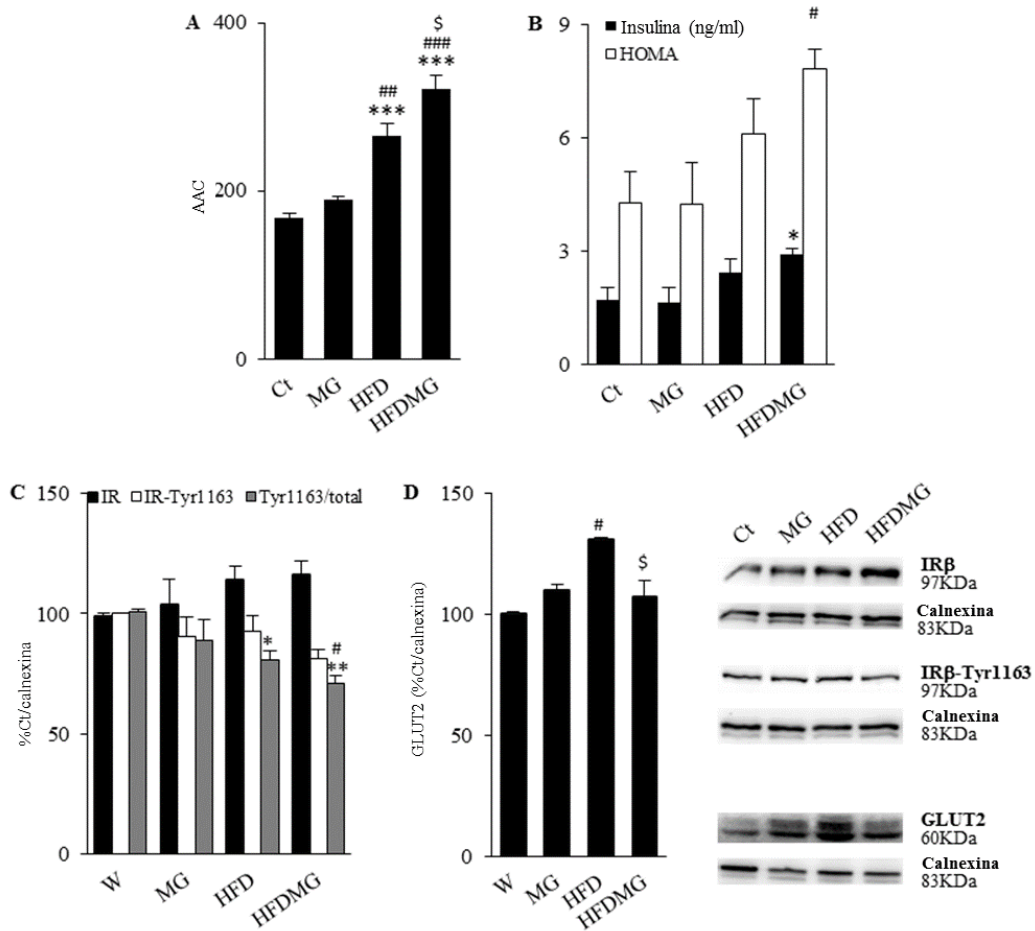


Figura 6: Teste de tolerância à glicose (valores de área abaixo da curva) (A), níveis plasmáticos de insulina e índice de resistência à insulina (B). Níveis do receptor de insulina total, ativado e rácio (C) e GLUT2 (D) no fígado, analisados por western blot. A intensidade foi calculada por comparação ao controle. À direita encontram-se os blots representativos. Ct – controle Wistar; MG – Wistar com MG; HFD – Wistar com dieta gorda; HFDMG – Wistar com dieta gorda mais MG. Média ± erro padrão. * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$; 3 símbolos $p < 0.001$.

Discussão

A NAFLD é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) No entanto, começam a surgir novos dados sugerindo a possibilidade de esta preceder a SM e a DMT2. (36-38) Evidências recentes sugerem que a NAFLD é um fator de risco independente para SM e DMT2. (38-40) Nesta situação, a insulino-resistência torna-se uma das principais alterações, apesar dos mecanismos e fatores envolvidos no seu desenvolvimento sejam ainda parcialmente desconhecidos. (38,41) Neste estudo colocámos a hipótese de que a acumulação dos produtos glicosados pode alterar o perfil lipídico hepático na obesidade, contribuindo para o desenvolvimento da insulino-resistência. Neste sentido, desenvolvemos um modelo animal com obesidade induzida por dieta e glicação induzida pelo metilglicoxal. Além disso, utilizámos duas diferentes técnicas complementares, a espectroscopia de ressonância magnética e cromatografia gasosa e espectrometria de massa para analisar o perfil lipídico. A espectroscopia revela-nos a fração lipídica total do fígado, incluindo a saturação e esterificação. É considerada uma das técnicas mais avançadas para o diagnóstico não invasivo de NAFLD e é útil no diagnóstico precoce. Por outro lado, a espectrometria de massa deteta as espécies lipídicas na célula de forma mais detalhada, mas a colheita requer técnicas invasivas. (42)

Os lípidos hepáticos são maioritariamente originados pela dieta, lipogénese *de novo* e lipólise do tecido adiposo. (43) O tecido adiposo é o local fisiológico para armazenamento do tecido adiposo, mas a obesidade é caracterizada pela disfunção do tecido adiposo, com sobreexpressão de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias e supressão da sinalização da insulina. A insulino-resistência no tecido adiposo é o principal desencadeante da lipólise e consequente elevação dos ácidos gordos plasmáticos e deposição ectópica no fígado e no músculo. (44,45) Demonstrou-se que a remoção cirúrgica do tecido adiposo inflamado e a prevenção da lipólise previne o desenvolvimento da NASH, demonstrando que os lípidos e

citocinas inflamatórias derivados do tecido adiposo têm influência na inflamação hepática. (46,47) Enquanto a acumulação de vesículas ricas em triglicerídeos no fígado é considerada inofensiva e, possivelmente, protetora contra a insulino-resistência, os ácidos gordos não esterificados, ectópicos, são ativadores de vias de inflamação e conseqüentemente indutores de insulino-resistência. (38,48). Estes tipos de lípidos e ceramidas ativam a expressão de F4/80 nas células de Kupffer, que induzem o ambiente inflamatório da NAFLD para NASH. Neste estudo, mostrámos que a acumulação de produtos glicosados é responsável pelo aumento total dos níveis hepáticos do F4/80 e infiltração inflamatória portal. Este mesmo modelo animal, também desenvolveu insulino-resistência no tecido adiposo (49), que contribui para o aumento do fluxo de ácidos gordos para o fígado. Recentemente, foi demonstrada a supressão da lipogénese *de novo*, mas não da esterificação de ácidos gordos em ratos com dieta gorda. Tais resultados revelam que, em condições fisiológicas, o fígado tem a capacidade de inibir a síntese de ácidos gordos e armazenar os existentes de forma inofensiva. (50) De acordo com estas observações, os nossos resultados mostram que ratos com dieta rica em triglicerídeos têm inibição das enzimas-chave da síntese de ácidos gordos (AceCS, ACC e FAS) e níveis aumentados dos lípidos esterificados no fígado. (51) No entanto, a glicação bloqueia a supressão das enzimas, levando a níveis aumentados de ácidos gordos não esterificados e à ativação das vias inflamatórias. Estes resultados estão de acordo com resultados recentes, que mostraram um incremento da lipogénese hepática após ingestão de frutose, através da inativação direta da AMPK pelo MG derivado da frutose. (52)

O envolvimento dos ácidos gordos saturados e insaturados da dieta na acumulação de gordura no fígado tem sido alvo de extensa investigação. Demonstrou-se que os ácidos gordos monoinsaturados e os ácidos gordos polinsaturados ómega-6 diminuem a gordura hepática, enquanto os ácidos gordos saturados estão associados a maior acumulação de gordura no fígado. (43,53) Desta forma, a substituição dos ácidos gordos saturados da dieta por ácidos

gordos polinsaturados ômega-3, sem a modificação das calorias totais, provou melhorar a NAFLD. (54) Os ácidos gordos polinsaturados ômega-3 causaram também uma diminuição na peroxidação dos lípidos, inflamação e progressão da NASH. (55-57) Estes efeitos provavelmente derivam de diferentes regulações da maquinaria de oxidação em resposta aos diferentes tipos de lípidos. (58) Neste estudo comprovámos que uma dieta rica em triglicéridos leva à diminuição dos níveis relativos de ácidos gordos polinsaturados (20:4 e 22:6) no fígado devido ao aumento dos níveis de ácidos gordos monoinsaturados, nomeadamente do 18:1, o que é causado pelos altos níveis deste na dieta. No entanto, a glicação inibiu o aumento dos níveis dos monoinsaturados no fígado com diminuição semelhante dos polinsaturados. Em geral, o total de ácidos gordos insaturados sofreu uma maior diminuição no grupo HFDMG, mostrando que a glicação aumenta a saturação lipídica, especialmente pela diminuição dos ácidos gordos monoinsaturados. Estes eventos provavelmente resultaram de uma alteração da função mitocondrial, e consequente diminuição da oxidação dos lípidos, como mostrado pela diminuição da ativação da AMPK e dos níveis de cardiolipinas polinsaturadas, marcador de dano oxidativo mitocondrial. (59,60) Os nossos resultados demonstraram que, mesmo sem alterações *major* nos níveis totais das diferentes classes de fosfolípidos, é observada uma diminuição específica das cardiolipinas polinsaturadas nos ratos obesos com suplementação de MG. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas, a tendência observada para a diminuição do número total de fosfolípidos anti-oxidantes, está de acordo com os dados anteriores que mostram alteração nos sistemas anti-oxidantes induzidas pelo MG.

Os AGE têm sido implicados no desenvolvimento e progressão das complicações da diabetes, mas dado que os seus níveis estão aumentados na obesidade e pré-diabetes e em alimentos ricos em açúcares, também têm sido progressivamente implicados no início da síndrome metabólica, incluindo insulino-resistência. O metilglioxal, um dicarbonilo que

origina AGE, é encontrado em alimentos ricos em açúcares, como o *high fructose corn syrup* (HFCS), que é comumente usado em bebidas açucaradas. (12,61) Estudos recentes demonstraram que o consumo de dietas ricas em AGE resulta num aumento de *stress* oxidativo, fibrose e inflamação hepáticas. (62,63) Os níveis séricos de AGE têm, inclusivamente, sido sugeridos como biomarcadores de NAFLD. (64,65) O consumo de HFCS tem sido associado a síndrome metabólica, incluindo aumento da acumulação de gordura hepática e insulino-resistência, principalmente através do aumento da lipogénese *de novo*. (43,61) No entanto, estes efeitos são, provavelmente, em parte mediados pelo MG e pela consequente formação de AGE. Assim, os estudos existentes sugerem que o aumento dos AGE no fígado pode, de facto, contribuir para o aparecimento de NAFLD. Foi demonstrado que estes eventos são mediados pelo recetor dos AGE (RAGE) e que o uso farmacológico de uma isoforma solúvel do RAGE exerce efeitos protetores nos doentes com NAFLD. (66,67) Neste estudo, demonstramos pela primeira vez, utilizando RMN e HPLC/MS, que os efeitos do MG no fígado gordo ocorrem através da desregulação do metabolismo dos lípidos que por sua vez leva à inflamação e insulino-resistência.

Conclusão

Em resumo, os AGE podem ser formados a partir do metabolismo da glicose e frutose, mas também a partir de fontes exógenas destes açúcares e dicarbonilos como o MG. A acumulação de AGE no fígado afeta o metabolismo dos lípidos na obesidade, incluindo uma supressão alterada da lipogénese *de novo* e níveis aumentados de ácidos gordos saturados e não esterificados. Estes eventos alteram o perfil lipídico do fígado, causando inflamação e resistência à insulina, contribuindo para a patogénese da NAFLD. Este estudo demonstra, pela primeira vez, as alterações do metabolismo dos lípidos que ocorrem pela acumulação dos AGE e sugere que uma diminuição na formação e acumulação destes poderá ser uma estratégia promissora no tratamento da NAFLD.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo projeto FCT (Pest-C/SAU/UI3282/2011), FEDER-PT2020 (002034, 00205), FCT/MEC (UID/QUI/00062/2013, UID/NEU/04539/2013), DoIT – Diamarker (QREN- COMPETE), RNEM (REDE/1504/REM/2005) e pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. T.A.R. e P.N.M. são financiados pela bolsa PhD (SFRH/BD/101172/2014) e bolsa Post-Doc (SFRH/BPD/104881/2014).



Agradecimentos

Ao concluir, novamente, mais uma etapa da minha caminhada acadêmica, quero agradecer a todos os que, com o seu conhecimento, disponibilidade, partilha, motivação e entusiasmo, foram fundamentais para ultrapassar as dificuldades e sempre estiveram ao meu lado. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas com um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Ao Doutor Paulo Matafome, quero expressar o meu profundo agradecimento pela orientação, apoio, aprendizagem técnica e científica e por me incentivar a continuar a fazer melhor. Obrigado pela confiança e responsabilidade que me inculuiu ao longo destes anos. Obrigado, também, por permitir o meu envolvimento científico no trabalho do laboratório, pelos convites na participação de congressos nacionais e internacionais, pelos prémios e pelas publicações que advêm deste projeto. Obrigado porque, mais do que um orientador e professor, se tornou um grande amigo que quero levar para a vida, sem dúvida. O sentido de humor e profissionalismo são atitudes que bem aplicados tornam as pessoas as melhores que alguém poderia conhecer.

À Professora Doutora Raquel Seiça, por me proporcionar as condições necessárias para estagiar, trabalhar e elaborar as minhas teses, por permitir a minha integração num centro de investigação e pela simpatia e disponibilidade para me orientar neste percurso académico e científico.

À Professora Doutora Rosário Domingues, que tive o privilégio de conhecer na minha licenciatura e que desde esse momento se tornou uma professora muito especial pela simpatia e dedicação. Obrigado por possibilitar a realização de parte deste projeto no seu laboratório, pela confiança e por toda a colaboração, que contribuiu fundamentalmente para a minha formação.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia pela amizade, companheirismo, pela ajuda, aprendizagem e aventuras. Em especial para o Doutorando Tiago Rodrigues, pelo companheirismo e dedicação. Obrigado à Rita Fonseca, Luís Gamas, José Paulo e todos aqueles que tive oportunidade de conhecer no laboratório.

Ao Professor Doutor Miguel Castelo Branco, ao Doutor José Sereno e restante equipa do ICNAS, com quem tive o privilégio de colaborar e que mantêm o incentivo na continuação do trabalho.

À Doutora Cláudia Simões, que me ajudou criteriosamente na lipidómica. Obrigado pela sua exigência e total disponibilidade. Obrigado também à Técnica Superior D. Cristina Barros pela entreatajuda, carinho e bom sentido de humor diário que tornou os meus dias mais alegres durante a colaboração no QOPNA, pelo companheirismo e boa disposição. Obrigado também à restante equipa pela ajuda e pelos momentos bem passados.

Ao Sr. Simões da Fisiologia pela alegria e apoio prestado. Ao Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra pela colaboração nas análises sistémicas. À Técnica Ana Marau e restante equipa pelo apoio, companheirismo e manutenção do Biotério do IBILI.

Às coordenadoras da minha anterior licenciatura (Ciências Biomédicas) e mestrado (Biomedicina Molecular), Professora Doutora Odete Cruz e Silva, Doutora Margarida Fardilha e Doutora Ana Gabriela Henriques pela motivação para não parar o meu percurso na investigação e que sem elas não poderia estar onde estou atualmente.

Aos meus professores do colégio Fátima, da ESE e da Universidade de Aveiro que sempre contribuíram para fazer de mim um homem melhor, enriquecendo a minha vida e formação académica e científica. Em especial à Doutora Ilka Martins, à Doutora Vera Afreixo, ao Doutor José Mesquita Bastos, ao Professor Doutor António Amaro e ao Professor Doutor Pedro Domingues pelo exemplo e motivação.

À família, principalmente aos meus pais pelo seu apoio incondicional e que graças a eles consigo ser a pessoas que sou atualmente. Obrigado padrinhos, irmãos, cunhada, sobrinhos, tios, primos e Vobela por todo o apoio e preocupação, especialmente à minha irmã Anabela e prima Belinha.

À Inês Pinto, Joana Pereira, Sara Freixo e Carlos Barreto pela companhia árdua, principalmente durante este último ano, pelo companheirismo, amizade, brincadeiras, aventuras e por todas as nossas conversas. Obrigado especial ao triângulo, Né e Jopi, por me aturarem, pelas parvoíces e pelo speed final para acabar a tese. Hoje grandes amigos.

Às minhas amigas de longa data académica, Inês Pinheiro e Lorrane pelo carinho, paciência, apoio e ajuda ao longo deste percurso que ainda se irá prolongar por largos anos. À Romina que, apesar de longe nestes últimos anos, manteve sempre o contacto e apoio. Obrigado por todo o afeto e interminável amizade. À Joana Simões, Mafalda e Raquel Lima pela parceria nos trabalhos “a sério”, amizade e por aturarem o meu contínuo “*stress*” do hepatócito. À Catarina Toscano obrigado pela paciência e bons momentos passados, que apesar de mais longe atualmente, estarás sempre perto.

Às melhores pessoas da FMUC: João, Sílvia, Marta, Olga, Inês Figueiredo, Isabel e Inês Camarinha, obrigado por me aturarem, por terem de ouvir as minhas desculpas da tese e pela pseudo-ausência na mesa quando me punha a escrever. Aos meus amigos do CEL que, apesar de recentes, já deixaram a sua marca, principalmente ao Hugo pela amizade, conversas, paciência e presença.

À minha fantástica turma 9/2 que me acolheu quando entrei em medicina, que me ajudou nos momentos mais difíceis e pela continuação como colegas médicos no futuro.

Às pessoas que conheci durante o meu estágio em Dénia, Espanha. A todo o serviço de cirurgia, especialmente à Dra. Eva, ao Dr. Vicente, à Dra. Silvia e ao nosso Chefe Dr. Eduardo. À família: Berta, Lauri, Olka, Simran, Ffyon, Kirsty, Helene, Luis, Sini e Manuela.

Ao Dr. André Torres Cardoso por revelares ser mais incrível do que já eras, obrigado por todo o apoio, pelas gargalhadas e conversas. Um amigo que levo para a vida.

Aos meus amigos e companheiros sobreviventes do mestrado, pela força, incentivo e bons momentos. Obrigado especial à Filgas, Dani, Marta, Cátia e Margarida. Aos meus amigos de CBM, em especial aos meus moleculares e farmacêuticos de 2009/2010, e a todos os que me acompanharam até 2013, principalmente à Coelha. Aos meus pedaços de terra e pseudo-afilhados pelo conforto, ajuda nos momentos mais precisos e pela compreensão, em especial ao Mário por agora me acompanhar nesta bela cidade de Coimbra.

Às coletividades a que pertenço: Grupo de Samba Os Morenos, Escuteiros do CNE 233-Estarreja, Grupo de Teatro Artê, Associação Antigos Alunos Estarreja e Universidade Sénior Rotary Estarreja, pela compreensão nas minhas ausências, por me aceitarem de papéis na mão para estudar ao mesmo tempo durante as atividades e pelo carinho demonstrado.

Aos amigos da ESE pelo apoio na integração numa nova realidade estudantil e pela amizade que perdura, em especial à Cíntia.

E, por último, mas não menos importante, aos meus “Miguitos” que sei que estarão sempre presentes quando preciso, que nunca me deixarão só e sempre me apoiarão. Um obrigado especial à Rosa, Marisa, Ju, Inês, Tiago, Dayana, Carina, Cátia, Bruno, Ricardo, Cédric, Bruno Marques, Christian, Taylor, César, Juan, Hugo, Rita Sá, Esteves, Couras, PH, Pedrinho, Tiaguinho, Joãozinho, Joaninha, Samuel, Maria João e André.

E obrigado a todos os outros que, mesmo não identificados, foram importantes com o seu incentivo e apoio permanentes, bem como a todas as pessoas amigas ou conhecidas, que têm manifestado o seu carinho e orgulho com o sucesso alcançado em cada momento da minha vida, em especial à Dona São Nunes e Dona Maria de Jesus.

Referências bibliográficas

1. Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology. 2008.
2. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. 2010 Feb;59(2):347–57.
3. Kien CL, Heitlinger LA, Li BU, Murray RD. Digestion, absorption, and fermentation of carbohydrates. *Semin Perinatol*. 1989 Apr;13(2):78–87.
4. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008 Jun;92(3):272–83.
5. Sonntag A, Dalle Pezze P, Shanley D, Thedieck K. A modelling-experimental approach reveals insulin receptor substrate (IRS)-dependent regulation of adenosine monophosphate-dependent kinase (AMPK) by insulin. *FEBS J*. 2012;279(18):3314–28.
6. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. *Bioquímica - organização molecular da vida*. 1st ed. LIDEL; 2008.
7. Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul 1;297(1):E28–37.
8. Nagan N, Zoeller RA. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res*. 2001 May;40(3):199–229.

9. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:3071–109.
10. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005;54:1615–25.
11. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jan 15;314(1):1–16.
12. Matafome P, Sena C, Seica R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine*. 2013 Jun;43(3):472–84.
13. Matafome P, Rodrigues T, Rodrigues L, Sena CM, Pereira P. ethylglyoxal causes structural and functional alterations in. 2012;(January):1–11.
14. Rodrigues T, Matafome P, Seic R. A vascular piece in the puzzle of adipose tissue dysfunction : mechanisms and consequences. 2013;3455:1–11.
15. Sena CM, Matafome P, Crisóstomo J, Rodrigues L, Fernandes R, Pereira P, et al. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endotelial dysfunction. *Pharmacol Res*. 2012.
16. Schreuder TCM a, Verwer BJ, van Nieuwkerk CMJ, Mulder CJJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2008 Apr 28;14(16):2474–86.
17. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):91–100.

18. Tessari P, Coracina a, Cosma a, Tiengo a. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Elsevier Ltd; 2009 May;19(4):291–302.
19. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):987–1000.
20. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013 Mar;7(1):14–24.
21. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo R a, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013 May;5(5):1544–60.
22. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4):952–64.
23. Matafome P, Santos-Silva D, Crisóstomo J, Rodrigues T, Rodrigues L, Sena CM, et al. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2012 May;118(2):58–68.
24. Rodrigues T, Matafome P, Seïça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Arch Physiol Biochem*. 2013 Dec;119(5):209–18.
25. Rodrigues, Paulo M, Santos-Silva D, Sena C, Seïça R, Rodrigues T, et al. Reduction of methylglyoxal-induced glycation by pyridoxamine improves adipose tissue microvascular lesions. *J Diabetes Res*. 2013 Jan;2013:690650.

26. Berlanga J, Cibrian D, Guillén I, Freyre F, Alba JS, Lopez-Saura P, et al. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. *Clin Sci*. 2005 Jul;109(1):83–95.
27. Wang Y, Bollard ME, Keun H, Antti H, Beckonert O, Ebbels TM, et al. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. *Anal Biochem*. 2003;323:26–32.
28. Hamilton G, Yokoo T, Bydder M, Cruite I, Schroeder ME, Sirlin CB, et al. In vivo characterization of the liver fat ¹H MR spectrum. *NMR Biomed*. 2011;24(7):16.
29. Zancanaro C, Nano R, Marchioro C, Sbarbati a, Boicelli a, Osculati F. Magnetic resonance spectroscopy investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes. *J Lipid Res*. 1994;35(12):2191–9.
30. FOLCH J, Lees M, Sloane Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;55(5):999–1033.
31. Feng J, Chen Y, Pu J, Yang X, Zhang C, Zhu S, et al. An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. *Anal Biochem*. 2011 Feb 1;409(1):144–9.
32. Gonçalves IO, Maciel E, Passos E, Torrella JR, Rizo D, Viscor G, et al. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:163–73.

33. Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev.* Jan;22(5):332–64.
34. Aued-Pimentel S, Lago JHG, Chaves MH, Kumagai EE. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *J Chromatogr A.* 2004 Oct 29;1054(1-2):235–9.
35. Simões C, Domingues P, Ferreira R, Amado F, Duarte JA, Vitorino R, et al. Remodeling of liver phospholipidomic profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Biochem Biophys.* 2013 Oct 15;538(2):95–102.
36. Amedeo L, Ballestrin S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99.
37. Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology.* 2015;1–67.
38. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015;47(3):181–90.
39. Loria P, Marchesini G, Nascimbeni F, Ballestri S, Maurantonio M, Carubbi F, et al. Cardiovascular risk, lipidemic phenotype and steatosis. A comparative analysis of cirrhotic and non-cirrhotic liver disease due to varying etiology. *Atherosclerosis.* Elsevier Ltd; 2014;232(1):99–109.
40. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia.* 2015;58:886–99.

41. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. Elsevier Ltd; 2015;239(1):192–202.
42. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, et al. Review article: The diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease - Availability and accuracy of non-invasive methods. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(4):392–400.
43. Marchesini G, Mazzotti A. NAFLD incidence and remission: Only a matter of weight gain and weight loss? *J Hepatol*. 2015;62(1):15–7.
44. Guilherme A, Virbasius J V, Puri V, Czech MP, Trayhurn P, Wang B, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;11(4):715–28.
45. Matafome P, Rodrigues T, Seica R. Glycation and hypoxia: two key factors for adipose tissue dysfunction. *Curr Med Chem*. 2015 Feb;22:1–21.
46. Mulder P, Morrison MC, Wielinga PY, van Duyvenvoorde W, Kooistra T, Kleemann R. Surgical removal of inflamed epididymal white adipose tissue attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Int J Obes (Lond)*. Nature Publishing Group; 2015;(October):1–10.
47. Wueest S, Item F, Lucchini FC, Challa TD, Müller W, Blüher M, et al. Mesenteric Fat Lipolysis Mediates Obesity-associated Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2015 Sep;65(1):db150941.
48. Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells. *Biomed Res Int*. 2015 Jan;2015:984578.

49. Rodrigues T, Matafome P, Almeida J, Gamas L, Sereno J, Castelhana J, et al. Methylglyoxal-induced glycation changes adipose tissue vascular architecture, flow and expansion, leading to insulin resistance. *Sci Rep.* :In Press.
50. Duarte J a. G, Carvalho F, Pearson M, Horton JD, Browning JD, Jones JG, et al. A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *J Lipid Res.* 2014;55(12):2541–53.
51. Wellen KE, Thompson CB. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2012;13(4):270–6.
52. Gugliucci A. Fructose surges damage hepatic adenosyl-monophosphate-dependent kinase and lead to increased lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Med Hypotheses.* 2016 Aug;93:87–92.
53. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2016;11(1):451–96.
54. Morrison MC, Mulder P, Stavro PM, Suárez M, Arola-Arnal A, Van Duyvenvoorde W, et al. Replacement of dietary saturated fat by PUFA-rich pumpkin seed oil attenuates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development, with additional health effects of virgin over refined oil. *PLoS One.* 2015;10(9):1–19.
55. De Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, et al. Ω 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem.* 2011;1–10.

56. Delarue J, Lallès JP. Nonalcoholic fatty liver disease: Roles of the gut and the liver and metabolic modulation by some dietary factors and especially long-chain n-3 PUFA. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(1):147–59.
57. Jump DB, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA. Potential for Dietary ω -3 Fatty Acids to Prevent Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Reduce the Risk of Primary Liver Cancer. *Adv Nutr An Int Rev J*. 2015;6(6):694–702.
58. Priore P, Stanca E, Gnoni GV, Siculella L. Dietary fat types differently modulate the activity and expression of mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase in rat liver. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. Elsevier B.V.; 2012;1821(10):1341–9.
59. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 21;20(39):14205–18.
60. Luévano-Martínez LA, Forni MF, Dos Santos VT, Souza-Pinto NC, Kowaltowski AJ. Cardiolipin is a key determinant for mtDNA stability and segregation during mitochondrial stress. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. Elsevier B.V.; 2015;1847(6-7):587–98.
61. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Bugianesi E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015;4(2):109–16.
62. Patel R, Baker SS, Liu W, Desai S, Alkhoury R, Kozielski R, et al. Effect of dietary advanced glycation end products on mouse liver. *PLoS One*. 2012;7(4).

63. Leung C, Herath CB, Jia Z, Goodwin M, Mak KY, Watt MJ, et al. Dietary glycotoxins exacerbate progression of experimental fatty liver disease. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver*; 2014;60(4):832–8.
64. Kimura Y, Hyogo H, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ishitobi T, Nabeshima Y, et al. Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation endproducts (AGEs) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients with dyslipidemia: Clinical usefulness of AGEs as a biomarker for the attenuation of NASH. *J Gastroenterol.* 2010;45(7):750–7.
65. Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T, Ueda T, Takino J, Tsutsumi M, et al. Serum levels of toxic AGEs (TAGE) may be a promising novel biomarker in development and progression of NASH. *Med Hypotheses.* 2015 May;84(5):490–3.
66. Leung C, Herath CB, Jia Z, Andrikopoulos S, Brown BE, Davies MJ, et al. Dietary advanced glycation end-products aggravate non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(35):8026–40.
67. Zelber-Sagi S, Salomone F, Kolodkin-Gal I, Erez N, Buch A, Yeshua H, et al. Protective role of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2017 Jan.

