



THIAGO MATOS FERREIRA DE ARAUJO

**A ATIVAÇÃO DA mTOR EM RESPOSTA À SOBRECARGA DE
NUTRIENTES, E SUA RELAÇÃO COM A APOPTOSE E O
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM CÉLULAS
HepG2.**

Campinas

2014

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THIAGO MATOS FERREIRA DE ARAUJO

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô

**A ATIVAÇÃO DA mTOR EM RESPOSTA À SOBRECARGA DE
NUTRIENTES, E SUA RELAÇÃO COM A APOPTOSE E O
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM CÉLULAS
HepG2.**

Tese de doutorado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO THIAGO MATOS FERREIRA DE ARAUJO E ORIENTADO PELO PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ.

.....
Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D347a de Araujo, Thiago Matos, 1983-
A ativação da mTOR em resposta à sobrecarga de nutrientes, e sua correlação com a apoptose e o estresse de retículo endoplasmático em células HepG2 / Thiago Matos Ferreira de Araujo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gabriel Forato Anhê.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipernutrição. 2. Estresse do retículo endoplasmático. 3. Apoptose. 4. Serina-treonina quinases TOR. I. Anhê, Gabriel Forato, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The mTOR activation in response to overload of nutrients and their relationship with apoptosis and endoplasmic reticulum stress in HepG2 cell line

Palavras-chave em inglês:

Overnutrition

Endoplasmic reticulum stress

Apoptosis

TOR serine-threonine kinases

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gabriel Forato Anhê [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Marciane Milanski Ferreira

Alice Cristina Rodrigues

Camilo de Lellis Santos

Data de defesa: 31-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

THIAGO MATOS FERREIRA DE ARAUJO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). GABRIEL FORATO ANHÊ

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). GABRIEL FORATO ANHÊ

2. PROF(A). DR(A). SISI MARCONDES PASCHOAL

3. PROF(A). DR(A). MARCIANE MILANSKI FERREIRA

4. PROF(A).DR(A). ALICE CRISTINA RODRIGUES

5. PROF(A).DR(A). CAMILO DE LELLIS SANTOS

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 31 de julho de 2014

Dedicatória

A Ele por fortalecer e consolidar os meus sonhos diariamente.

Aos meus pais, Joaquim e Rejane, pelo intenso amor e ensinamentos de vida, proporcionando-me ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Gabriel, pela intensa dedicação as nossas tarefas diárias, e confiança ao me aceitar como seu orientando.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Diabetes Melitus e a todos os colegas que foram ou são integrantes dele, Carol, Ana Paula, Danilo, Caroline, Cindy, Zé, Rúbia, Jéssica, Giuliana, Thyelle e Priscila pela boa convivência e conhecimentos adquiridos e divididos diariamente.

Ao prof. Lício e todos integrantes do Laboratório de Sinalização Celular, pelo espírito colaborativo constante, principalmente quando nós não tínhamos estrutura suficiente para realizar nossos experimentos.

Ao Departamento de Farmacologia, e a todos os seus integrantes, pelo convívio amistoso e devoção a pesquisa. Em especial ao Seu Miguel e a Maíza, exemplos de profissionais se doam ao seu trabalho.

As minhas colaboradoras diretas, Juliana e Andrezza, que além de companheiras de trabalho tornaram-se amigas, que levarei para o resto da vida com muito apresso.

Ao Kleiton, pelo companheirismo, dedicação e respeito.

Aos meus amigos de longe, que de lá de Maceió, minha terrinha natal que amo, me incentivam e sempre deixam a chama da amizade acesa.

Aos amigos de perto, que foram adquiridos e hoje fazem parte de mim, Jurubeba, Barbarela e Paulinho.

Aos meus familiares, pelo carinho e amor.

A todos que durante estes sete anos de vivência campineira, participaram do meu crescimento pessoal, em especial a Profa. Nelci, André Nazário e Larissa Jatobá, a minha irmãzinha.

A FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF6 – fator de transcrição ativador 6

ASK1 – quinase 1 reguladora do sinal apoptótico

ERAD – fator de degradação de proteínas mal formadas associado ao retículo endoplasmático

FDA – “U.S. food and drug administration”

GSK3 β – glicogênio sintase quinase 3 β

IGF1 – “insulin-like growth factor 1”

JNK – c-Jun n-terminal quinase

IMC - índice de massa corpora

IL-6 – interleucina 6

Ire1 – “inositol-requiring enzyme-1”

IRS1 – substrato do receptor de insulina 1

mTOR - alvo da rapamicina em mamíferos

NAFLD - “non-alcoholic fat liver disease”

NASH - “nonalcoholic steatohepatitis”

OMS – Organização Mundial de Saúde

PHG - produção hepática de glicose

PERK - “PKR-like eukaryotic initiation factor 2 kinase”

PI3K – fosfoinositol 3 quinase

VLDL – lipoproteína de baixíssima densidade

TNF- α – fator de necrose tumoral

TOR - alvo da rapamicina

TRAF2 – receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 2

RE - retículo endoplasmático

SERCA2b – retículo endoplasmático/sarcoplasmático cálcio ATPase

S6K1 – proteína ribossomal S6 quinase

UPR - “unfolded protein response”

XBP-1 - “x box protein 1”

4EBP1 – “eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1”

Figura 1: Representação esquemática simplificada da rede de sinalização do estresse de retículo endoplasmática e suas possíveis consequências na adaptação, advinda da exacerbação de proteínas no lúmen desta organela.

Figura 2: Representação esquemática da sinalização da mTOR, e suas correlações com diversos processos fisiológicos e patológicos. Ativação dos complexos mTOR1/Raptor e mTOR2/Rictor, e o poder inibitório da rapamicina em ambas vias.

Figura 3: Experimento curso temporal de células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato em 0,5, 1, 2, 3, 6 e 12 horas. Estas células foram tratadas e posteriormente incubadas com solução contendo iodeto de propídeo “over night”, para posterior averiguação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo.

Figura 4: Experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas) de proteínas chave nas vias de sinalização do estresse de RE, analisadas por “Western blot”, após tratamento com palmitato na concentração de 200 μ M.

Figura 5: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) de proteínas chave nas vias de sinalização do estresse de RE analisadas por “Western blot”, após tratamento com palmitato na concentração de 200 μ M.

Figura 6: Análise de proteínas envolvidas com a atividade pós-traducional do complexo mTORC1/Raptor num experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas), tratadas com palmitato (200 μ M) e analisadas por “Western blot”.

Figura 7: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) de proteínas chave envolvidas com a atividade com o complexo mTORC1/Raptor (A) (B), e da própria mTOR total (C). Tratamento realizado com 200 μ M de ácido palmítico, com análise realizada através de “Western blot”.

Figura 8: Linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato e/ou rapamicina em diferentes doses (10, 100 ou 500 nM) por 12 horas (n=6), com posterior incubação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo da fragmentação de DNA.

Figura 9: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) com células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato e/ou rapamicina (500 nM). Avaliação de proteínas envolvidas com sinalização do estresse de RE e da mTOR, normalizadas pelo “pounceau”.

Figura 10: Coloração de “Oil Red O” em células de hepatoma tratados com palmitato e/ou rapamicina. Células controle, tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas ou com palmitato e rapamicina (500 nM) por 12 horas. Conteúdo lipídico pós-microscopia das células quantificado por espectofometria em 510 nM *(P<0,05).

Figura 11: Experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas) (A) e longo (3, 6 e 12 horas) (B), para AKT fosforilada no resíduo serina 473, normalizada pela AKT total. As células de hepatoma humano (HepG2) foram tratadas com 200 μ M de palmitato durante todo o tempo de experimentação, e a análise de fosforilação da AKT foi dada por “Western blot”.

Figura 12: Células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas e/ou wortimanina (1nM), LY (100uM), “AKT inibitor” (100 nM) em DMEM com 1% de albumina (n=6). Estas drogas foram incubadas por 15 minutos e removidas do meio para posterior incubação com palmitato. A análise de fragmentação de DNA foi dada com incubação “over night”, numa solução contendo iodeto de propídeo.

Figura 13: Análise por “Western blot” da AKT fosforilada em serina 473 em 1 hora ou 12 horas, tratadas com palmitato numa concentração de 200 μ M e/ou pré-tratamento com “AKT inibitor” (100 nM) por 15 minutos.

Figura 14: Células de hepatoma (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas e/ou pré-tratamento por 15 minutos com “AKT inibitor” (100 nM). Análise

por “Western blot” de proteínas envolvidas com estresse de retículo endoplasmático.

Figura 15: Coloração de “Oil Red O” em células de hepatoma tratados com palmitato e/ou “AKT inhibitor”. Células controle ou tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas, ou com pré-incubação de “AKT inhibitor” (100 nM) por 15 minutos com posterior tratamento com palmitato. Após microscopia e aquisição de imagens, o conteúdo de incorporação lipídica foi dada por espectrofotometria em 510 nM.

Figura 16: Silenciamento gênico para as proteínas Raptor, Rictor e *Scrambled* (controle). Comprovação da eficiência da transfecção para o si RNA Rictor realizada por “Wester blot”. Apoptose de células de hepatoma humano (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas, com silenciamento gênico preliminar para as proteínas Raptor, Rictor e *Scrambled* (controle).

Figura 17: Células HepG2 tratadas com 33.3 mM de glicose em meio de cultura com 2% de albumina. Células tratadas por 48 horas com glicose com ou sem co-tratamento de rapamicina em duas concentrações: 10 ou 100 nM. Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo, com células tratadas e incubadas com iodeto de propídeo.

Figura 18: Células HepG2 tratadas com 4.5 mM de frutose em meio de cultura contendo 2% de albumina. Células tratadas por 48 horas com frutose com ou sem co-tratamento de rapamicina em duas concentrações: 10 ou 100 nM. Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo, com células tratadas e incubadas com iodeto de propídeo.

Figura 19: Representação esquemática da importância do complexo mTOR2/Rictor e da AKT na geração da apoptose e do estresse de RE em células de hepatoma humano (HepG2), eventos estes gerados pela utilização do ácido graxo de cadeia longa (palmitato).

Figura 20: Representação esquemática da importância dos complexos mTOR1/Raptor e do mTOR2/Rictor na geração da apoptose em células de hepatoma humano (HepG2), eventos estes gerados pela utilização de altas concentrações de carboidratos (glicose e frutose).

	Pág.
RESUMO	15
ABSTRACT	18
1- INTRODUÇÃO	20
1.1- Doença hepática gordurosa não alcoólica correlacionando-se com a obesidade e ao diabetes tipo 2	21
1.2- Retículo endoplasmático: aspectos estruturais e funcionais	25
1.3- Estresse de retículo endoplasmático	26
1.4- Apoptose de hepatócitos no portador de diabetes e obesidade	30
1.5- Alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) na morte celular	31
1.6- mTOR, estresse de RE e morte de hepatócitos	34
2- OBJETIVOS	36
3- MATERIAIS E MÉTODOS	38
4- RESULTADOS	44
5- DISCUSSÃO	66
6- CONCLUSÕES	74
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

A obesidade é caracterizada pela deposição ectópica de gordura no fígado. Este acúmulo de gordura hepática (NAFLD) pode gerar consequências graves, como a hepatite não alcoólica (NASH), fator de risco para carcinoma hepatocelular (HCC). A morte de hepatócitos, evento chave na evolução da NAFLD para NASH, é causada pelo excesso de nutrientes e é dependente do estresse de retículo endoplasmático (RE). O estresse no RE resulta no acúmulo de proteínas não processadas desencadeia a “unfolded protein response” (UPR), podendo gerar apoptose. A mTOR é formada basicamente por dois complexos: mTOR1 e mTOR2; ambos são sensíveis a nutrientes, a insulina e a rapamicina. O complexo mTOR2/Rictor catalisa a fosforilação da AKT, aumentando a sinalização da insulina. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre ativação da mTOR, do estresse de RE e da apoptose em hepatócito expostos a ácidos graxos livres. Observamos que a apoptose causada pelo palmitato ativa o estresse de RE de maneira tempo dependente. Não observamos alterações na fosforilação de proteínas alvo específicas para o complexo mTOR1. No entanto, a fosforilação geral da mTOR foi estimulada pelo palmitato. Altas doses de rapamicina inibiram a apoptose e do estresse de RE causado pelo palmitato, sugerindo a participação do complexo mTOR2. Estes resultados ainda foram confirmados pelo silenciamento gênico da Rictor. A fosforilação em serina 473 da AKT apresenta um caráter transitório, elevando-se em tempos que precedem morte e o estresse de RE, e diminuindo em tempos prolongados concomitantemente à apoptose. A inibição da AKT pelo “AKT inhibitor” gerou diminuição da apoptose, do estresse de RE e da incorporação lipídica na linhagem de hepatoma. Estes dados sugerem que a AKT, como alvo preferencial da mTOR2 é necessária para geração de morte e da UPR. A glicose (33.3mM) gera morte as células HepG2 e esta é inibida com baixas doses de rapamicina, mostrando possível atividade via mTOR1 nesta resposta. De outro modo, a frutose (4.5mM) que também desencadeia apoptose das células de hepatoma, tem seu efeito inibido por doses maiores de rapamicina, indicando atividade mTOR2 neste processo. No entanto, a possibilidade de diferentes monossacarídeos recrutarem

complexos diferentes de mTOR para desencadear apoptose ainda precisa ser melhor explorada.

Palavras-chave: excesso de nutrientes, estresse de RE, apoptose, mTOR.

ABSTRACT

Obesity is characterized by fat ectopic deposition in liver. This hepatic fat accumulation our non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) can have serious consequences such as non-alcoholic hepatitis (NASH), that is a factor to liver cancer. The cell death of hepatocytes is an important event in the development to NAFLD to NASH, all that are caused by excess nutrients and dependent of endoplasmic reticulum (ER) stress. The ER stress is caused by accumulation of unfolded proteins triggers the unfolded protein response (UPR), which mau cause apoptosis. mTOR is basically formed by two complexes: mTOR1 and mTOR2, both are sensitive to nutrients, insulin and rapamycin. The mTOR2/Rictor complex catalyzes AKT phosphorylation increasing the insulin pathway. All together, the aim of this study was evaluate the relationship between mTOR, ER stress and apoptosis in liver cells exposed to free fatty acids. We observed that apoptosis caused by palmitate activates ER stress in a manner dependent on time. We din't observed changes in phosphorylation of specific target proteins to mTOR1 complex. However, a general phosphorylation of mTOR was stimulated by palmitate. High doses of rapamycin inhibited apoptosis and ER stress caused by palmitate, suggesting the participation of the mTOR2 complex. These results were further confirmed by gene silencing of Rictor. The AKT phospholylation in serine 473 has a transitional character, rising in times that preceding cell death and ER stress, and decreasing concomitantly apoptosis in prolonged times. Inhibition of AKT by AKT inhibitor caused a decrease in apoptosis, ER stress and lipid incorporation in hepatoma cell line. These data suggest that AKT, preferential targets of mTOR2 is required for generation death and UPR. Glucose (33.3mM) generates HepG2 cell death and this is inhibited by low doses on rapamycin, showing possible mTOR1 activity. Otherwise, fructose (4.5mM) also triggers apoptosis of hepatoma cells; its effect is inhibited by higher doses of rapamycin, indicating mTOR2 activity in this process. However, the possibility of different monosaccharide recruit different complexes of mTOR to trigger apoptosis should be further explored.

Keywords: nutrients excess, ER stress, apoptosis, mTOR.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica correlacionando-se com a obesidade e ao diabetes tipo 2

Dentre as patologias hepáticas a mais comum é a doença hepática gordurosa não alcoólica, do inglês “non-alcoholic fat liver disease” (NAFLD). É estimado que cerca de 20 a 30% da população dos países ocidentais tem acúmulo em algum grau de triglicerídeos no fígado. Por volta de 25% da população norte-americana enquadra-se nas categorias de exacerbação de gordura no fígado, e 6 a 8% desta população desenvolveram esteatose hepática não alcoólica, do inglês “nonalcoholic steatohepatitis” (NASH) (Michelotti *et al.*, 2013). Por volta de 25% dos pacientes que são diagnosticados com NAFLD desenvolvem cirrose (Yao *et al.*, 2011). Esta doença costuma apresentar um diversificado espectro histológico, que inclui subtipos de esteatoses simples a NASH, que representa uma forma inflamatória podendo levar a quadros de fibrose avançada, cirrose e até em alguns casos consequências mais danosas, como hepatocarcinomas. Atualmente a NAFLD é dada como uma doença de manifestações metabólicas, pois sua prevalência eleva-se substancialmente com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e a presença do diabetes *mellitus* tipo 2, portanto pacientes com diabetes *mellitus* e IMC maior que 35 são considerados em risco para evolução de uma simples esteatose hepática a casos de cirrose. Estudos epidemiológicos mostram que o aumento do grau de comprometimento hepático está ligado diretamente ao aumento de casos de cânceres de fígado, no entanto os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram totalmente elucidados (Michelotti *et al.*, 2013; Younossi *et al.*, 2013).

O parênquima hepático desempenha um papel fundamental para os mecanismos fisiopatológicos do diabetes *mellitus* e também sofre pelas alterações pertinentes ao metabolismo glicídico. A produção hepática de glicose (PHG) é determinada pela taxa de glicogenólise e gliconeogênese. As evidências acumuladas nos últimos 60 anos demonstram que a PHG pode ser inibida diretamente pela insulina e estimulada por hormônios conhecidos como contra-reguladores, cujas concentrações, ao contrário da insulina, estão aumentadas

durante o jejum (i.e.: catecolaminas e glicocorticóides). A ação destes hormônios faz do fígado um órgão singular em sua capacidade de controlar o metabolismo de carboidratos, na medida em que apresenta uma capacidade tanto de captar quanto de liberar glicose para a circulação, de acordo com a demanda nutricional do organismo (Moore *et al.*, 1998).

Um distúrbio nos mecanismos endócrinos e neuronais que governam a capacidade do fígado de produzir glicose em situações de escassez alimentar parece estar intimamente relacionado à fisiopatologia de desordens metabólicas tais como o diabetes *mellitus* tipo 2. Assim, o aumento da produção hepática de glicose é o principal componente que contribui para os elevados valores da glicemia de jejum em indivíduos obesos com diabetes *mellitus* tipo 2, em decorrência da resistência hepática à ação da insulina (Taylor, 1999)

O diabetes *mellitus* tipo 2, assim como a obesidade, correlaciona-se diretamente com a NAFLD, e até com lesões histológicas mais graves. O aumento de citocinas circulantes, de estresse oxidativo e a própria resistência periférica à insulina, são mecanismos fisiopatológicos comuns aos diabéticos e aos pacientes com graus diferentes de esteatose hepática. De outro modo, as consequências do diabetes *mellitus* preexistente ao hepatocarcinoma celular não estão totalmente esclarecidas, porém a resistência à insulina desencadeia uma maior ação deste hormônio nos receptores IGF1, proporcionando proliferação celular inclusive a células neoplásicas pré-existentes e inibição de mecanismos apoptóticos (Michelotti *et al.*, 2013).

As estimativas para prevalência de esteatose hepática elevam-se quando a população é restringida, pois em obesos os acometidos chegam de 69 a 100% (Monsour *et al.*, 2012), e como atualmente em todo mundo pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do excesso de peso ou da obesidade (OMS, 2012), é deveras preocupante o aumento progressivo de portadores de NASH. A obesidade hoje é um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade, e a elevação do IMC correlaciona-se diretamente com o aumento das taxas de mortalidade, sendo considerados

obesos os indivíduos com IMC igual ou acima que 30 (OMS, 2012). De acordo com dados de 2012 do Ministério da Saúde, no Brasil o percentual de indivíduos com excesso de peso supera mais da metade da população brasileira, sendo 51% de indivíduos com peso acima do ideal; em 2006 o índice era de 43%. A obesidade também obteve índices elevados, cerca de 10% em 2006, para 17% em 2012. Apesar de a obesidade estar relacionada a fatores genéticos, há influência significativa do sedentarismo e de padrões alimentares inadequados. O consumo exacerbado de gordura saturada é preocupante, visto que atualmente 31,5% da população brasileira não dispensam uma fonte proteica gordurosa, e mais da metade (53,8%) consome leite integral regularmente. Além destes fatores, nossa população também é fiel ao consumo de refrigerantes utilizando ao menos cinco vezes por semana (26%) (Ministério da Saúde do Brasil, 2012).

O ácido graxo é um componente essencial na dieta humana, mas um consumo exacerbado ou um desbalanço na qualidade destes ácidos graxos podem levar a efeitos deletérios a saúde. O excesso do consumo de ácido graxo saturado, como o ácido palmítico, promove inflamação e estoque lipídico, em contra partida dietas ricas em ácido graxo poli-insaturado, como o Omega 3, promove uma proteção por controlar a síntese e oxidação dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, também diminuem o estoque hepático lipídico e os níveis de lipídeos circulantes, o que tem relação direta com o risco de doenças cardiovasculares. Atualmente o consumo excessivo de calorias junto à inatividade física promove o desenvolvimento de quadros de obesidade, diabetes e síndrome metabólica. A obesidade está associada a uma deposição ectópica de gordura em tecidos, como coração, células β pancreáticas, fígado e tecido adiposo; levando a lipotoxicidade e inflamação (Jump, 2011).

Estudos indicam que a patogênese do acúmulo de gordura hepática é resultado do aumento do aporte de ácidos graxos livres ao órgão, aumentando a síntese, diminuindo a exportação de triglicerídeos pelas lipoproteínas de baixíssimo peso molecular (VLDL) e redução da beta oxidação. De modo geral, pacientes com NASH tem resistência periférica à insulina, que aumenta a lipólise do tecido adiposo. A elevação de ácidos graxos livres leva a um retorno destes

ácidos graxos ao fígado, podendo causar peroxidação lipídica, e este fenômeno aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6). Este aumento de ácidos graxos livres também podem exceder os limites de beta oxidação mitocondrial, aumentando o estresse oxidativo e a inflamação. A *de novo* lipogênese também contribui para a esteatose. Ela está relacionada à hiperinsulinemia associada à resistência a insulina, que estimula as enzimas da via da *de novo* lipogênese, aumentando a produção e estoque de triglicérides. Na NASH a *de novo* lipogênese representa 26% do acúmulo de triglicérides hepático, já a hiperinsulinemia reduz a secreção de VLDL, causando também acúmulo de gordura no fígado. A adiponectina é produzida pelo tecido adiposo, e é um fator anti-inflamatório que melhora a sensibilidade à insulina. Ela está diminuída em portadores de NASH, levando a redução da oxidação dos ácidos graxos e da gliconeogênese. Visfatina, leptina e resistina, que participam da mesma via, tem ainda papel controverso nos mecanismos da patogênese da NASH (Schwenger & Allard, 2014).

De outro modo a instalação da obesidade, do diabetes tipo 2 e de todas as outras complicações associadas como a esteatose hepática não alcoólica, vem sendo associada ao aumento do consumo de outros componentes nutricionais, como carboidratos. A glicose em altas concentrações é classicamente descrita como um fator importante no desenvolvimento destas patologias, mas atualmente a frutose vem ganhando um papel importante (Feinman & Fine, 2013). A hiperglicemia eleva a atividade das células β pancreáticas, ativando múltiplas redes de sinalização, levando ao estresse celular. Este fenômeno é conhecido como glicotoxicidade, e tem relação direta com a fisiopatologia do diabetes tipo 2. A glicotoxicidade desregula o metabolismo lipídico e eleva os ácidos graxos livres, contribuindo para a disfunção da célula β (Leibowitz *et al.*, 2010).

O consumo excessivo de frutose é relacionado diretamente ao aumento de pessoas obesas e diabéticas no mundo. Este carboidrato quando consumido em excesso tem associação direta com a *de novo* lipogênese, ocasionando uma elevação na circulação de lípidos. Este fator parece ser a relação direta entre o aumento da prevalência e da severidade nos casos de NASH, porque o fígado é o

primeiro sítio da *de novo* lipogênese e é responsável por cerca de 70% da metabolização da frutose, no entanto os mecanismos moleculares da relação entre o consumo exacerbado de frutose e a disfunção hepática não são bem elucidados ainda (Hirahatake *et al.*, 2011; Musso *et al.*, 2013). A utilização da frutose vem aumentando na dieta ocidental pelo seu alto poder adoçante, sendo o mais doces dos açúcares. Deste modo a indústria vem utilizando-a para compor alimentos como bebidas dietéticas, refrigerantes, sucos e frutas industrializadas (Feimen & Fine, 2013).

1.2 Retículo endoplasmático: aspectos estruturais e funcionais

O retículo endoplasmático (RE) é constituído por um sistema de membranas conectadas formando tubos ramificados, às vezes em forma de cisternas, delimitando uma cavidade conhecida como luz. Há duas formas de RE, o rugoso ou granular que apresenta ribossomos associados e uma estrutura na forma de cisternas; e o liso ou agranular que forma estrutura predominantemente tubulares. O RE rugoso é geralmente encontrado em células com intensa taxa de síntese protéica, como as células acinares do pâncreas. Já o RE liso está relacionado a células que têm intensa síntese de hormônios esteróides, como as células de *Leydig* nos testículos. Apesar desta distinção, o RE liso e rugoso pode estar presentes na mesma célula, constituindo estruturas contínuas. A depender do estado fisiológico celular essas estruturas podem assumir postos diferentes, isso ocorre quando os ribossomos se associam temporariamente à membrana do RE liso e a célula necessita de intensa atividade de síntese protéica, por exemplo. Essa capacidade de conversão faz do RE, portanto, uma estrutura de função dinâmica (Novikoff 1976; Ellgaard & Helenius, 2003).

O RE está diretamente ligado à síntese, reestruturação e transporte de proteínas de membrana e proteínas secretadas, síntese de lipídeos e esteroides e estocagem de cálcio (Lee *et al.*, 2012). Estas macromoléculas podem permanecer no próprio RE, seguir para outras organelas citoplasmáticas, ou serem secretados para o exterior celular. O conjunto estrutural do RE delimita uma região do citosol,

e na sua luz acontecem reações bioquímicas específicas, como a formação de pontes dissulfeto, glicosilações e algumas outras modificações estruturais que compreendem a complexa etapa de processamento ou de dobramento de proteínas imaturas. Dependendo do tipo celular e do estado fisiológico celular, o RE assume funções específicas. Em hepatócitos, por exemplo, a presença da enzima Glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) na membrana do RE confere a esta célula a capacidade de converter Glicose-6-fosfato (oriunda da glicogenólise ou da gliconeogênese) em glicose, favorecendo, portanto, o débito hepático de glicose (Carneiro & Junqueira, 2012)

1.3 Estresse de retículo endoplasmático

Foi demonstrada em 2012 que a utilização de um clássico indutor químico de estresse de RE, a tunicamicina, causou elevação das proteínas sinalizadoras do estresse desta organela, e por consequência instalou-se um quadro de esteatose nos modelos animais induzidos à terapêutica. A tunicamicina é um antibiótico nucleosídico de origem microbiana, que pode bloquear a porção N ligada as glicoproteínas, causando acúmulo de proteínas não processadas, ou mal dobradas (Lee *et al.*, 2012).

As proteínas geralmente entram no RE, como polipeptídeos imaturos, sob uma taxa que varia conforme mudanças no programa de diferenciação celular, fatores ambientais e o estado fisiológico da célula. O desequilíbrio entre a oferta de proteínas não dobradas que entram no RE para serem processadas e a capacidade de processamento desta organela, dá o nome a uma situação genérica conhecida como estresse do RE, passível de várias causas. Invariavelmente, a “unfolded protein response” (UPR) se não reestabelecer a homeostase resulta no acúmulo de proteínas não processadas que desencadeia o estresse no RE. O propósito inicial da UPR é adaptar o RE às alterações celulares e restabelecer sua função normal. Quando os esforços em favor da manutenção da função normal da célula entram em exaustão, o estresse do RE dispara o suicídio da célula tipicamente por apoptose, a fim de descartar as células com

disfunção irreversível. Os mecanismos gerais conhecidos até o momento deste complexo mecanismo serão resumidamente descritos a seguir (ver também a figura 1) (Shen *et al.*, 2004; Hollin, 2013).

Quando proteínas desdobradas se acumulam no RE, a resposta imediata é o recrutamento de chaperonas residentes de seus sítios de ligação na membrana do RE. Os ancoradouros das chaperonas são diferentes proteínas transmembrânicas com domínios voltados tanto para o lúmen do RE como para o citosol, e que por isto funcionam como sinalizadores da função reticular para toda a célula. As principais proteínas da membrana do RE envolvidas na indução da UPR são PERK (“PKR-like eukaryotic initiation factor 2 kinase”), ATF6 (“activating transcription factor-6”) e Ire1 (“inositol-requiring enzyme-1”) (Shen *et al.*, 2004). No estado basal, estas três proteínas são inibidas pela ligação da chaperona Grp78 (BIP) (Bertolotti *et al.*, 2000). O recrutamento da Grp78 pelas proteínas desdobradas libera a atividade da PERK, ATF6 e Ire1, que desencadeia eventos distintos que se relacionam inicialmente à adaptação da célula à situação que gerou o distúrbio no funcionamento do RE, mas que também podem desencadear a execução da apoptose, sendo esta a principal forma de morte das células acometidas pelo evento (Hotamisligil, 2010; Hollin, 2013).

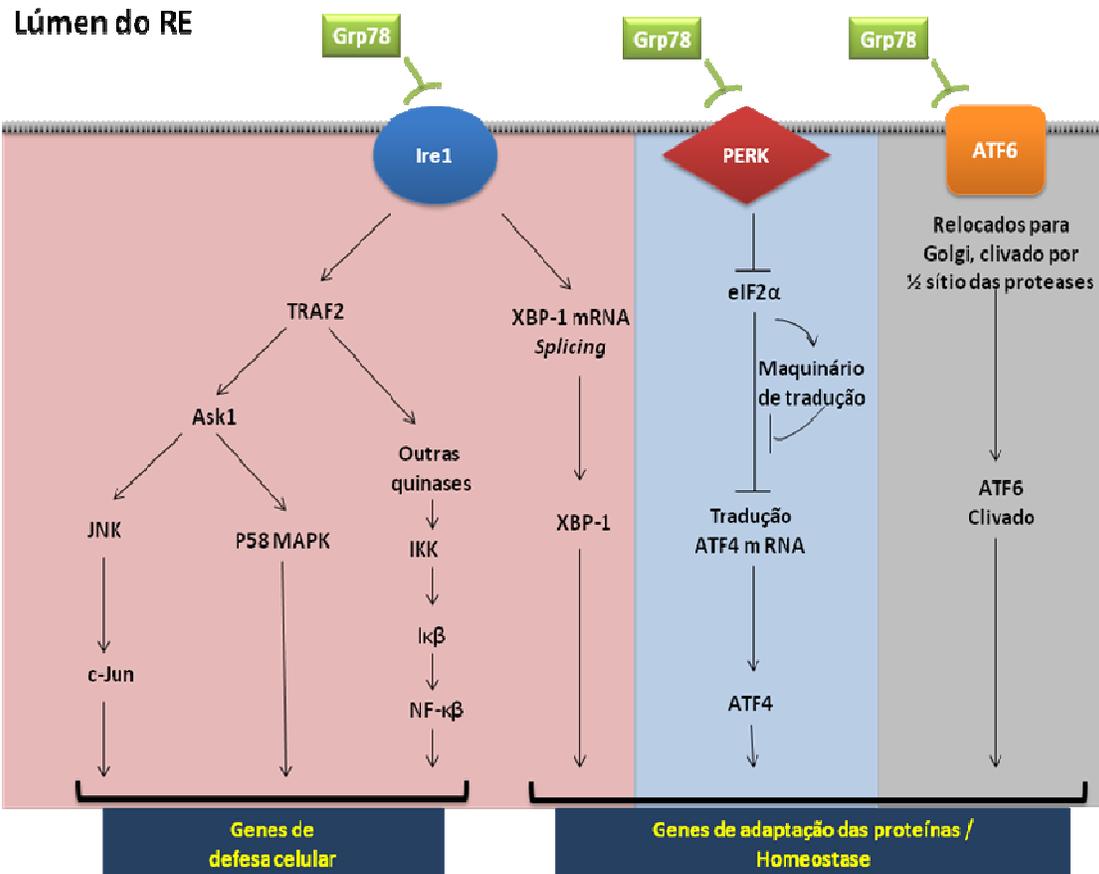


Figura 1: Representação esquemática simplificada da rede de sinalização do estresse de retículo endoplasmático e suas possíveis consequências na adaptação, advinda da exacerbação de proteínas no lúmen desta organela. Adaptado de Zhang et al. 2006, Minamino & Kitakaze 2010, Hotamisligil, 2010.

O ramo da sinalização que se inicia com a ativação da PERK é o primeiro temporalmente disparado pela UPR. A PERK é uma cinase seril-treonil que, quando liberada da Grp78, oligomeriza-se e induz, por autofosforilação, ativação de seu domínio cinase. A proteína-alvo da PERK é o fator de iniciação eIF2 α , que se inativa por fosforilação. Assim, o resultado da ativação da PERK na UPR é a inibição generalizada da taxa de tradução de mRNA e consequente redução do aporte de proteínas no RE. Entretanto, certos mRNAs ganham uma vantagem seletiva para a tradução nestas condições, como o do fator de transcrição ATF4. O ATF4 é um fator de transcrição que modula a expressão de diversos genes relacionados à UPR, dentre eles CHOP e XBP-1 (“X Box Protein 1”). É importante

ressaltar que neste ponto da UPR não há aumento do conteúdo protéico de CHOP, pois a taxa de transcrição celular está inibida (Harding *et al.*, 2001).

Em um segundo momento, a liberação da Grp78 do ATF6 dispara um mecanismo de ativação distinto do anteriormente descrito. O ATF6 desligado da Grp78 transloca-se para o aparato de Golgi, onde proteases residentes o clivam e liberam o fator de transcrição ativo no citossol. Um dos alvos do ATF6 ativo é o gene da XBP-1 (Ye *et al.*, 2000).

A participação imediata da Ire1 na UPR reside em sua atividade endonucleásica e, a exemplo da via da PERK, tem um resultado final reparador que visa adaptar a célula ao acúmulo de proteínas mal-dobradas. Após sua ativação, esta enzima processa uma região do mRNA do fator de transcrição XBP-1 que fora previamente transcrito pela ação do ATF4 e ATF6. Este mRNA processado origina uma proteína com maior atividade transcricional. O XBP-1, num primeiro momento, induz a expressão de genes relacionados ao aumento do processamento de proteínas acumuladas no RE e à ERAD (fator associado ao retículo endoplasmático para degradação de proteínas). A ERAD é um componente celular importante que marca proteínas mal-formadas, este processo ocorre por ubiquitinação, com subsequente degradação da proteína por um complexo conhecido como proteossoma (Rao *et al.*, 2004; Hollin, 2013).

Esta ação do XBP-1 é, em última análise, a derradeira tentativa corretiva da UPR. Se estas ações não garantirem a retomada da homeostasia no RE e se a ativação da Ire1 persistir, o XBP-1 oriundo de seu processamento alternativo induz, tardiamente, a transcrição do gene da proteína p58kip. Esta última exhibe notável atividade inibidora sobre a PERK, liberando, desta forma, a tradução de diversos mRNAs que se acumularam na célula durante a UPR, inclusive o da CHOP. Como será descrito no decorrer deste projeto, CHOP vai desempenhar um papel determinante na apoptose desencadeada pela UPR (Rao *et al.*, 2004).

Outro evento da UPR que resulta na morte celular também decorre da ativação persistente da IRE, mas que é independente de sua atividade endonucleásica. A permanência da IRE-1 em sua forma fosforilada resulta no recrutamento da proteína TRAF2 (“tumor necrosis factor receptor-associated factor 2”) e ASK1

("apoptosis signal regulating kinase 1"). A formação deste complexo resulta na ativação da proteína JNK (Urano et al., 2000). Nos últimos anos, demonstrou-se um papel fundamental da JNK na morte celular, inclusive na que ocorre na célula β pancreática durante a história natural do Diabetes Mellitus tipos 1 e 2 (Ammendrup *et al.*, 2000; Tuncman *et al.*, 2006).

1.4 Apoptose de hepatócitos no portador de diabetes e obesidade

Durante períodos de exacerbação energética, com fontes nutricionais como glicose, ácidos graxos livres ou dietas ricas em gorduras, os hepatócitos estocam estas fontes nutricionais na forma de glicogênio, ou seguem a *de novo* lipogênese. A *de novo* lipogênese é um processo metabólico hepático, cujos hepatócitos criam novos ácidos graxos e por fim são estocados na forma de triglicérides, proteínas de baixíssima densidade (VLDL), ou também podem ser utilizadas na produção de componentes celulares como fosfolipídeos. A esteatose hepática ocorre basicamente quando há um excesso de disponibilidade de ácidos graxos ao fígado, em combinação com resistência periférica a insulina (Matherly & Puri, 2012).

Os ácidos graxos são disponibilizados ao fígado pela não esterificação dos ácidos graxos, pela *de novo* lipogênese ou por fontes dietéticas ricas em gordura. Ao serem absorvidos pelos enterócitos, os ácidos graxos, são esterificados em triglicerídeos, empacotados em quilomicrons e posteriormente liberados a circulação linfática. Cerca de 80% dos triglicerídeos na forma de quilomicron são hidrolizados pela lipoproteína lipase, permitindo que estes sejam acumulados no tecido adiposo, já os triglicérides remanescentes são transportados na forma de quilomicrons remanescentes, e são levados para o fígado após ligação com o receptor da apolipoproteína E. Em pacientes com esteatose hepática foi demonstrado que 59% de gordura hepática é derivada da não esterificação dos ácidos graxos, 26% da *de novo* lipogênese e 15% da própria dieta (Kusminski *et al.*, 2009; Matherly & Puri, 2012).

Os carboidratos também podem influenciar no metabolismo hepático dos ácidos graxos, visto que quando em excesso eles são estocados também na forma de glicogênio, sob influência da insulina, e quando estes estoques são exacerbados há produção de ácidos graxos (Matherly & Puri, 2012).

O tecido adiposo é um tecido metabolicamente ativo que tem efeito profundo sob a resistência periférica à insulina e a esteatose hepática. Foi demonstrado que no tecido adiposo de obesos há um infiltrado de macrófagos, que secretam citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). Esta situação leva a um estado inflamatório crônico, levando a efeitos danosos a tecido periféricos, como o fígado; proporcionando a este danos celulares muitas vezes irreversíveis (Kusminski *et al.*, 2009; Matherly & Puri, 2012).

De uma maneira geral, o acúmulo de gordura hepática presente no paciente diabético e obeso (esteatose hepática não alcoólica) é um evento patológico que resulta em morte celular e injúria hepática, agravado a resistência à insulina neste órgão (Kusminski *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado que a morte de hepatócitos causada por excesso de ácidos graxos é dependente do estresse de RE. Neste sentido, a expressão de CHOP parece ser um evento chave no desencadeamento da apoptose pela UPR (Pfaffenbach *et al.*, 2010).

1.5 Alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) na morte celular

A descoberta do alvo da rapamicina (TOR) está intimamente ligada à descoberta da rapamicina, também conhecida como sirolimo. A partir de uma amostra de solo coletada na Ilha de Páscoa (Rapa Nui), em 1965, foi observada a presença de uma bactéria (*Streptomyces hygroscopicus*). O metabólito secundário produzido pelas bactérias foi identificado pela primeira vez em 1970, a rapamicina. A rapamicina é uma gama-lactona macrocíclica de 31 membros, insolúvel em água, altamente lipossolúvel, tendo fórmula química $C_{51}H_{79}NO_{13}$ e possui peso molecular de 914,2 g/mol. Esta droga possui potente atividade antifúngica, e em

culturas celulares humanas mostrou potente ação antitumoral, mas também atividade imunossupressora (Katzung, 2012; Benjamin *et al.*, 2011).

A rapamicina foi primeiramente utilizada na clínica pelo seu poder antifúngico, no entanto foi observado que ela realizava uma imunossupressão, como efeito adverso, sendo a utilização antifúngica abolida. Anos depois este fármaco foi utilizado como inibidor da rejeição de enxertos, mas também se mostrou um potente inibidor do crescimento de células tumorais. Este droga recebeu aprovação da “food and drug administration” FDA em 1999, para utilização na rejeição renal de pacientes transplantados, já em 2007 e 2009 outras duas indústrias farmacêuticas conseguiram também aprovação para utilização no tratamento de câncer renal avançado. A eficácia da rapamicina contra tumores é dada pelo seu efeito indireto de prevenir o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), que fornece oxigênio e nutrientes as células tumorais (Loewith & Hall, 2011).

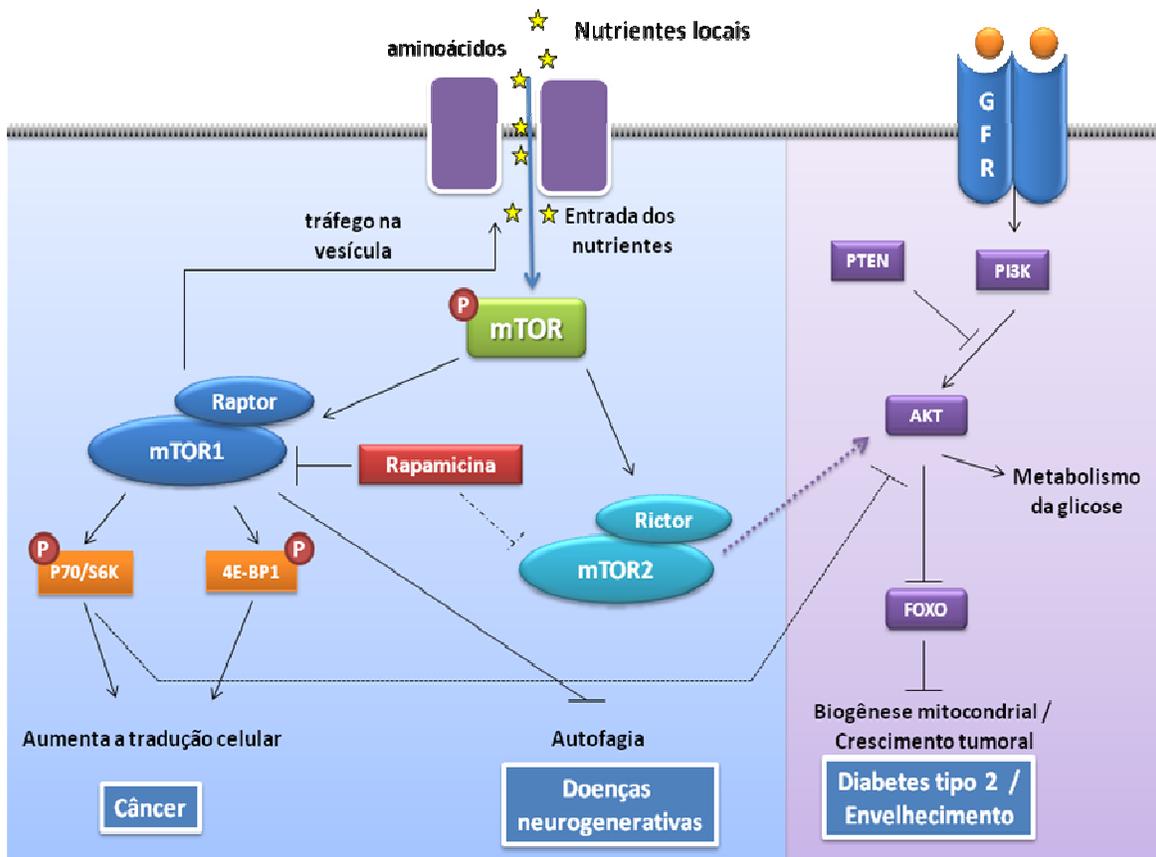


Figura 2: Representação esquemática da sinalização da mTOR, e suas correlações com diversos processos fisiológicos e patológicos. Ativação dos complexos mTOR1/Raptor e mTOR2/Rictor, e o poder inibitório da rapamicina em ambas vias. Adaptado de Goberdhan e Boyd (2009), Rosner *et al.* (2008).

No início da década de 90 a exploração das atividades antifúngicas da rapamicina, trouxe a tona uma gama de mutantes resistentes à ação dela, isto conduziu a identificação de dois complexos formados a partir da ativação da TOR, os complexos TORC1 e TORC2. Em mamíferos o complexo é conhecido como mTOR, e foi descrito apenas em 1994. A descoberta dos mecanismos de ação da rapamicina também foi descrita na década de 90 (Katzung, 2012; Benjamin *et al.*, 2011).

A via de sinalização mTOR/S6K1 transmite a informação da disponibilidade de nutrientes e de insulina para o ambiente intracelular e simultaneamente regula a sinalização da insulina através de um *feedback* negativo. A ativação da mTOR pela insulina ocorre após a ligação da insulina à porção extracelular do IR, o que

acarreta autofosforilação em resíduos de tirosina desta proteína e consequente fosforilação de resíduos de tirosina da proteína ancoradora IRS1. O IRS1 fosforilado liga-se à proteína PI3K, resultando em aumento da produção de PIP3. O acúmulo deste fosfolípido resulta na ativação indireta da AKT que, dentre vários substratos, fosforila e inativa a proteína TSC2, uma proteína ativadora de GTPase, o que resulta no aumento de Rheb ligado a GTP. O complexo Rheb-GTP aumenta a atividade do complexo TORC1 que, entre outras proteínas, é formado pela mTOR e pela Raptor. A Ativação do TORC1 fosforila a proteína S6K1 e o fator de alongação 4E-BP1, resultando assim no aumento generalizado da síntese protéica celular. O complexo TORC1 é conhecido como o complexo da mTOR sensível à rapamicina, pois a atividade cinase deste complexo protéico é reduzida na presença desta droga (Taniguchi *et al.*, 2006).

A mTOR forma ainda um complexo protéico cuja atividade também é inibida pela rapamicina denominado TORC2. Canonicamente, acredita-se que o TORC2, formado pela Rictor, mTOR e outras proteínas, catalisa a fosforilação em serina e consequente ativação completa da AKT, aumentando desta maneira a sinalização da insulina (Hresko & Mueckler, 2005). Ao contrário desta regulação positiva da sinalização da insulina pelo complexo TORC2, a ativação exacerbada do TORC1 resulta em uma regulação negativa da sinalização da insulina (Tremblay *et al.*, 2005). Outros trabalhos ainda mostram que a expressão de Raptor sem função causa o aumento da sensibilidade à insulina no fígado (Koketsu *et al.*, 2008).

1.6 mTOR, estresse de RE e a morte de hepatócitos

A similaridade entre a ativação do complexo mTORC1 e da UPR é dada pelo fato de ambas serem sensíveis a variações nutricionais, fatores de crescimento e hipóxia. Em especial o status nutricional elevado, observado na obesidade, é provavelmente dado por mudanças na composição da membrana do RE, fluidez e concomitantemente a inibição da SERCA2b observado principalmente em células β pancreáticas e em fígado de camundongos. Indica-se até o presente que possivelmente o complexo mTORC1/Raptor induz a inicialização da UPR, mas

não se sabe se este fenômeno é dependente de classes diferentes de nutrientes. (Appenzeller-Herzog & Hall, 2012).

Além de seu papel essencial na resistência à insulina hepática, a via mTOR/S6K1 também parece estar relacionada à morte de hepatócitos por mecanismos ainda desconhecidos. Neste sentido, a deleção do gene que codifica para a S6K1 diminui a apoptose em hepatócitos (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2009).

Estudos ainda sugerem um papel importante na ativação da AKT, no entanto esta ativação ou inibição da AKT parece ser bifásica. Inicialmente o estímulo do estresse de RE leva a estimulação da AKT, proporcionando a ela um papel de “quinase salvadora”. Este evento levaria a ativação do complexo mTORC1, que em longo tempo de injúria inibiria a AKT, ativando a via RE – JNK “morte quinase”. Esta relação bifásica entre a AKT causada pelo estresse de RE parece ser um determinante crucial para a apoptose determinada pela UPR, porque o complexo mTORC2/Rictor participa da ativação da AKT. Diferente das evidências ainda não totalmente elucidadas quanto a importância do complexo mTOR1, o complexo mTOR2 ainda é muito menos explorado. No entanto, a indução farmacológica do estresse de RE leva a catalização da fosforilação da GSK3 β , aumentando a atividade do mTOR2, que por consequência suprime a ativação da AKT (Appenzeller-Herzog & Hall, 2012).

Deste modo, a nossa hipótese foi avaliar se a mTOR, que é comprovadamente sensível a nutrientes, teria correlação com este desbalanço gerado pelo excesso de nutrientes, de modo a gerar a UPR e consequentemente a apoptose.

2- OBJETIVOS

Geral

Avaliar a relação entre ativação da mTOR e indução de UPR e apoptose por elevadas concentrações de ácidos graxos, glicose ou frutose em hepatócitos.

Específicos

- ❖ Investigar a relação temporal entre apoptose e ativação da via da mTOR e da UPR em hepatócitos expostos a altas concentrações de ácido palmítico.
- ❖ Investigar a relação entre apoptose e ativação da via da mTOR e da UPR em hepatócitos expostos a altas concentrações de glicose.
- ❖ Investigar a relação entre apoptose e ativação da via da mTOR e da UPR em hepatócitos expostos a altas concentrações de frutose.
- ❖ Avaliar a repercussão do bloqueio da mTOR com rapamicina para os complexos mTOR1/Raptor ou mTORC2/Rictor na ativação da apoptose em hepatócitos expostos a altas concentrações de ácido palmítico, glicose ou frutose.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo e tratamento de células HepG2

Linhagem de células HepG2 (derivadas de hepatoma humano) foram adquiridas no Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (CR 0294), esta linhagem foi mantida em meio de cultura (DMEM, acrescido de 5,6 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina) em atmosfera com 5% CO₂ a 37°C. As células HepG2 foram mantidas em garrafas de plástico de 25 cm² (Sarstedt) até atingirem confluência próxima a 90%, com isso elas foram repicadas ou tratadas para posteriores experimentos.

Para o tratamento com o palmitato foi utilizada uma solução de albumina livre de ácidos graxos (BSA) (A6003-Sigma) 12% (0,4g de 3,33 ml de DMEM) e uma solução de ácido palmítico 20 mM (0,01g de ácido palmítico para 2 ml de álcool absoluto 99%) ou álcool absoluto 99% (controle). Para pré-conjugarmos utilizamos 211,25 µl de DMEM, 133,3 µl de BSA com DMEM e palmitato ou álcool (controle). Esperamos 10 minutos à temperatura ambiente e aplicamos o volume total de 393 µl da mistura nas células que já continham 1,6 ml de DMEM sem soro. Já para o tratamento com glicose ou frutose foi utilizado meio DMEM contendo 5.6 mM de glicose em sua composição, e foi incluído a este meio albumina numa concentração final de 2%. A glicose ou a frutose foram também inseridas em tratamentos com concentrações de 33.3 mM ou 4.5 mM, respectivamente; É importante salientar que neste meio, que já continha os 5.6 mM de glicose que é a composição básica deste meio de cultura utilizado em nossos experimentos.

Utilizamos ainda ferramentas farmacológicas que interagem diretamente com nossas vias. A rapamicina (C₅₁H₇₉NO₁₃ - 1292 - TOCRIS) foi diluída em etanol 100% e utilizada nas concentrações de 10, 100 e 500 nM, esta foi incorporada ao tratamento com palmitato e permaneceu no meio de cultura até a finalização da incubação. AKT inhibitor 124005 (C₃₀H₅₈O₁₀ - 1701-1 - BioVision) foi utilizado na concentração de 100 nM, este fármaco foi incubado em DMEM de albumina (BSA) 1% por 15 minutos e removidos posteriormente. Ainda utilizamos o LY 294004 (C₁₉H₁₇NO₃ - 1130 - TOCRIS) e a wortimanina (C₂₃H₂₄O₈ - W1628 - Sigma) nas

concentrações de 100 μ M e 1 nM, respectivamente, também num protocolo de pré-tratamento de 15 minutos ao tratamento do palmitato em DMEM com 1% de BSA.

Imunoblotting

As células HepG2 foram processadas em tampão de extração (SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10mM, ortovanalato de sódio 100mM) incubadas à 96°C por 10 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas para remoção do material insolúvel. Posteriormente parte do sobrenadante do homogeneizado foi utilizado para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA), e o restante foi acrescido de tampão *Laemmli* e fracionado em SDS-PAGE (2,6%C e 8-12%T) em aparelho para minigel (*Mini-Protein, Bio-Rad*). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram bloqueadas com uma solução contendo BSA 5%, Tris-Base, NaCl e Tween-20 por duas horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos da empresa Santa Cruz contra GAPDH (SC-25778), p-AKT1/2/3 (SC-7985-R) (Ser-473), AKT (SC-8312), GADD34 (SC-825), p-PERK (SC-32577) (Thr-981), ATF4 (SC-200), CHOP (SC-575), TRB3 (SC-34215), EIF2 α (SC-133132), p-EIF2 α (SC-293100) (Ser-49), p-p70S6K (SC-11759) (Thr-389), p-4E-BP1 (SC-12884) (Ser 65/Thr70); da *Cell Signaling* contra BiP (#3183-Cell Signaling), p-mTOR (#2971) (Ser-2448), Raptor (#2280), Rictor (#9476); da *BioLegend* contra anti-Xbp-1 (619502-BioLegend) e por fim contra ATF6 (IMG-273-IMGENEX) da IMGENEX, por quatro horas à temperatura ambiente. Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, USA). Antes da detecção, as membranas foram incubadas por um minuto com uma solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H₂O₂ e, então, expostas durante tempos variados a filmes de raio-X. Depois de revelados, esses

filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo software Scion Image (Scioncorp, NIH, USA).

Análise de fragmentação de DNA

Células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços (1×10^5 células / poço) e submetidas ao tratamento com ácido graxo como descrito anteriormente. Após estes procedimentos, as células foram removidas dos poços. Em seguida, as células foram transferidas para tubos contendo 1,0 mL de PBS a 4° C e centrifugadas a 1.000xg por 10 min. Após centrifugação, o pellet de células foi diluído em 1 mL de PBS e colocadas em tubos de polietileno. A fragmentação de DNA foi avaliada utilizando citometria de fluxo de acordo com o método previamente descrito (Nicoletti-Carvalho, 2007). As células contidas em 1 mL de suspensão em PBS foram centrifugadas e o precipitado suspenso em 300 µl de uma solução isotônica de iodeto de propídeo (0,008 mg/mL de iodeto de propídeo, 10 mg/mL de citrato de sódio, 10 µL/mL de Triton X-100 a 0,1%). Em seguida, as amostras foram incubadas “over-night” a 4°C por 12 horas e analisadas no citômetro do fluxo FACS Scalibur. Os histogramas resultantes das análises das amostras foram analisados através do *software Cell Quest Pro*.

Coloração de Oil Red O

Células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços (4×10^5 células / poço) e submetidas a diversos tratamentos: controle, palmitato (0,2 mM), palmitato (0,2 mM) com rapamicina (500 nM) ou palmitato (0,2 mM) com “AKT inhibitor” (100 nM). Após o tratamento o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas por 3 vezes com Krebs gelado, após este procedimento as células foram fixadas por uma solução de paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após a fixação, estas células foram lavadas mais 3 vezes com Krebs gelado e incubadas com o corante “Oil Red O” (solução de trabalho: 3 mg/mL de “Oil Red O” dissolvido em 60% de isopropanol) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as células foram

lavadas por 3 vezes novamente com Krebs gelado. As imagens foram realizadas no aumento de 200 vezes.

Para quantificação do conteúdo lipídico utilizamos 1 mL de isopropanol em cada poço e após 5 minutos de agitação a temperatura ambiente, este conteúdo foi lido na absorvância de 510 nm no espectrofotômetro (Yao et al., 2011; Lee et al., 2012).

Silenciamento gênico (RNA de interferência)

A tecnologia do RNA de interferência (siRNA) consiste na utilização de moléculas de RNA exógenas complementares ao mRNA alvo, cuja interação inibe a tradução completa deste último, alterando o fenótipo celular. Esta interação é dada através da interação deste RNA exógeno com um complexo protéico denominado RISC, do inglês *RNA induced silencing complex*. Este complexo servirá como guia para que o RISC encontre fitas complementares de RNA mensageiros específicos, as quais serão alvo da ação do silenciamento gênico. Para estes experimentos utilizamos RNA de interferência para os mRNAs que codificam as proteínas Raptor (sc-44069) e Rictor (sc-61478) (*Santa Cruz Biotechnology*). Os siRNAs foram previamente misturados ao reagente lipídico lipofectamina 2000 (*Life Technologies* - 11668-027) que forma lipossomas que penetram na células, perfazendo a transfecção. O “scrambled” (sc-37007), uma sequência de RNA que sabidamente não se liga a nenhuma sequência de RNA, foi utilizada como controle da transfecção. A concentração final dos siRNA foi de 80 nM, e a de lipofectamina foi de 2,5µl/ml. A transfecção foi realizada em meio sem soro e sem antibiótico (OPTI-MEM, *Life Technologies* - 31985088), por 7 horas a 37°C.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA de uma via com

pós-teste de Tukey, ou duas vias com pós-teste de *Student*, quando apropriado). Também foi realizado, quando adequado, o teste de Student. Para os resultados foram adotados 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

Avaliação dos efeitos do palmitato nas células de hepatoma

Iniciamos nossa investigação com um experimento curso temporal, que englobou todos os tempos de tratamento com ácido palmítico. Observamos por citometria de fluxo a fragmentação de DNA, de células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato marcadas com iodeto de propídeo, e concluímos que a apoptose é iniciada em 6 horas de exposição ao palmitato tendo seu pico máximo em 12 horas (figura 3). Estes dados nos mostraram que a morte celular é dependente do tempo de tratamento, e que em 6 e 12 horas a apoptose elava-se gradativamente (figura 2).

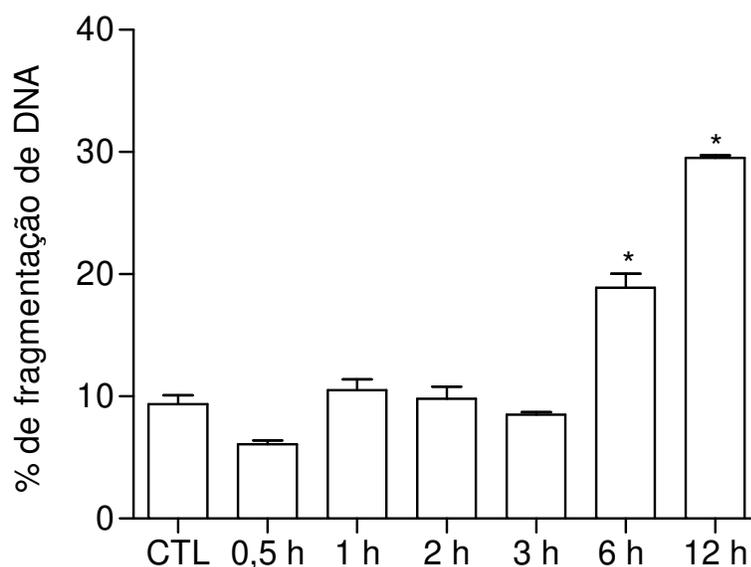


Figura 3: Experimento curso temporal de células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato em 0,5, 1, 2, 3, 6 e 12 horas. Estas células foram tratadas e posteriormente incubadas com solução contendo iodeto de propídeo “over night”, para posterior averiguação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo (n=6) (P<0,05).

A avaliação de proteínas envolvidas com a via de sinalização do estresse de RE e também da mTOR em resposta ao palmitato foi dividida em duas etapas: experimento curso temporal “curto” e “longo”.

Ao avaliarmos a apoptose num curto espaço de tempo, observamos que proteínas características da ativação do estresse de RE não tem sua expressão modulada. Estes resultados podem ser observados pela expressão de ATF4 (figura 4 A), CHOP (figura 4 B), ATF6 (figura 4 D) e na fosforilação da PERK (figura 4 D).

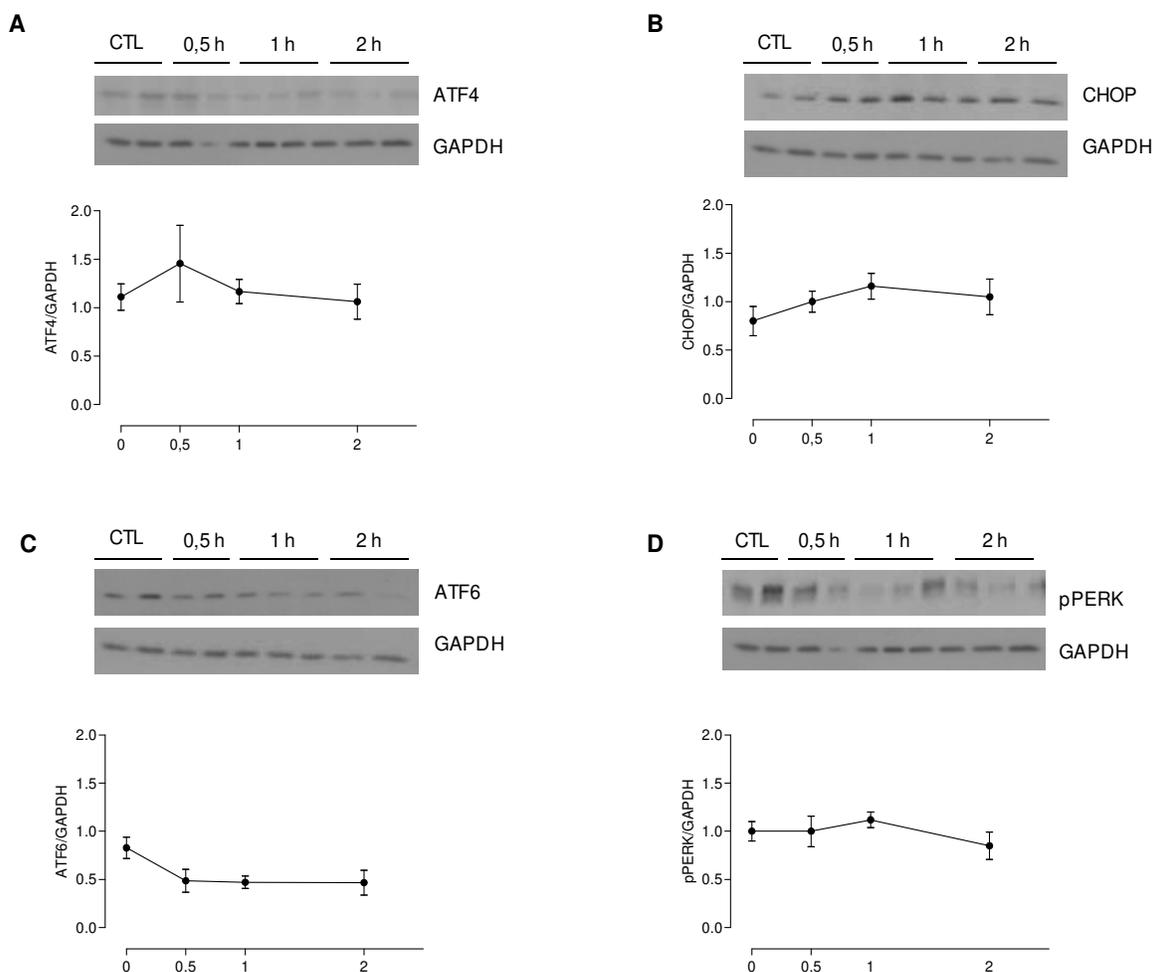


Figura 4: Experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas) de proteínas chave nas vias de sinalização do estresse de RE, analisadas por “Western blot”, após tratamento com palmitato na concentração de 200 μ M. (A) ATF4 (n=9), (B) CHOP (n=5), (C) ATF6 (n=6-7) e (D) pPERK (n=5).

As investigações seguiram para avaliação do efeito do tratamento com o ácido palmítico em tempos longos. Checamos várias proteínas envolvidas com o estresse de RE, e concluímos que assim como a apoptose, observada na figura 3,

a ativação do estresse de RE é dependente do tempo de exposição ao ácido graxo. Desde modo não só a expressão de ATF4 (figura 5 A) e ATF6 (figura 5 C) aumentam em tempos tardios de experimentação, mas também a de CHOP (figura 5 B). Esta proteína merece uma atenção em especial por ser extremamente conhecida como a proteína “efetora da morte celular” quando esta é deflagrada via estresse de RE (Hotamisligil, 2010). A elevação na expressão da CHOP gradativamente junto a apoptose, da figura 2, nos mostrou que o ácido graxo saturado de cadeia longa proporciona morte a linhagem de hepatoma, e esta morte é possivelmente dada por ativação do estresse de RE. A fosforilação da PERK também é observada em tempos tardios do tratamento (figura 5 D).

O TBR3 também aumenta em expressão de modo gradual, principalmente em 12 horas de tratamento (figura 5 E). Este evento fortalece nossa hipótese, visto que esta proteína está relacionada a uma regulação negativa da AKT, correlacionando-se diretamente a resistência periférica a insulina e aos eventos correlacionados, como a esteatose hepática não alcoólica, por exemplo.

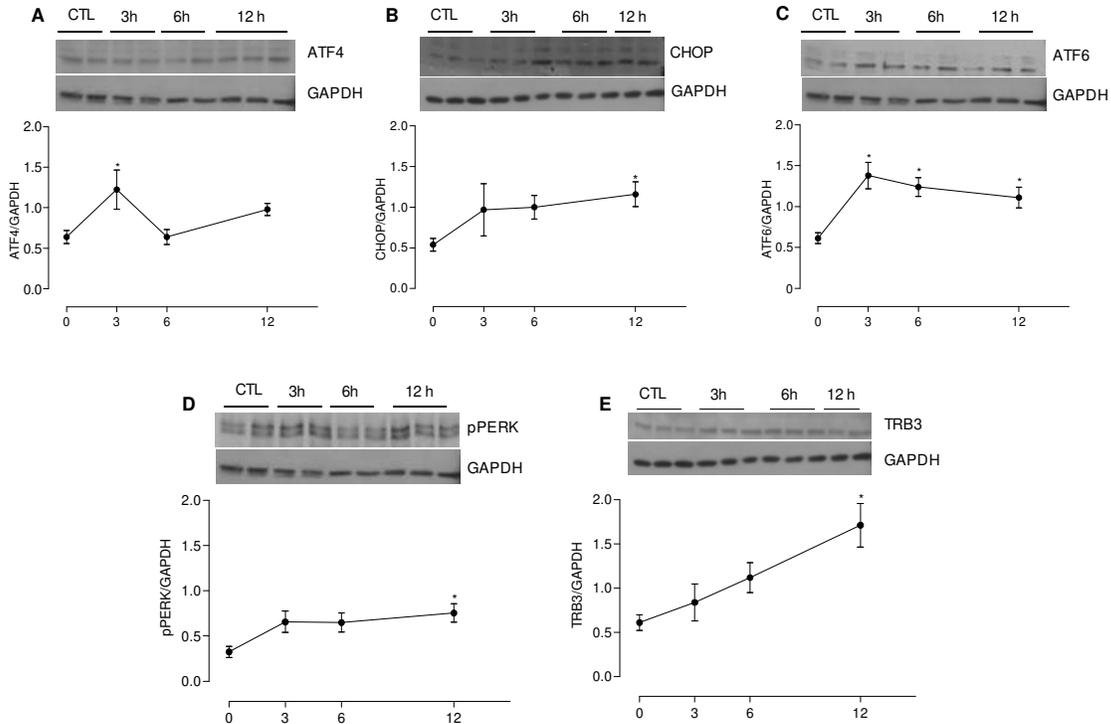


Figura 5: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) de proteínas chave nas vias de sinalização do estresse de RE analisadas por “Western blot”, após tratamento com palmitato na concentração de 200 μ M. (A) ATF4 (n=5), (B) CHOP (n=5), (C) ATF6 (n=6-7), (D) pPERK (Thr-981) (n=8) e (E) TRB3 (n=5) *(P<0.05).

Experimentalmente da mesma forma, prosseguimos avaliando proteínas reguladas pela ativação da mTOR, neste caso proteínas relacionadas a sinais pós-transduccionais do complexo mTOR1/Raptor. No experimento com tempo curto, avaliamos a fosforilação das proteínas P70 e 4EBP1, mas não observamos nenhuma alteração (figura 6 A e B). Estas proteínas também foram avaliadas nos tempos longos, e a fosforilação destas proteínas manteve-se inalterada (figura 7 A e B).

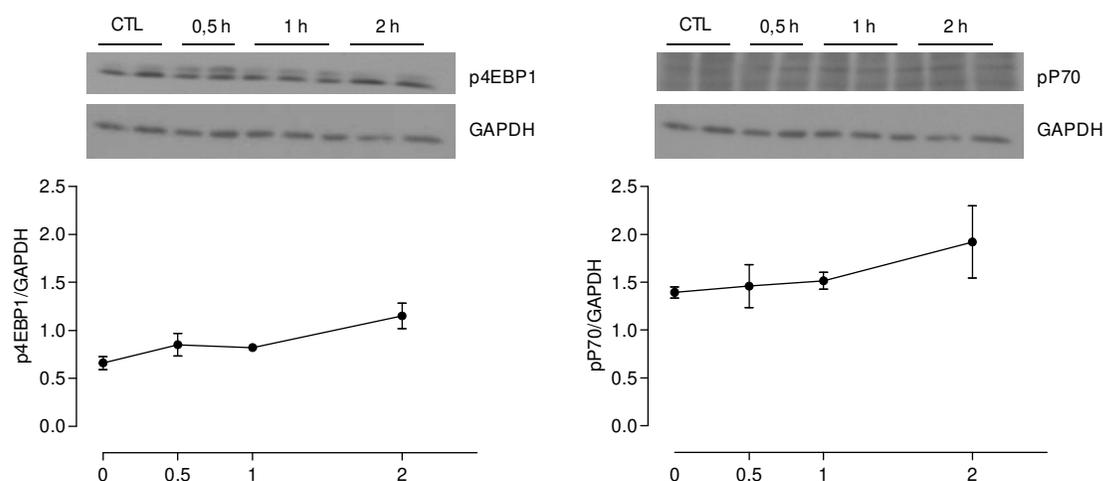


Figura 6: Análise de proteínas envolvidas com a atividade pós-traducional do complexo mTOR1/Raptor num experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas), tratadas com palmitato (200 μ M) e analisadas por “Western blot”. (A) p4EBP1 (Ser 65/Thr70) (n=5) e (B) pP70 (Thr-389) (n=5).

Em seguida, decidimos observar se a fosforilação do complexo mTOR total estava alterada no tempo longo, visto que a apoptose e o estresse de RE estavam alterados neste instante. Como visto na figura 7 C, a fosforilação da mTOR está aumentada em 6 e 12 horas de tratamento com o ácido palmítico, mostrando-nos que há alguma atividade possivelmente correlata com os outros eventos observados.

Investindo na possível correlação entre a apoptose causada pelo palmitato e a ativação da mTOR, decidimos utilizar a rapamicina, que é um fármaco classicamente descrito por inibir o complexo mTOR1/Raptor, no entanto a especificidade deste fármaco é dependente da dose e do tempo de tratamento.

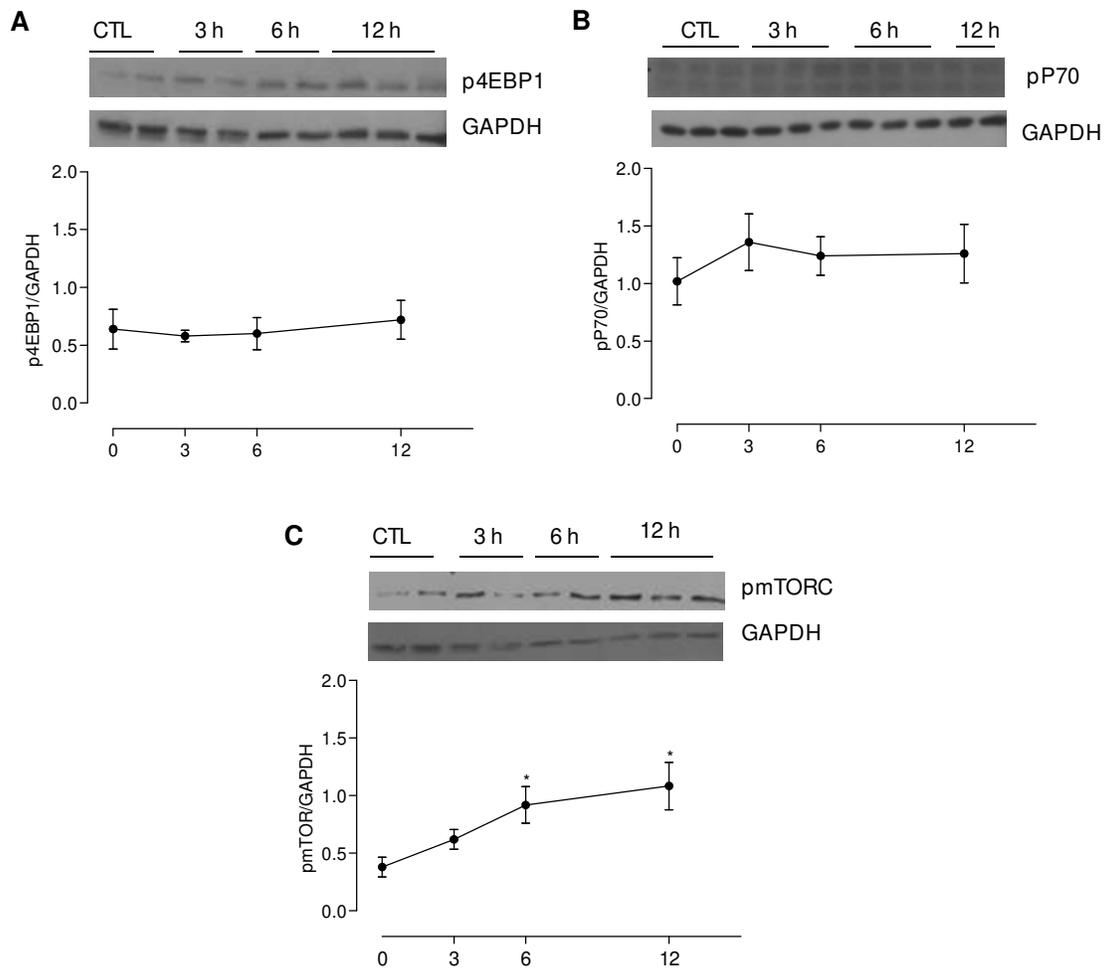


Figura 7: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) de proteínas chave envolvidas com a atividade com o complexo mTOR1/Raptor (A) (B), e da própria mTOR total (C). Tratamento realizado com 200 μ M de ácido palmítico, com análise realizada através de “Western blot”. (A) p4EBP1 (Ser 65/Thr70) (n=5), (B) pP70 (Thr-389) (n=5) e (C) pmTOR (Ser-2448) (n=5) *(P<0.05).

Utilizamos três doses crescentes de rapamicina: 10, 100 e 500 nM, esta foi incorporada ao tratamento com o palmitato pelo período de 12 horas, e por fim avaliamos a morte celular (fragmentação de DNA).

Observamos que o palmitato causou morte celular, no entanto ela foi apenas inibida ao utilizarmos a dose de 500 nM de rapamicina (figura 8). Como dito anteriormente a rapamicina é classicamente descrita como droga inibidora do complexo mTOR1/Raptor, mas esta especificidade é dada apenas com doses de

até 10 nM. Estes resultados nos mostraram que o complexo mTOR2/Rictor deve estar envolvido com a apoptose causada pelo palmitato, porque apenas com 500 nM esta morte foi inibida.

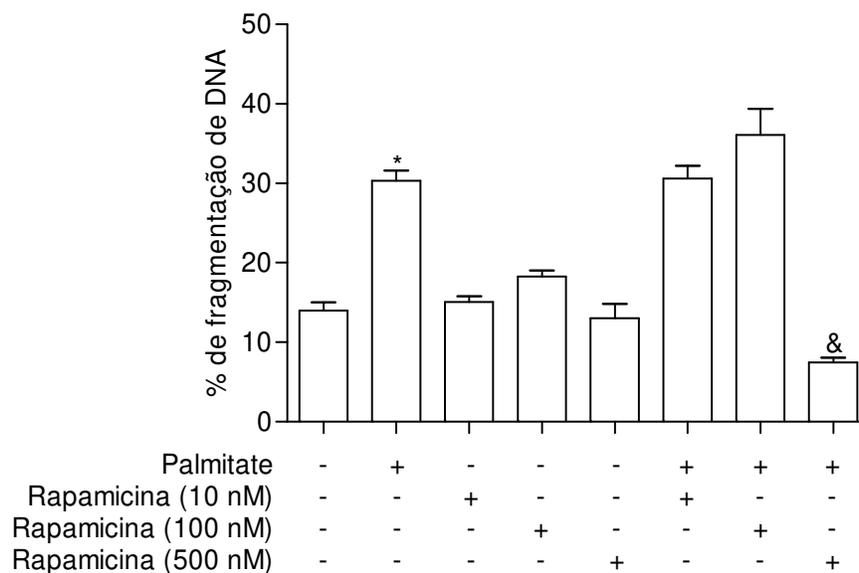


Figura 8: Linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato e/ou rapamicina em diferentes doses (10, 100 ou 500 nM) por 12 horas (n=6), com posterior incubação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo da fragmentação de DNA *Controle VS. Palmitato, & Palmitato VS. Palmitato com Rapamicina (P<0,05).

Ao observarmos que a apoptose foi inibida com 500 nM de rapamicina, decidimos avaliar se as proteínas envolvidas com o estresse de RE retomariam aos seus valores basais. Tratamos as células HepG2 com o palmitato ou com palmitato e rapamicina, e verificamos se o uso de rapamicina reduz o aumento induzido por palmitato de ATF4 (figura 9 A), CHOP (figura 9 B), ATF6 (figura 9 C) e pPERK (figura 9 D). Estes resultados mostram que a rapamicina foi capaz de reverter o estresse de RE gerado pelo palmitato. A GADD34 é uma proteína contra-regulatória do estresse de RE, e o tratamento com palmitato tende a diminuir sua expressão, enquanto que a rapamicina reverte este efeito (figura 9 E).

Mesmo sem nenhuma alteração estatisticamente detectável na fosforilação da proteína P70, avaliamos se a rapamicina exerce algum efeito nela. A fosforilação da P70 é diminuída ao incorporarmos a rapamicina no tratamento (figura 9 F), mostrando-nos que esta droga provavelmente exerce um papel inibidor também no complexo mTOR1/Raptor. Frente à tendência de elevação da TRB3 ao tratamento com palmitato, a rapamicina foi capaz de reduzir esta tendência (figura 9 G).

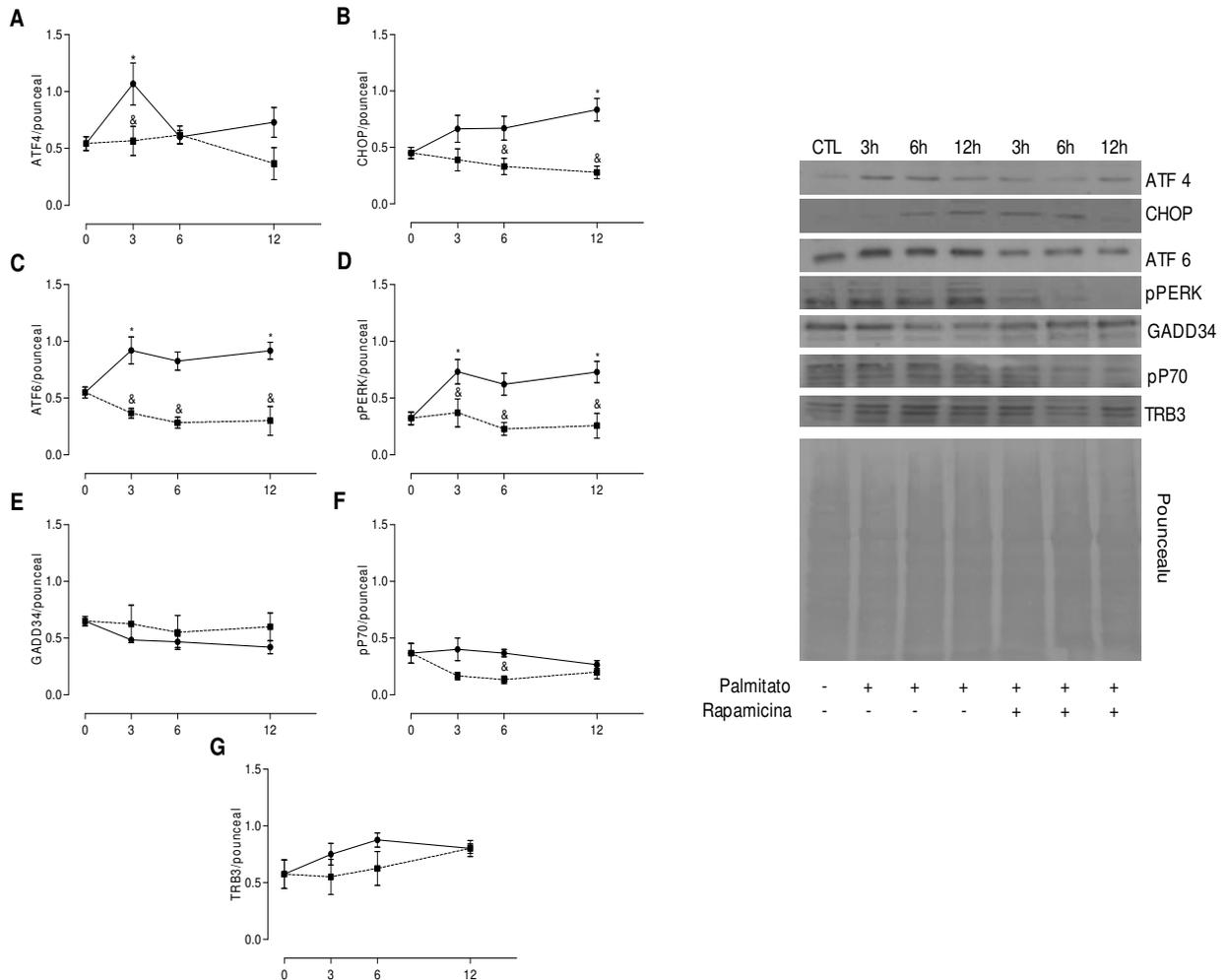


Figura 9: Experimento curso temporal longo (3, 6 e 12 horas) com células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato e/ou rapamicina (500 nM). Avaliação de proteínas envolvidas com sinalização do estresse de RE e da mTOR, normalizadas pelo “pounceau”. (A) ATF4 (n=7), (B) CHOP (n=11-16), (C) ATF6 (n=6-10), (D) pPERK (Thr-981) (n=6-10), (E) GADD34 (n=4-6), pP70 (Thr-389) (n=4) e TRB3 (n=4) (linhas contínuas para amostras tratadas com palmitato, e linha pontilhadas foram tratadas com palmitato e rapamicina) * (ANOVA com pós teste de Tukey para amostras comparadas entre o controle e as amostras tratadas com palmitato) e & (“Test T student” quando comparou-se amostras do mesmo tempo tratadas com palmitato e palmitato com rapamicina) (P<0.05).

Buscamos ainda avaliar por microscopia o conteúdo lipídico pós-tratamento com palmitato, ou palmitato com rapamicina em 12 horas de experimento. Utilizamos o “oil red O”, um corante solúvel em água utilizado para coloração de lipídeos, e observamos que o conteúdo lipídico das células tratadas com palmitato é visualmente maior que o controle (figura 10 A e B), no entanto, ao incorporarmos

ao tratamento a rapamicina (500 nM) este conteúdo mantém-se tal qual o tratamento apenas com palmitato (figura 10 B e C). Após a microscopia quantificamos o conteúdo lipídico utilizando 1 mL de isopropanol em cada poço. Este resultado nos confirmou que independente do tratamento com rapamicina, o palmitato exerce um aumento do conteúdo lipídico, e não é pela diminuição deste conteúdo que os efeitos da apoptose e do estresse de RE são inibidos (figura 10 D).

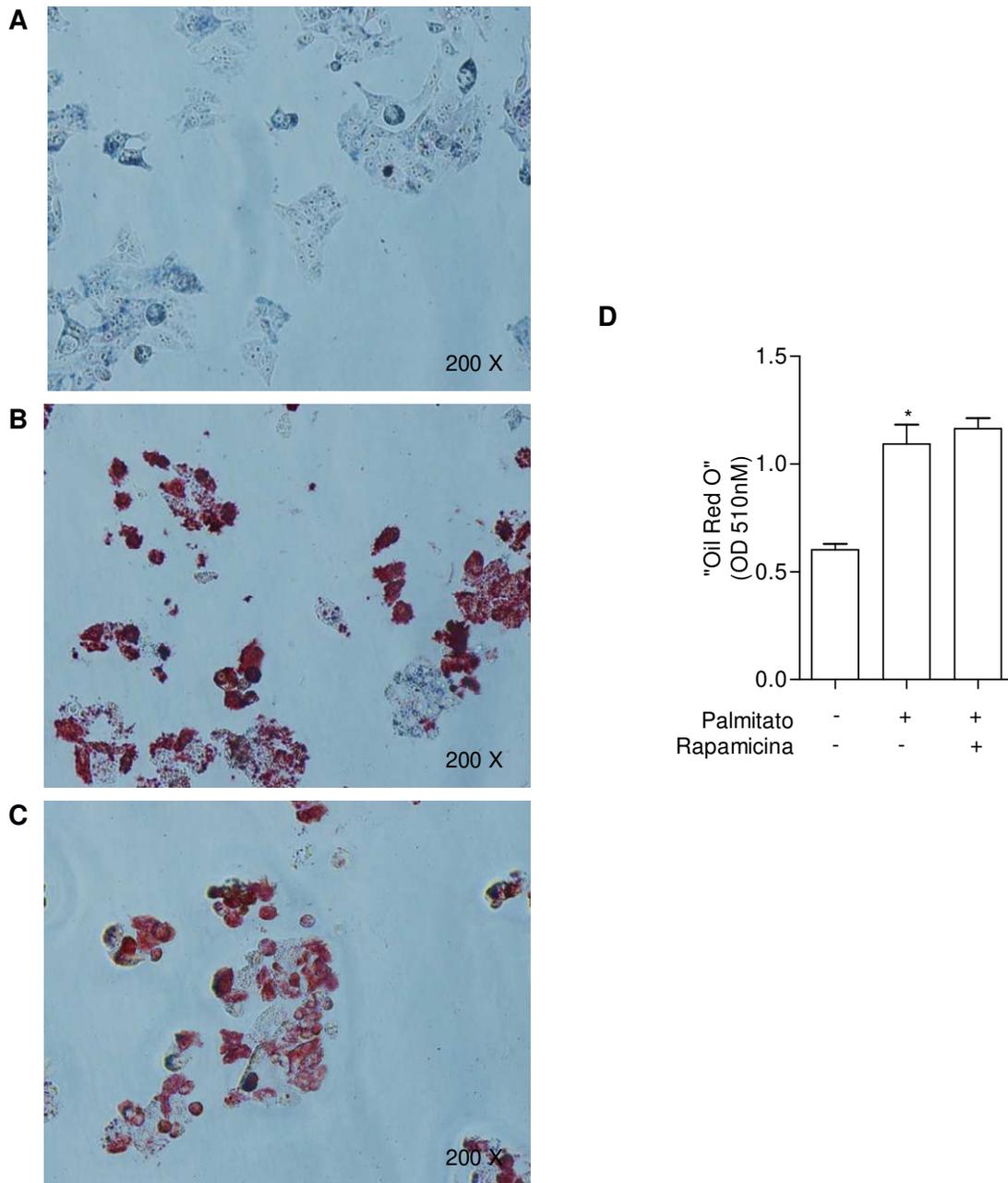


Figura 10: Coloração de "Oil Red O" em células de hepatoma tratados com palmitato e/ou rapamicina. (A) Controle experimental, (B) células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas e (C) células HepG2 tratadas com palmitato e rapamicina (500 nM) por 12 horas. (D) Quantificação do conteúdo lipídico pós-microscopia das células (n=6) foi realizada por espectrofotometria em 510 nm *(P<0,05).

Como os resultados anteriores de que a apoptose e o estresse de RE foram inibidos apenas com uma dose de rapamicina, sugerindo participação da TORC2

buscamos avaliar a fosforilação da AKT, visto que esta proteína é um alvo do TORC2.

Observamos que o tratamento com o palmitato gera uma elevação na fosforilação da AKT em 1 hora e 2 horas de exposição (figura 11 A), momento que antecede os efeitos danosos de apoptose e estresse de RE. Já em tempos experimentais maiores a fosforilação da AKT é diminuída quando comparada ao controle (6 e 12 horas), este fato coincide com momentos de maior atividade do estresse de RE e da morte celular (figura 11 B).

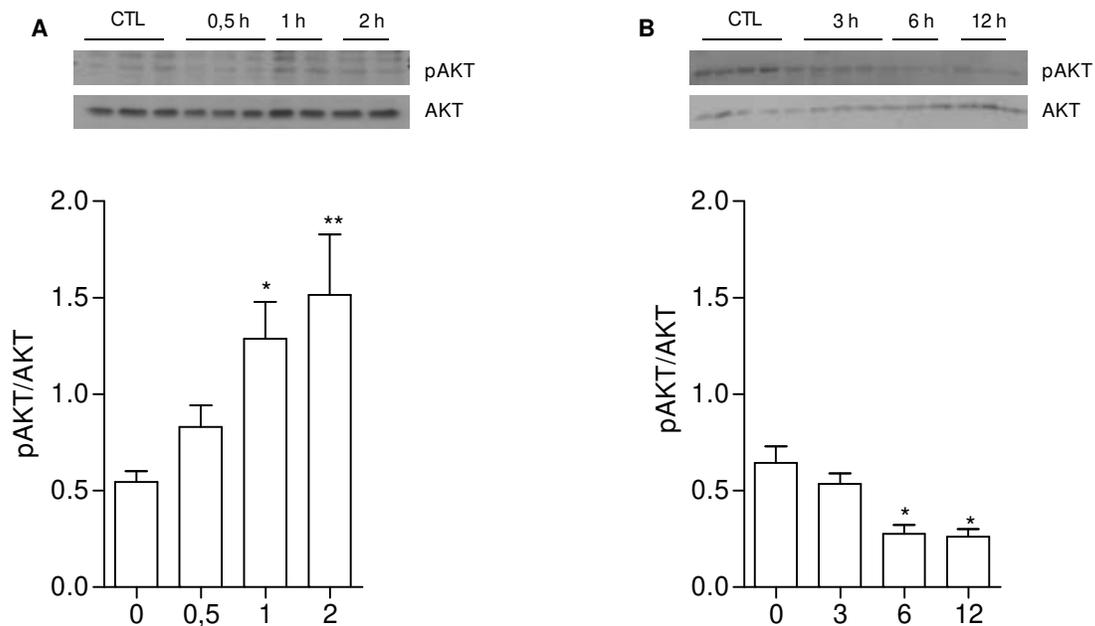


Figura 11: Experimento curso temporal curto (0,5, 1 e 2 horas) (A) e longo (3, 6 e 12 horas) (B), para AKT fosforilada no resíduo serina 473, normalizada pela AKT total. As células de hepatoma humano (HepG2) foram tratadas com 200 μ M de palmitato durante todo o tempo de experimentação, e a análise de fosforilação da AKT foi dada por “Western blot”. pAKT (Ser-473) (n=6-10) *(P<0.05).

Ao observarmos os dados da figura anterior, buscamos drogas que conhecidamente exercessem inibição na AKT. Utilizamos a wortimanina, um metabólito esteroide do fungo *Penicillium funiculosum* que é um inibidor covalente

da PI3 quinase; o LY, um inibidor reversível também da PI3 quinase; e o “AKT inibitor”, um inibidor seletivo da AKT. Tratamos as células com doses e protocolos já descritos na literatura que se assemelham em um aspecto: a pré-incubação das células por 15 minutos prévios a qualquer outro tratamento.

A inibição irreversível ou reversível da PI3 quinase com wortimanina e LY, respectivamente, não diminuiu a apoptose causada pelo palmitato (figura 12 A e B). O efeito inibitório da apoptose só foi observado com a utilização do “AKT inibitor” (figura 12 C), nos mostrando que existe um efeito ligado diretamente a atividade da AKT, e não a PI3 quinase.

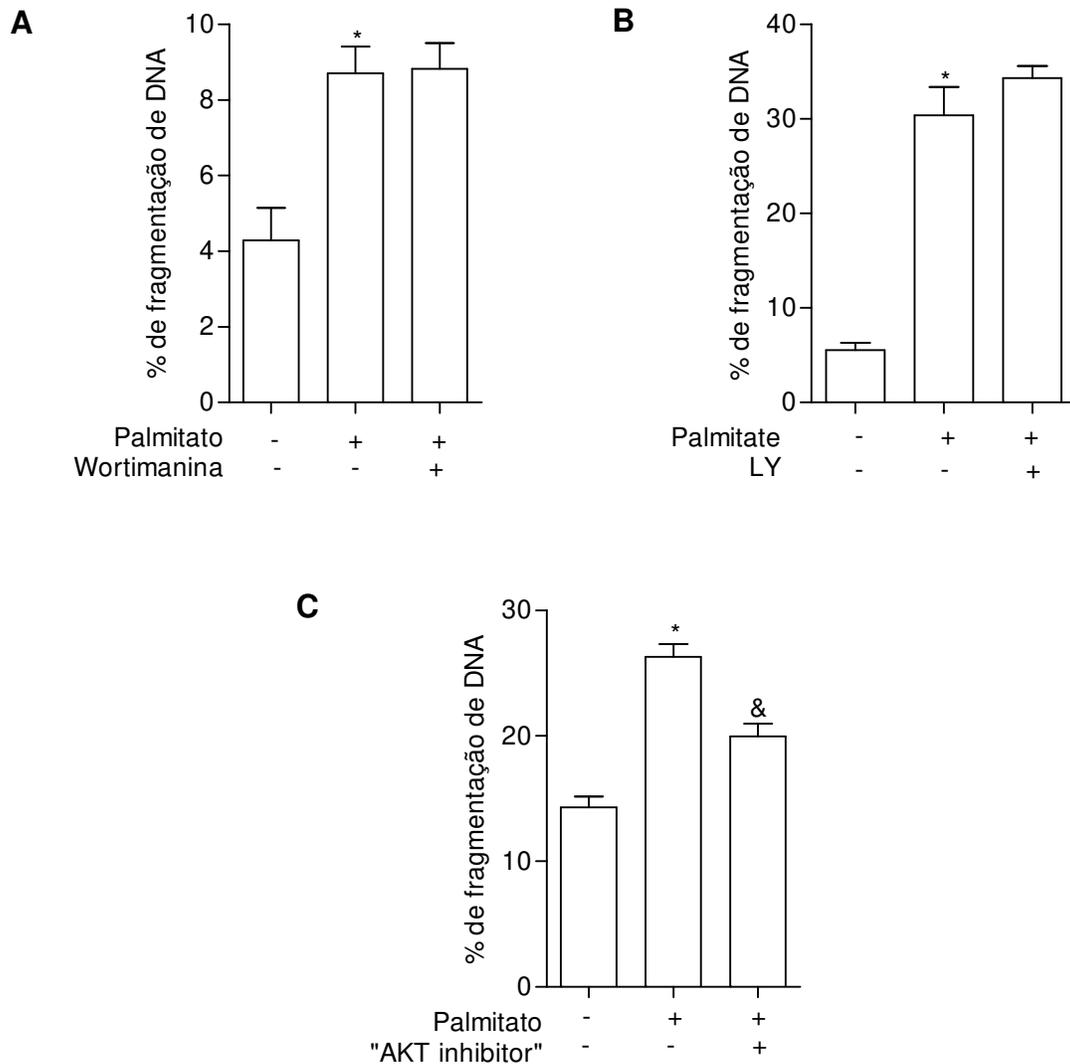


Figura 12: Células HepG2 tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas e/ou wortimanina (1nM), LY (100uM), "AKT inhibitor" (100 nM) em DMEM com 1% de albumina (n=6). Estas drogas foram incubadas por 15 minutos e removidas do meio para posterior incubação com palmitato. A análise de fragmentação de DNA foi dada com incubação "over night", numa solução contendo iodeto de propídeo. *Controle VS. Palmitato, & Palmitato VS. Palmitato com "AKT inhibitor" (P<0,05).

A averiguação da fosforilação da AKT por "Western blot" quanto ao tratamento com ou sem "AKT inhibitor" data que em 1 hora de tratamento, o aumento é inibido (figura 13 A), e em 12 horas não há alteração da fosforilação

quando comparamos as células tratadas com palmitato ou palmitato e “AKT inibidor” (figura 13 B).

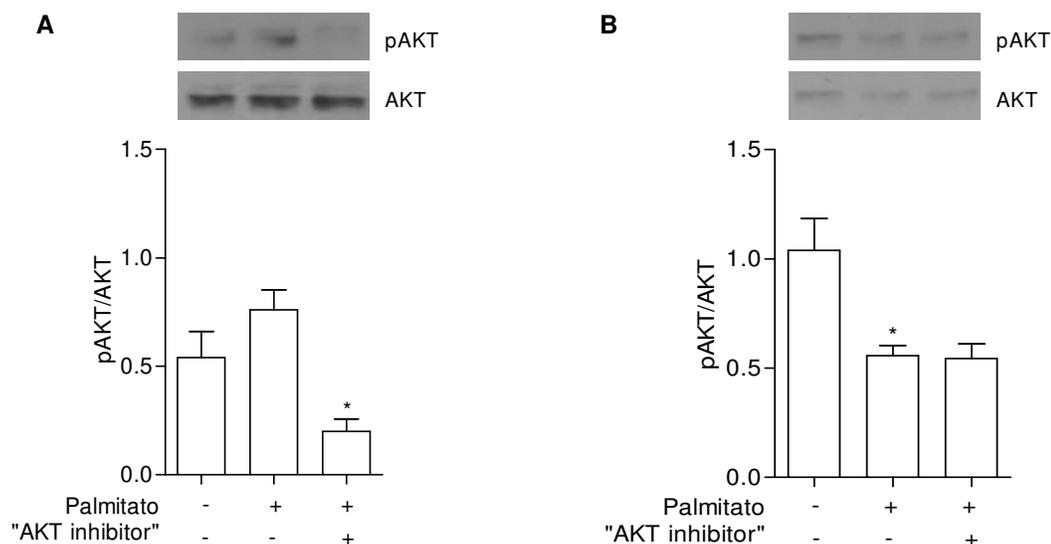


Figura 13: Análise por “Western blot” da AKT fosforilada em serina 473 em 1 hora (A) ou 12 horas (B), tratadas com palmitato numa concentração de 200 μ M e/ou pré-tratamento com “AKT inibidor” (100 nM) por 15 minutos (Ser-473) (n=3-5) (P<0,05).

O estresse de RE decresce ao incorporarmos o “AKT inibidor” previamente ao tratamento com palmitato, dados que podem ser observados pela diminuição da expressão de ATF4 (figura 14 A), CHOP (figura 14 B) e a reversão tendência de aumento da ATF6 (figura 14 C).

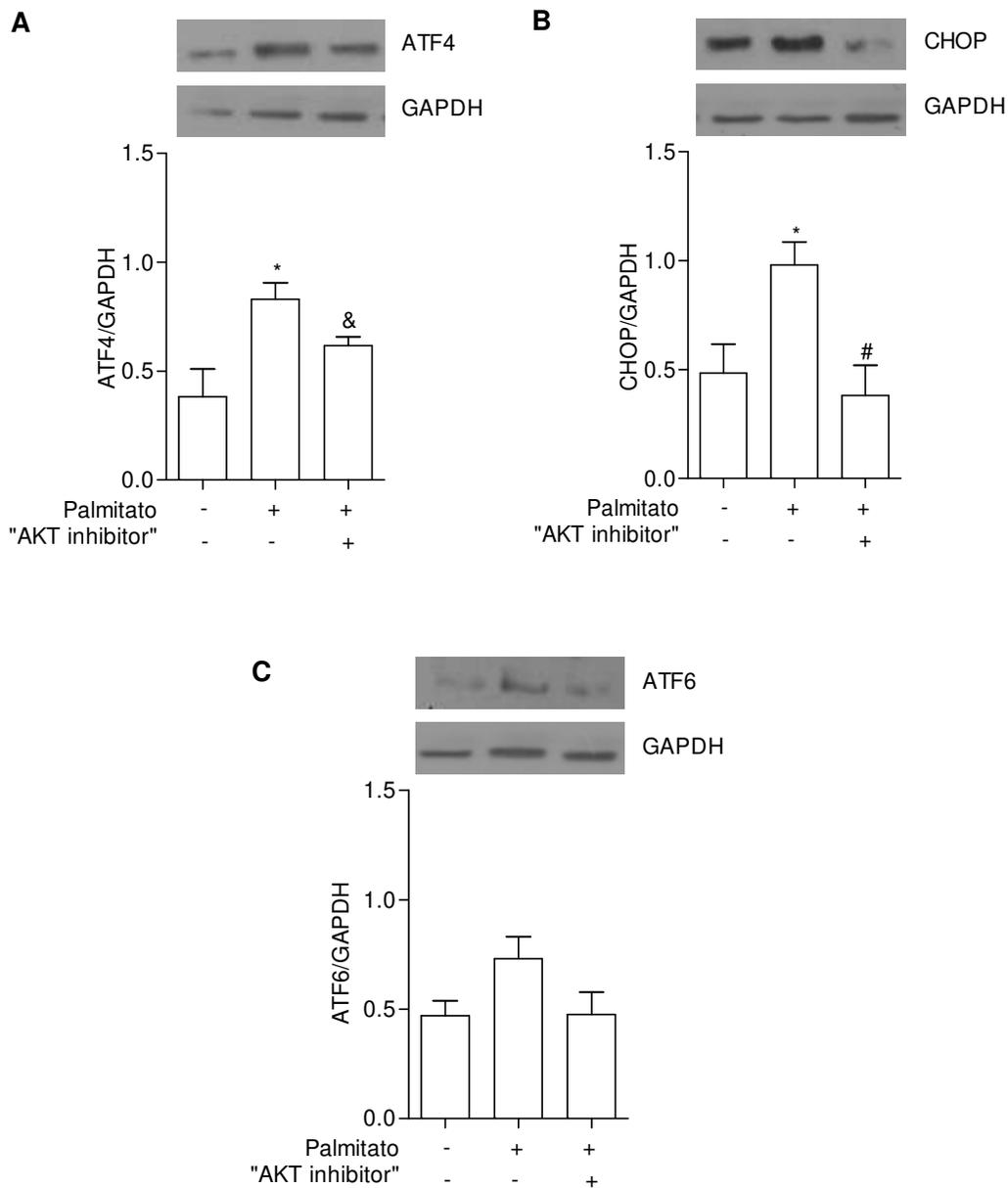


Figura 14: Células de hepatoma (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas e/ou pré-tratamento por 15 minutos com “AKT inhibitor” (100 nM). Análise por “Western blot” de proteínas envolvidas com estresse de retículo endoplasmático: ATF4 (A), CHOP (B) e ATF6 (C) (n=6) *Controle VS. Palmitato, & ou # Palmitato VS. Palmitato com “AKT inhibitor” (P<0,05).

A microscopia também foi utilizada para verificarmos se havia algum efeito de diminuição da incorporação lipídica nas células HepG2, e isto foi o que realmente observamos quando realizado a quantificação (figura 15 D). Estes

dados nos mostram que possivelmente que a AKT pode estar ligado à incorporação do lipídeo a célula hepática.

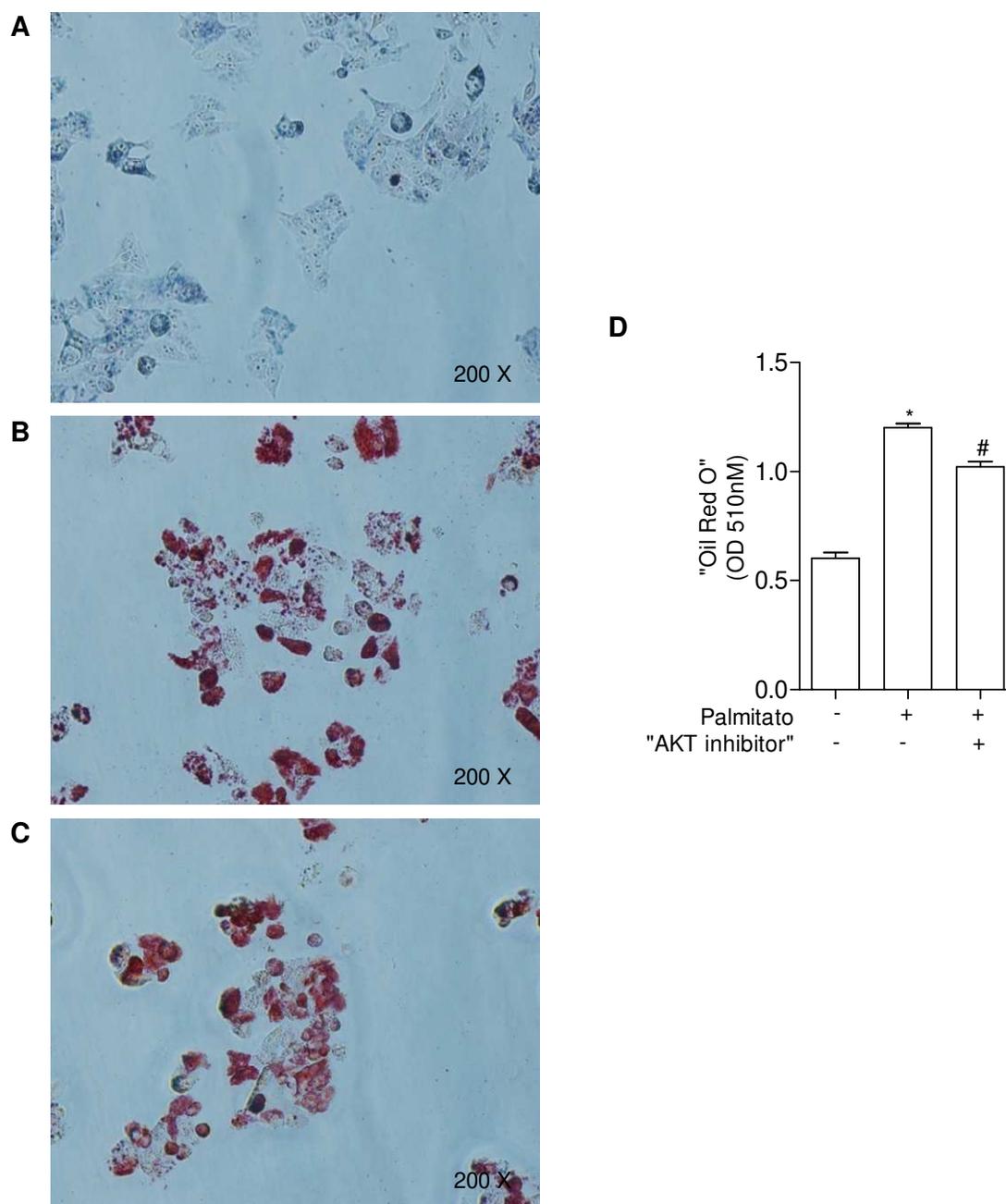
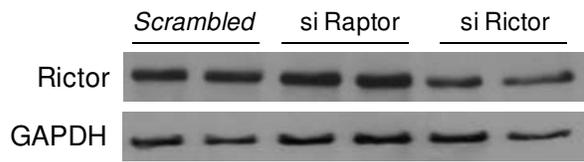


Figura 15: Coloração de "Oil Red O" em células de hepatoma tratados com palmitato e/ou "AKT inibidor". (A) Controle experimental, (B) células HepG2 tratadas com 200μM de palmitato por 12 horas e (C) células HepG2 tratadas com palmitato por 12 horas, com pré-incubação de "AKT inibidor" (100 nM) por 15 minutos. (D) Quantificação do conteúdo lipídico pós-microscopia das células (n=6) foi realizada por espectrofotometria em 510 nm *(P<0,05).

Havia a necessidade de confirmar que todos estes eventos até então observados estavam realmente acontecendo via TORC2. Para isso, realizamos o experimento de transfecção celular para inibirmos especificamente as proteínas Raptor e Rictor, que fazem parte dos complexos proteicos da mTOR1 e da mTOR2, respectivamente. Através da expressão da Rictor (figura 16 A), confirmamos a inibição parcial da proteína ao compararmos com as células controle (“scrambled”), mas também com as células silenciadas para Raptor.

Ao analisarmos a fragmentação de DNA, no gráfico da figura 16 B, nós confirmamos que a apoptose gerada pelo palmitato foi realmente gerada via Rictor, proteínas esta inserida no complexo TORC2. Todos estes dados vieram contribuir com a nossa hipótese inicial, de que a apoptose e o estresse de RE correlaciona-se finamente com a via da mTOR, e em especial com o complexo mTOR2/Rictor.

A



B

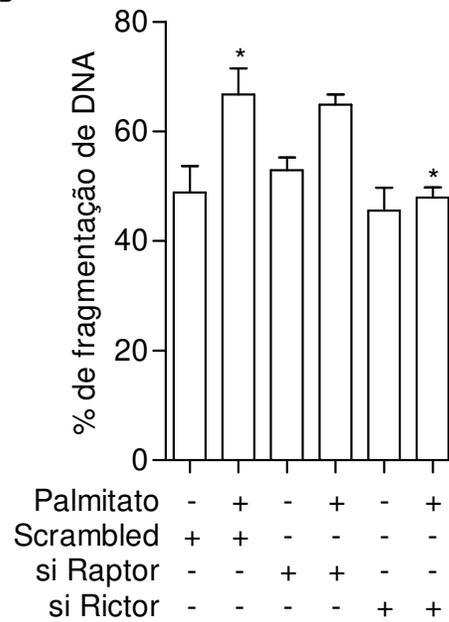


Figura 16: Silenciamento gênico para as proteínas Raptor, Rictor e *Scrambled* (controle). (A) Comprovação da eficiência da transfecção para o si RNA Rictor. (B) Apoptose de células de hepatoma humano (HepG2) tratadas com 200 μ M de palmitato por 12 horas, com silenciamento gênico preliminar para as proteínas Raptor, Rictor e *Scrambled* (controle) (n=5-6) (P<0,05).

Avaliação dos efeitos da glicose e da frutose em células de hepatoma

As investigações com glicose iniciaram-se com a determinação da ação apoptótica desta. Definimos, através de um experimento de avaliação de fragmentação de DNA, que a glicose (33.3 mM) gera apoptose em células de hepatoma a partir das 24 horas de tratamento, perdurando-se até às 48 horas (figura 17 A). A rapamicina em duas concentrações crescentes (10 a 100 nM) inibe a apoptose progressivamente em ambas doses, mostrando que possivelmente este evento é dado por inibição do complexo mTOR1/Raptor, visto que 10 nM de rapamicina é uma dose específica para inibição específica deste complexo.

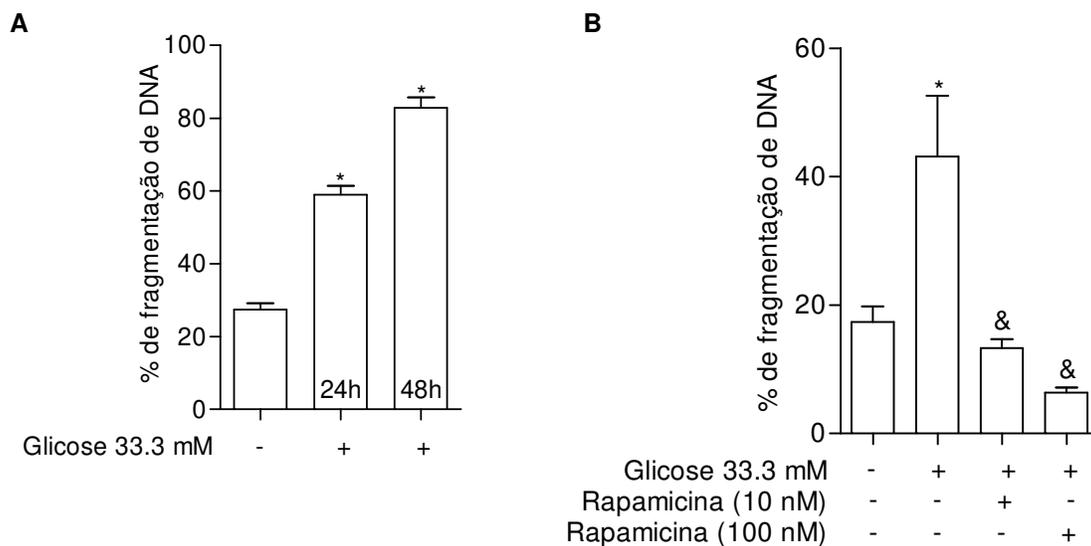


Figura 17: Células HepG2 tratadas com 33.3 mM de glicose em meio de cultura contendo 2% de albumina. (A) Células tratadas por 24 ou 48 horas com glicose, e em (B) as células receberam o tratamento com glicose por 48 horas com ou sem rapamicina em duas concentrações: 10 ou 100 nM (n=6). Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo, com células tratadas e incubadas com iodeto de propídeo. *Controle VS. Glicose, & Glicose VS. Glicose com Rapamicina (P<0,05).

A avaliação da ação apoptótica da frutose nesta linhagem de hepatoma humano, mostrou-nos que este carboidrato gera apoptose nesta linhagem apenas

em 48 horas numa concentração de 4.5 mM (figura 18 A). No entanto, esta apoptose é inibida apenas com 100 nM de rapamicina (figura 18 B), dando a sugestão que a via mTOR2/Rictor pode estar envolvida neste evento.

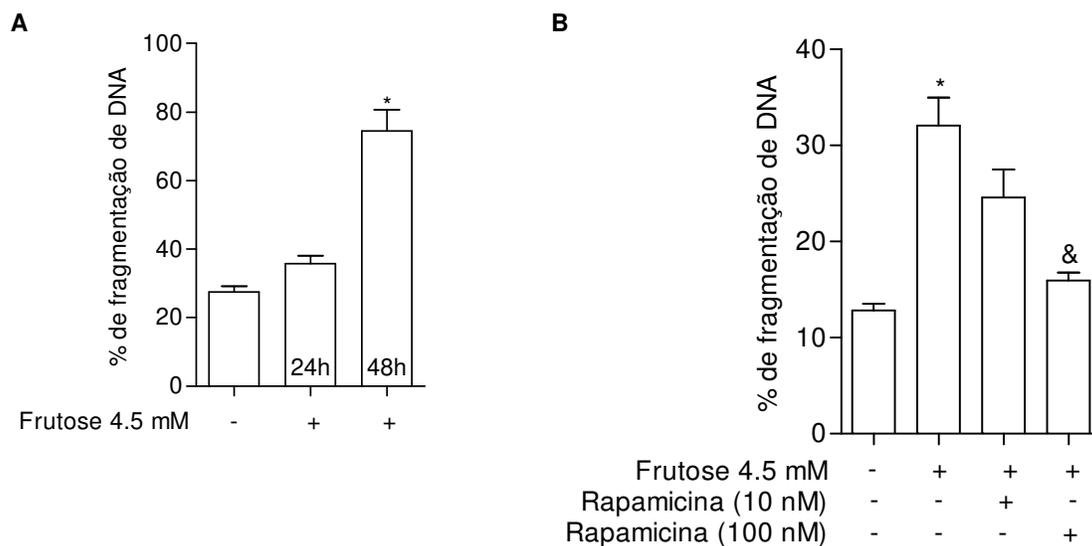


Figura 18: Células HepG2 tratadas com 4.5 mM de frutose em meio de cultura contendo 2% de albumina. (A) Células tratadas por 24 ou 48 horas com frutose, e em (B) as células receberam o tratamento com frutose por 48 horas com ou sem rapamicina em duas concentrações: 10 ou 100 nM (n=6). Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo, com células tratadas e incubadas com iodeto de propídeo. *Controle VS. Glicose, & Glicose VS. Glicose com Rapamicina (P<0,05).

5- DISCUSSÃO

O acúmulo de gordura no parênquima hepática e suas consequências, como a esteatose e o hepatocarcinoma emergiram como um problema de saúde pública assim como os seus principais fatores de risco, a obesidade e a resistência à insulina, que por sua vez assumem papel epidêmico amedrontador em todo mundo. O consumo exacerbado e crônico de ácidos graxos saturados de cadeia longa, como o palmitato, pode levar a quadros de fibrose hepática e cirrose; os ácidos graxos livres aparecem como o maior mediador de acúmulo de lipídeos no fígado. Quando instalado o quadro cirrótico, eleva-se o risco de morte do portador por elevar as chances do desenvolvimento de hepatocarcinoma e descompensação funcional do fígado (Wobser, 2009).

De acordo com os estudos de Kim e colaboradores, a diminuição da viabilidade celular determinada por azul de Tripán na linhagem celular de hepatoma (HepG2) é obtida com doses de palmitato entre 100 e 1.000 μM (cerca de 20% a 80% de diminuição da viabilidade). A avaliação da morte celular causada pelo tratamento com 500 μM de palmitato mostrou cerca de 40% de apoptose, quando comparada ao controle, acompanhado de aumento da clivagem caspase 3. A atividade elevada da caspase 3 está ligada diretamente à morte celular programada. No entanto, estes experimentos foram realizados com o ácido graxo não conjugado à albumina (Kim et al., 2010).

Em nossos experimentos as células HepG2 foram tratadas com 200 μM de palmitato num curso temporal, no qual determinamos a apoptose através da fragmentação de DNA. O tratamento destas células com o ácido graxo de cadeia longa desencadeou a morte celular a partir das 6 horas de tratamento, chegando ao seu ápice em 12 horas. Estes resultados mostram que o efeito apoptótico do palmitato é gerado do modo crescente e dependente do tempo de exposição.

Observou-se em células β , tanto em experimentos com cultura de ilhotas de ratos *Wistar* como em linhagem celular (INS-1), que em tratamento com palmitato pré-conjugado à albumina numa proporção de 1:3, e também quando tratadas com citocinas, há aumento do estresse de RE pela expressão e fosforilação de

proteínas como: PERK, Eif2 α , ATF4 e CHOP. Portanto, tanto as citocinas quanto a lipotoxicidade causam estresse de RE. A indução de estresse de retículo por palmitato ou por citocinas são eventos independentes que culminam em apoptose. Estes resultados mostraram que diferentes mecanismos são responsáveis pela apoptose de células β no diabetes tipo 1 e 2 (Akerfeldt *et al.*, 2008). A morte das células β pancreáticas é a disfunção central no processo da patogênese do diabetes, e a perda da massa funcional das células β é um processo que leva a apoptose dessas células. Ácidos graxos saturados, como o palmitato, diminuem o aporte de íons Ca²⁺ que, por sua vez, libera o sinal para as proteínas envolvidas no estresse de RE. A ativação de proteínas como a PERK, culmina na ativação da CHOP que inibe a Bcl-2, um fator anti-apoptótico, causando ativação da cascata apoptótica chegando à clivagem da caspase 3. Outra proteína transmembrana do estresse de retículo, a Ire1 também está envolvida na apoptose pela ativação da TRAF2, mas também ativação da caspase 12, que causa ativação da caspase 3. Em princípio, o ATF6 não está envolvido em mecanismos pró-apoptóticas, mas sim na tentativa da homeostase celular (Cnop *et al.*, 2010).

Outros pesquisadores ainda descrevem que a UPR, quando gerada pela utilização de ácidos graxos de cadeia longa, é dada pela ativação da IRE1, que promove o “splicing” do XBP1 e subsequente transcrição de chaperonas e genes associados ao RE envolvidos com degradação. A atividade da PERK é dada pela sua autofosforilação, e subsequente fosforilação da subunidade alfa do fator iniciador de transcrição eIF2, e posterior atenuação de tradução, bem como aumento da expressão seletiva do fator ativador de transcrição 4 (ATF4). O fracasso da UPR em restabelecer a homeostase do retículo endoplasmático leva a célula a apoptose (Wei *et al.*, 2006). De acordo com Ron & Tabas, as facetas do estresse de retículo que culminam em apoptose são integradas, e dependem principalmente da exposição crônica ao agente indutor. Nesse contexto ainda, a CHOP é citada como uma das principais proteínas relacionadas a apoptose (Ron & Tabas, 2011).

A avaliação curso temporal das proteínas envolvidas com ativação da UPR e do estresse de RE, realizadas neste trabalho, nos mostrou a dependência do fator

tempo para aumento da expressão ou fosforilação delas. Observamos claramente que a expressão de ATF4, ATF6 e CHOP não se elevam, nem mesmo a PERK, eleva sua fosforilação num curto espaço de tempo do tratamento com o ácido palmítico. No entanto, estas proteínas anteriormente citadas, num tratamento com tempos maiores, sofrem um aumento de expressão ou fosforilação. É importante citar que o estresse de RE gerado num experimento curso temporal longo, tem efeito similar em relação ao tempo da apoptose, já discutida anteriormente.

O TBR3 é uma pseudoquinase que modula várias cascatas associadas ao estresse de RE, como deficiência nutricional, resistência à insulina, hipóxia e regulação de diferenciação e crescimento celular. Esta proteína é expressa em células de hepatoma humano HepG2, e é modulada positivamente com a utilização de drogas indutoras de estresse de RE, como a tunicamicina, mas também em podócitos foi observado que o palmitato eleva sua expressão. Atualmente o TRB3 é visto como uma proteína indutora da apoptose em células hepáticas (Yan et al., 2014). Nós observamos que a expressão da TRB3 também se eleva no tempo máximo de tratamento (12 horas), e seu efeito se sobrepõe com a apoptose e o estresse de RE.

A etapa experimental subsequente avaliou a fosforilação de proteínas envolvidas com a atividade da mTOR. Em tempos curtos, proteínas pós-traducionais relacionadas ao complexo mTORC1/Raptor, P70 e 4EBP1, não tiveram sua fosforilação modificada. Este resultado perdura-se também pelos tempos maiores de exposição ao palmitato, no entanto, a fosforilação da mTOR eleva-se em 6 e 12 horas de experimento coincidindo com o estresse de RE e a apoptose.

Cerasi e colaboradores observaram que uma linhagem de insulinoma (INS-1E) tratadas com palmitato, o aumento do estresse de RE era dependente da ativação da mTOR (Leibowitz *et al.*, 2009). As vias de sinalização pertencente à mTOR são sensíveis a nutrientes, e transmitem sinais destes nutrientes e da insulina para o ambiente intracelular. Quando ativado o complexo TORC1 fosforila a proteína P70 (S6K1) e o fator de alongação 4E-BP1, resultando assim no aumento generalizado da síntese protéica celular. O complexo TORC1 é conhecido como o complexo da

mTOR sensível à rapamicina, pois a atividade cinase deste complexo protéico é reduzida na presença desta droga (Taniguchi *et al.*, 2006).

A mTOR forma ainda um complexo protéico cuja atividade também é inibida pela rapamicina denominado TORC2. Canonicamente, acredita-se que o TORC2, formado pela Rictor, mTOR e outras proteínas, catalisa a fosforilação em serina e consequente ativação da AKT, aumentando desta maneira a sinalização da insulina (Hresko & Mueckler, 2005). Ao contrário desta regulação positiva da sinalização da insulina pelo complexo TORC2, a ativação exacerbada do TORC1 resulta em uma regulação negativa da sinalização da insulina (Tremblay *et al.*, 2005). Outros trabalhos ainda mostram que a expressão de Raptor sem função causa o aumento da sensibilidade à insulina no fígado (Koketsu *et al.*, 2008).

Ao utilizarmos a rapamicina decidimos realizar um experimento dose-resposta para avaliar inicialmente se ela inibiria a morte celular causada pelo palmitato em 12 horas, e consequentemente descobrir qual dose seria necessária para realização deste feito. Observamos que com 500 nM de rapamicina, o efeito apoptótico do palmitato foi inibido, retomando aos valores de controle. Do mesmo modo avaliamos durante os tempos longos (3, 6 e 12 horas), se o tratamento concomitante entre o palmitato e a rapamicina seria capaz de reduzir os efeitos de estressantes ao RE, evidenciado pela utilização ácido graxo de cadeia longa. Observamos que este efeito foi bloqueado principalmente em relação às proteínas, ATF4, CHOP, ATF6 e PERK; existindo ainda a tendência de diminuição do TRB3. Apesar de não observarmos modificação na fosforilação da proteína P70, observamos que o tratamento com palmitato e rapamicina, reduz além dos níveis basais a sua fosforilação.

Chen e colaboradores mostraram que os mecanismos de inibição de mTOR 1/Raptor e mTOR 2/Rictor com rapamicina são dose dependentes. Nos experimentos destes pesquisadores foi realizado uma dose-resposta para avaliar a correlação entre o mTOR 1 e 2, com a via da AKT e da ERK. Observaram que 10 nM de rapamicina inibe o complexo mTORC 1/Raptor, culminando em aumento da fosforilação de AKT e ERK. Ao passo que doses entre 100 e 1000 nM de rapamicina inibiram a fosforilacao de AKT, ERK mas também o complexo mTOR

2/Rictor; o mesmo foi visto ao utilizarem um silenciador gênico específico para Rictor. Foi observado também que a Rictor tem um papel fundamental no desenvolvimento celular, e seu papel está ligado diretamente à ativação AKT (Chen *et al.*, 2010). Yung e colaboradores mostraram que existe interação entre o estresse de RE e a AKT através do substrato serina 473. Ao utilizarem tunicamicina, foi observado que ela eleva consideravelmente a fosforilação do resíduo serina 473, e não do resíduo treonina 308 (Yung *et al.*, 2011). Tem sido demonstrada também que a mTOR 2 controla a sobrevivência celular e a sua proliferação, pelo menos parcialmente, devido a sua regulação da atividade de AKT em serina 473 (Chen *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2012).

Estes estudos citados no parágrafo anterior corroboram os nossos resultados, visto que observamos que AKT fosforilada em serina 473, aumenta em tempos anteriores a instalação do estresse de RE e da apoptose, e diminui drasticamente sua fosforilação ao passo que os efeitos estressores são observados. Então este parece ser um efeito bifásico, que por sua vez está relacionado à flutuação fosforilativa desta proteína.

Vale a pena destacar que diferente do nosso trabalho, Yung e colaboradores utilizaram um indutor químico de estresse de RE, e não observaram curso temporalmente as alterações na fosforilação da AKT (Yung *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a utilização de ácido palmítico em diversas concentrações, eleva a toxicidade em células HepG2. Estes achados foram observados por vários aspectos, dentre eles a marcação e a quantificação do conteúdo lipídico (Yao *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Nós observamos que o palmitato aumentou consideravelmente o acúmulo lipídico nestas células, no entanto, o tratamento com rapamicina integrado ao tratamento com o ácido graxo não foi capaz de reduzir este conteúdo. Ao realizarmos o tratamento utilizando agora um inibidor específico para AKT (“AKT inibitor”), o conteúdo lipídico decresceu quando comparado às células tratadas apenas com o palmitato.

Kubrusly e seus colegas demonstraram que em biópsia hepática humana de pacientes obesos com esteato hepática, havia elevação na fosforilação da mTOR, mas também uma diminuição na fosforilação do 4EBP1. Estas amostras foram

comparadas com pacientes saudáveis, e também a pacientes com outras desordens hepáticas, como a hepatite C (Kubrusly *et al.*, 2010).

As inibições farmacológicas da PI3 quinase com LY ou Wortimanina não desencadearam efeitos anti-apoptóticos nas células tratadas ao mesmo tempo com palmitato. Buscamos uma droga que bloqueasse apenas a AKT, o “AKT inibitor” (100 nM) causou a inibição da apoptose gerada pelo palmitato, assim como inibiu o aumento da expressão de proteínas envolvidas com o estresse de RE como, ATF4 e CHOP. Todos os nossos resultados em conjunto nos levam a crer que o tratamento com o palmitato eleva de modo transitório a fosforilação da AKT, levando ao estresse de RE e conseqüentemente morte celular em longo prazo, e a ativação inicial da AKT se deve a TORC2.

A relação da glicotoxicidade e o desenvolvimento do diabetes já é bem estudada, principalmente com altas concentrações de glicose causando anomalias funcionais as células β . Atualmente a frutose ganhou uma força por apresentar interação com o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, por isto decidimos incluí-la em nossas investigações (Feinman & Fine, 2013). Observamos que a glicose em altas concentrações (33.3mM) foi capaz de gerar apoptose nas células HepG2 em 24 horas de tratamento, exacerbando este resultado ainda mais em 48 horas de exposição. Acreditamos neste caso que a apoptose gerada pela utilização da glicose depende do complexo mTOR1/Raptor, visto que numa dose de 10 nM de rapamicina a apoptose retomou aos valores de controle.

Como já citado anteriormente, Chen e colaboradores mostraram que a doses baixas de rapamicina (cerca de 10 nM) são específicas para inibição do complexo mTOR1/Raptor, e a partir disso, 100 nM por exemplo, há uma perda da especificidade da droga agindo também no complexo mTOR2/Rictor (Chen *et al.*, 2010).

Decidimos ainda avaliar o papel da frutose, numa concentração de 4.5 mM baseado no trabalho de Hirahatake e colaboradores, que utilizaram este modelo para avaliação da lipogênese (Hirahatake *et al.*, 2011). Nossos dados mostram que a frutose apenas em 48 horas de tratamento elevou a apoptose consideravelmente, e ao utilizarmos a rapamicina observamos a inibição da morte

celular apenas com a dose de 100 nM. Possivelmente, a ação da frutose depende do complexo mTOR2/Rictor, no entanto, maiores investigações necessitam ser realizadas.

Em achados observados em células HepG2, Hirahatake e colaboradores demonstraram que diferentemente da glicose, a frutose não ativa a biossíntese da hexosamina, que por sua vez está relacionada ao aumento da expressão de enzimas relacionadas à síntese de ácidos graxos no fígado humano; mas também há elevação na expressão de genes relacionados à lipogênese. (Hirahatake *et al.*, 2011).

6- CONCLUSÕES

O ácido palmítico gera lipotoxicidade nas células de hepatoma humano (HepG2), que por sua vez desencadeia estresse de RE e morte celular. Este evento é dependente do tempo de exposição ao ácido graxo de cadeia longa. Anterior a deflagração da morte e o estresse de RE foi observada um aumento na fosforilação no resíduo serina 473 da AKT, e ao ponto que os efeitos deletérios acontecem nas células HepG2 a fosforilação desta proteína decresce. A utilização de drogas inibitórias da mTOR e da AKT confirmaram que estes eventos estavam de fato acontecendo via TORC2, e o silenciamento gênico da Rictor, veio corroborar com todos os resultados observados (figura 19).

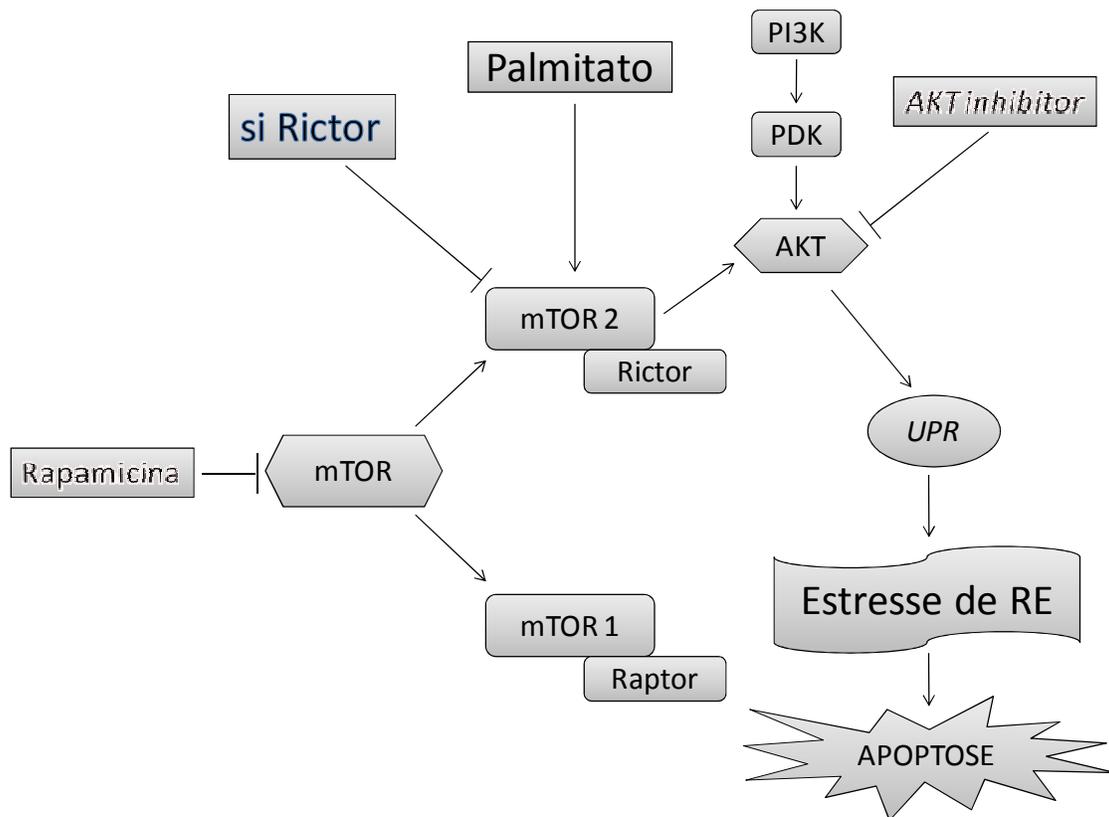


Figura 19: Representação esquemática da importância do complexo mTOR2/Rictor e da AKT na geração da apoptose e do estresse de RE em células de hepatoma humano (HepG2), eventos estes gerados pela utilização do ácido graxo de cadeia longa (palmitato). si Rictor = silenciamento gênico específico para Rictor, mTOR = alvo da rapamicina em mamíferos, UPR = “unfolded protein response”, RE = retículo endoplasmático, AKT = proteína quinase B, PDK = fosfoinositol dependente de quinase 1, PI3K = fosfoinositidil quinase 3.

A glicotoxicidade dada pela glicose nesta linhagem de hepatoma humana (HepG2) foi dada pelo aumento da apoptose (fragmentação de DNA), e a inibição deste efeito pôde ser observado com uma dose de 10 nM de rapamicina, sugerindo que este efeito ocorre via complexo mTOR 1/Raptor. Já o efeito pró-apoptótico observado pela frutose, foi inibido apenas com a dose de 100 nM de rapamicina, dando a entender que o efeito gerado ocorre via complexo mTOR2/Rictor (figura 20).

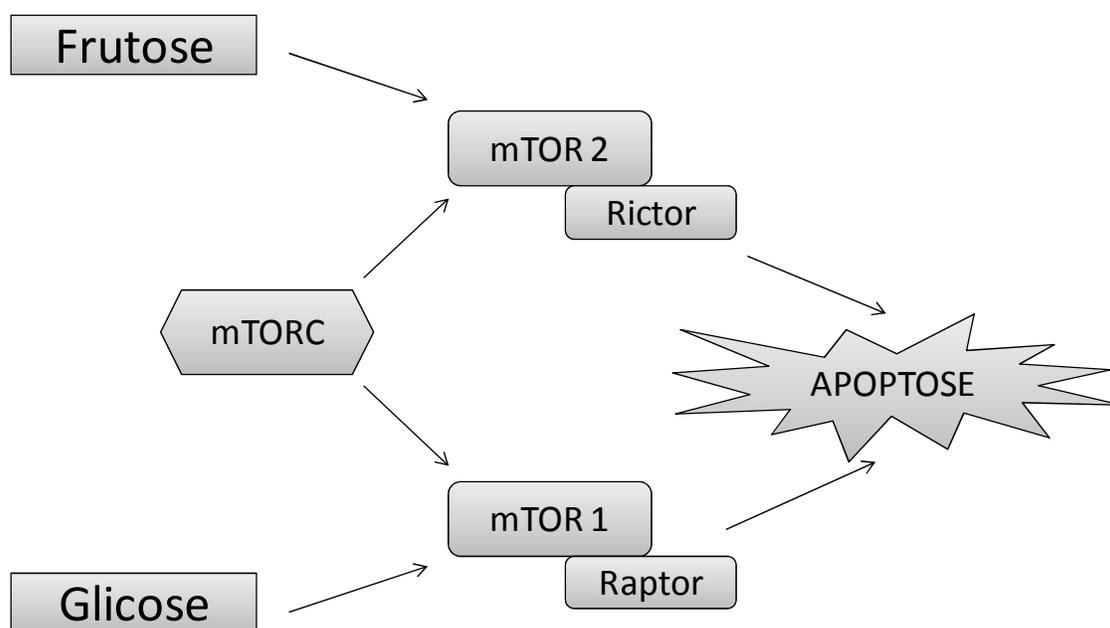


Figura 20: Representação esquemática da importância dos complexos mTOR1/Raptor e do mTOR2/Rictor na geração da apoptose em células de hepatoma humano (HepG2), eventos estes gerados pela utilização de altas concentrações de carboidratos (glicose e frutose).

O entendimento dos efeitos lipotóxicos e glicotóxicos frente à ativação destas vias de sinalização gera informações preciosas, para o surgimento de futuras linhas terapêuticas diferenciadas para os doentes acometidos com esteatose, além da tradicional dietoterapia.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbaek Madsen O, Mandrup-Poulsen T, Bonny C. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49(9):1468-76, 2000.

Appenzeller-Herzog C & Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends in Cell Biology* 22(5):274-282, 2012.

Akerfeldt M C, Howes J, Chan J Y, Stevens V A, Boubenna N, McGuire H M, King C, Biden T J, Laybutt D R. Cytokine-induced β -cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling. *Diabetes* 57:3034-3044, 2008.

Benjamin D, Colombi M, Morono C, Hall M. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature* 10:868-880, 2011.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.*2(6):326-32, 2000.

Buontempo F, Ersahin T, Missiroli S, Senturk S, Etro D, Ozturk M, Capitani S, Cetin-Atalay R, Neri ML. Inhibition of AKT signaling in hepatoma cells induces apoptotic cell death independent of AKT activation status. *Invest New Drugs* 29:1303-1313, 2011.

Carneiro J and Junqueira LC. *Biologia celular e molecular*. 9^a edição, 2012.

Cnop M, Ladriere L, Igoillo-Ester M, Moura R F, Cunha, D A. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12(2): 76-82, 2010.

Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder P K, Baselga J, Rosen N. AKT Inhibition Relieves Feedback Suppression of Receptor Tyrosine Kinase Expression and Activity. *Cancer Cell* 19, 58–71, 2011.

Chen X G, Liu F, Song X F, Wang Z H, Dong Z Q, Hu Z Q, Lan R Z, Guan W, Zhou T G, Xu X M, Lei H, Ye Z Q, Peng E J, Du L H, Zhuang Q Y. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Molecular Carcinogenesis* 49: 603-610, 2010.

Ellgaard L and Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature* 4:181-191, 2003.

Feinman R D, Fine E J. Fructose in perspective. *Nutrition and Metabolism* 10:1–11, 2013.

González-Rodríguez A, Alba J, Zimmerman V, Kozma SC, Valverde AM. S6K1 deficiency protects against apoptosis in hepatocytes. *Hepatology*. 50(1):216-29, 2009.

Gu X, Li k, Laybutt D R, He M, Zhao H, Chan J C N, Xu G. Bip overexpression, but not CHOP inhibition, attenuates fatty-acid-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 liver cells. *Life Science* 87: 724-732, 2010.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716):271-4, 1999.

Hirahatake K M, Meissen J K, Fiehn O, Adams S H. Comparative effects of fructose and glucose on lipogenic gene expression and intermediary metabolism in HepG2 liver cells. *PLoS ONE* 6(11): 1 – 9, 2011.

Hollin J. Evolution of unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta* 11:2458-2463, 2013.

Hotamisligil G. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis 16(4):396-399, 2010.

Hresko R C, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 280(49):40406-16, 2005.

Jump DB. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(2): 115-20, 2011.

Lee J, Zheng Z, Mendez R, Ha S, Xie Y, Zhang K. Pharmacology ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in na animal model. *Toxicology Letters* 211:29-38, 2012.

Lee J, Hong SW, Chae SW, Kim DH, Choi JH, Bae JC, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Kim SW, Lee WY. Exendin-4 improves steatohepatitis by increasing Sirt1 expression in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *PLoS One* 7(2):1-10, 2012.

Leibowitz G, Kaiser N, Cerasi E. Balancing needs and means: the dilemma of the β -cell in the modern world. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11,1-9, 2009.

Loewith R and Hall MN. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189,1117-1201, 2011.

Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica*. 8ª ed. Cap. 56. pág. 842, 2002.

Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Leibowitz G. The role of mTOR in the adaptation and failure of β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10: 157-169, 2008.

Kim D, Jeong S, Kim H, Kim D, Chae S, Chae H. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32(2): 251-257, 2010.

Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Ono H, Anai M, Kikuchi T, Fukuda T, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Hepatic overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/KAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 294(4):E719-724, 2008.

Kubrusly MS, Corrêa-Giannella ML, Bellori-Privato M, Sá SV, de Oliveira CP, Soares IC, Wakamatsu A, Avancini V, Alvez F, Giannella-Neto D, Bacchella T, Machado MC, D'Albuquerque AC. A role for mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in non alcoholic steatohepatitis related-cirrhosis. *Histology and Histopathology* 25:1123-1131, 2010.

Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*. 14(12):1484-95, 2009.

Matherly SC and Puri P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: not so simple after all. *Clinical Liver Disease* 16:505-524, 2012.

Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10:656-665, 2013.

Minamino T and Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(6):1005-1010, 2010.

Monteiro JC, Chen X, Ocana A, Pandiella A. Predominance of mTORC1 over mTORC2 in the regulation of proliferation of ovarian cancer cells: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*. 11(6):1342-1352, 2012.

Monsour HP, Frenette CT, Wyne K. Fatty liver: a link to cardiovascular disease – its natural history, pathogenesis, and treatment. *Methodist Debaque Cardiovasc J*. 8(3): 21-5, 2012.

Moore MC, Connolly CC, Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol*. 138(3):240-248, 1998.

Mordier S, Iynedjian PB. Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 and insulin resistance induced by palmitate in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 362(1):206-11, 2007.

Musso G, Paschetta E, Gambino R, Cassader M, Molinaro F. Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver. *Trends in Molecular Medicine*. 1 – 14, 2013.

Novikoff AB. The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (A Review). *PNAS* 73(8):2781-2787, 1976.

Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Düvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS. Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell*. 29(5):541-51, 2008.

Pfaffenbach KT, Nivala AM, Reese L, Ellis F, Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Rapamycin inhibits postprandial-mediated X-box-binding protein-1 splicing in rat liver. *J Nutr*. 140(5):879-84, 2010.

Pfaffenbach, K. T.; Gentile, C. L.; Nivala, A. M.; Wang, D.; Wei, Y.; Pagliassotti, M. J. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism* in press, 2010.

Qian B, Wang H, Men X, Zhang W, Cai H, Xu S, Xu Y, Ye L, Wollheim CB, Lou J. TRIB3 [corrected] is implicated in glucotoxicity- and endoplasmic reticulum-stress-induced [corrected] beta-cell apoptosis. *J Endocrinol*. 199(3):407-16, 1999.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*. 11(4):372-80, 2004.

Schwenger KJ and Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20(7):1712-1723, 2014.

Shen, X.; Zhang, K.; Kaufman, R. J. The unfolded protein response – a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28, 79 – 92, 2004.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(2):85-96, 2006.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* 13:3184-190, 2011.

Taylor, S.I. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 97:9–12, 1999.

Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146(3):1328-37, 2005.

Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil S. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(28):10741-6, 2006.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 287(5453):664-6, 2000.

Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, Li Y, Jiang YY, Li J, Shang J. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *Am J Transl Res* 3(3):284-291, 2011.

Yan W, Wang Y, Xiao Y, Wen J, Wu J, Du L, Cai W. Palmitate induces TRB3 expression and promotes apoptosis in human liver cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 33,823-834, 2014.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 6(6):1355-64, 2000.

Younossi ZM, Reyes MJ, Mishra A, Mehta R, Henry L. Systematic review with meta-analysis: non-alcoholic steatohepatitis – a case for personalised treatment based on pathogenic targets. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 39:3-14, 2013.

Yue T, Yin J, Li F, Li D, Du M. High glucose induces differentiation and adipogenesis in porcine muscle satellite cells via mTOR. *BMB Rep*. 43(2):140-5, 2001.

Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS ONE* 6(3):1-12, 2011.

Wei Y, Wang D, Topezewski F, Pagliassotti M J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am j Physiol Endocrinol Metab* 291:275-E281, 2006.

Wobser H, Dorn C, Weiss T S, amann T, Bollheimer C, Büttner R, Schölmerich J, Hellerbrand C. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell research* 19:996-1005, 2009.

Zhang K and Kaufman R. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66:S102-S109, 2006.