

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Jamille Fernandes Lula

Efeito do inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo 2 (celecoxibe) sobre as citocinas inflamatórias e o sistema renina-angiotensina no tecido adiposo e sobre a lipogênese na esteatose hepática em modelo murino de obesidade

Montes Claros
2015

Jamille Fernandes Lula

Efeito do inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo 2 (celecoxibe) sobre as citocinas inflamatórias e o sistema renina-angiotensina no tecido adiposo e sobre a lipogênese na esteatose hepática em modelo murino de obesidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros - MG

2015

L955e

Lula, Jamille Fernandes.

Efeito do inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo 2 (celecoxibe) sobre as citocinas inflamatórias e o sistema renina-angiotensina no tecido adiposo e sobre a lipogênese na esteatose hepática em modelo murino de obesidade [manuscrito] / Jamille Fernandes Lula. – 2015.

89 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos.

1. Obesidade. 2. Inibidor de Ciclooxigenase-2. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Fígado gorduroso. 5. Droga anti-inflamatória não-estereoidal. I. Santos, Sérgio Henrique Sousa. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Rômulo Soares Barbosa

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Vanessa Souto Vieira

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Divino Urias Mendonça

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Ildenilson Meireles Barbosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: André Luiz Sena Guimarães

Subcoordenador: Alfredo Maurício Batista de Paula



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



CANDIDATA: JAMILLE FERNANDES LULA

TÍTULO DO TRABALHO: “Efeito do inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo 2 (celecoxib) sobre as citocinas inflamatórias e o sistema renina-angiotensina no tecido adiposo e sobre a lipogênese na esteatose hepática em modelo murino de obesidade”.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças.

LINHA DE PESQUISA: Epidemiologia e Fisiopatologia das Doenças

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS - ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

PROFA. DRA. SILVIO FERNANDO GUIMARÃES DE CARVALHO

PROF. DR. IGOR VIANA BRANDI

PROF. DR. CARLOS EDUARDO MENDES D'ANGELIS

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROFA. DRA. LUCINEIA DE PINHO

PROFA. DRA. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

ASSINATURAS

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

Hospital Universitário Clemente de Faria – HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppgcs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil /CEP: 39401-001

Dedico este trabalho aos meus filhos, João Vitor, Pedro e Maria Eduarda, frutos de muito amor, fontes de toda força e vontade que carrego comigo ao despertar de cada manhã. Obrigada meus amores, pelo sorriso e pela companhia imprescindível, que foram um bálsamo nos momentos de desalento. Vocês são a alegria da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis, por ser tão presente em minha vida, me guiando pelo melhor caminho, incluindo chegar ao fim de mais esta etapa. Foram tantos os momentos desesperadores, mas Você carregou-me no colo, não permitindo que eu me afastasse de meu propósito, com a intercessão da Nossa Mãe.

Ao meu esposo Vitor, eterno companheiro, pelo apoio incondicional, amor e compreensão pelos momentos de ausência ao longo da trajetória que me trouxe a concretização deste sonho. “Entre tantos outros, entre tantos séculos, que sorte a nossa, hein? Entre tantas paixões, esse encontro, nós dois, esse amor...” (Vanessa da Mata). Obrigada pela sua força, por sua dedicação, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa! Te amo!

Aos meus pais, Ina e Luzia, que na sua simplicidade, ensinamentos e exemplos, me mostraram o verdadeiro valor da vida, formando os alicerces de minha história e que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e, acima de tudo, do amor... Amor eterno!

Aos meus irmãos, Wilker e Welder. Existem códigos secretos que só pertencem aos que compartilharam a mesma mesa, as mesmas brincadeiras, os mesmos pais. Mesmo longe, as mãos se reconhecem e se apoiam. Mesmo sem palavras, o entendimento é real. Guardo em um lugar muito especial a memória de velhos pijamas de dormir e a voz suave de papai e mamãe contando histórias para explicar a vida e justificar o amor. Obrigada por todo carinho, confiança, amizade e companheirismo. Esta união me fez mais forte!

Aos meus sobrinhos e sobrinho-afilhado, Thiago, Isadora e Bernardo, por mostrarem que a vida sempre recomeça. A existência de vocês me faz melhor e muito mais feliz!

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Cunhados, Genise, Stéfany e Júlio. Meus sogros, Wanderson e Jaqueline. Tios e primos. Obrigada a todos vocês pela torcida, apoio e pelo carinho! Especialmente minhas primas-amigas-irmãs, eternas companheiras, desde a infância, Ana, Wanessa e Waniny, as quais carregarei comigo por onde eu for. Obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos, pela orientação segura e imprescindível para realização deste trabalho. Obrigada pela compreensão e confiança!

Aos alunos do Grupo de Pesquisa Metabólica pela contribuição valorosa na execução deste trabalho e pela troca de experiências.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelos conhecimentos transmitidos, apoio técnico e pelas orientações.

Ao Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho pelo apoio, ensinamentos e sábios conselhos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente, a cada dia.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas e Parasitárias do HUCF pelo apoio incondicional. Vocês fizeram toda a diferença para finalização deste trabalho!

Aos colegas e amigos do doutorado e laboratório, que tornaram esta caminhada mais amena. Obrigada pelo apoio, amizade, boa convivência e importante colaboração no desenvolvimento dos trabalhos.

Amigos são como o vento: às vezes perto, outras longe, mas eternos em nossos corações. Aos amigos, que sempre estiveram presentes em minha vida. Uns mais distantes geograficamente neste momento, mas, de importância fundamental. Represento-os por Leandro e sua esposa Francly, pelo apoio, amizade e companheirismo. Com quem dividi no doutorado, de maneira mais próxima, minhas angústias, vitórias, alegrias, tristezas, incertezas, certezas, lágrimas e sorrisos. Obrigada pelo apoio e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação, Kátia e Du, pelo ótimo acolhimento no atendimento de minhas demandas, sempre com boa vontade.

À Universidade Estadual de Montes Claros e Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por serem os pilares de mais esta conquista.

A todos que torceram por este momento e que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA) já é reconhecido como um importante modulador de processos metabólicos do corpo, sendo a sua ativação o principal fator que contribui para a obesidade/síndrome metabólica, associado a efeitos pró-inflamatórios e danos hepáticos. Desta forma, a ativação deste sistema pode estar envolvida no desenvolvimento de esteatose hepática com consequente estímulo da lipogênese. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da administração oral de celecoxibe, um antiinflamatório inibidor da ciclooxigenase-2 (ICOX-2), sobre o sistema renina-angiotensina (SRA) e mediadores inflamatórios no tecido adiposo branco, além da ação deste fármaco sobre a lipogênese, na obesidade e esteatose hepática. Camundongos machos FVB / N foram divididos em 3 grupos que foram alimentados com as seguintes dietas experimentais: o primeiro com padrão (DP); o segundo com dieta rica em gordura (DH), ambos durante quatro meses; e o terceiro, que foi alimentado com DH, durante quatro meses, e tratado com inibidor de COX-2 (DH + ICOX), durante dois meses, a uma dosagem de 100 mg / kg de peso corporal. Foram avaliados o peso corporal e a ingestão de alimentos. Em um primeiro momento, os parâmetros sanguíneos (tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, lipoproteína de alta densidade-C, colesterol total, glicemia e níveis de triglicédeos) foram avaliados. PCR em tempo real foi realizada em amostras de tecido adiposo epididimal para analisar a expressão do angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina (ECA), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). No segundo momento, a histologia e a expressão da ACC, PPAR- γ , FAS, SREBP-1c através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram avaliadas no fígado. Os resultados mostraram que o inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (celecoxibe) é capaz de promover a perda de peso em animais considerados obesos e reduzir o consumo de alimentos. Este trabalho mostra diferenças nos níveis de expressão do RNAm de ECA, AGT, TNF- α e IL-6 entre os grupos, sendo menor no grupo que recebeu tratamento com celecoxibe. Além disso, ICOX-2 diminuiu os níveis sanguíneos de triglicérides e glicose em animais alimentados com dieta rica em gordura. Observou-se também, aumento do HDL no grupo tratado. A pesquisa mostrou, ainda, na análise dos genes relacionados com a adipogênese do fígado, que a expressão do RNAm de ACC, FAS, PPAR- γ e SREBP1-c no fígado foram reprimidas de forma significativa nos animais que receberam tratamento. Diante disso, conclui-se que o tratamento com celecoxib melhorou o metabolismo lipídico e promoveu a diminuição da deposição de gordura no fígado, além de modular marcadores do sistema renina-angiotensina e da lipogênese. Estes resultados abrem uma nova perspectiva para a farmacoterapia destas desordens metabólicas (síndrome metabólica/obesidade e esteatose hepática).

Palavras-chave: Obesidade. Inibidor de Ciclooxigenase-2. Sistema renina-angiotensina. Fígado gorduroso. Droga anti-inflamatória não-estereoidal.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) is already recognized as an important modulator of metabolic processes of the body, its activation being the main contributor to obesity / metabolic syndrome associated with pro-inflammatory and liver damage. Thus, activation of this system may be involved in the development of hepatic steatosis with a consequent stimulation of lipogenesis. This study aimed to investigate the effect of oral administration of celecoxib, an anti-inflammatory inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2), on the renin-angiotensin system (RAS) and inflammatory mediators in white adipose tissue, in addition to the action of this drug on lipogenesis in obesity and fatty liver. Mice male FVB / N were divided in 3 groups were fed with the following experimental diets: standard with first (DP); the second high-fat diet (DH), both for four months; and third, which was fed DH during four months, and treated with COX-2 inhibitor (DH + COX) for two months at a dosage of 100 mg / kg body weight. They evaluated the body weight and food intake. At first, blood parameters (glucose tolerance, insulin sensitivity, high-density lipoprotein-C, total cholesterol, glucose and triglyceride levels) were evaluated. Real-time PCR was performed in epididymal adipose tissue samples to analyze angiotensinogen expression (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, interleukin-6 (IL-6) and tumor- α necrosis factor (TNF- α) . In the second stage, histology and expression of ACC, PPAR- γ , FAS, SREBP-1c using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were evaluated in the liver. The results showed that selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) is able to promote weight loss in obese animals considered and reduce food consumption. This work shows differences in mRNA expression levels of ACE, AGT, TNF- α and IL-6 between groups, being lower in the group receiving treatment with celecoxib. Furthermore, COX-2 decreased blood glucose and triglyceride levels in animals fed high fat diet. It was also observed, increasing HDL in the treated group. The survey also showed the analysis of genes related to adipogenesis liver, the mRNA expression of ACC, FAS, PPAR γ and SREBP1-C in the liver were suppressed significantly in animals receiving treatment. Therefore, it is concluded that treatment with celecoxib improved lipid metabolism and promoted decrease fat deposition in the liver, in addition to modulate markers of the renin-angiotensin system and lipogenesis. These findings open up a new perspective for the pharmacotherapy of these metabolic disorders (metabolic syndrome / obesity and fatty liver).

Keywords: Obesity. Cyclooxygenase-2. Renin-angiotensin system. Fatty liver. Drug anti-inflammatory non-estereoidal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fatores de risco associados à síndrome metabólica.....	17
Figura 2 - Prevalência da obesidade, indivíduos do sexo masculino com idade superior a 18 anos, 2014	17
Figura 3 - Prevalência da obesidade, indivíduos do sexo feminino com idade superior a 18 anos, 2014	18
Figura 4 - Evolução da frequência de obesidade, de 2006 a 2014, no Brasil, segundo Ministério da Saúde.....	18
Figura 5 - Expansão do tecido adiposo e inflamação.....	22
Figura 6 - Componentes do Sistema Renina- Angiotensina.....	24
Figura 7 - Histologia hepática.....	27
Figura 8 - Via lipogênica no fígado.....	28
Figura 9 - Mecanismo geral de ação dos AINEs.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ACC	Acetil - CoA Carboxilase
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGT	Angiotensinogênio
AINE	Antiinflamatório Não-esteróide
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Adenosina Monofosfato Quinase
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANG (1-7)	Angiotensina (1-7)
ATR1	Receptor de Angiotensina II do tipo 1
ATR2	Receptor de Angiotensina II do tipo 2
CCL	Quimiocina Ligante da Família CC
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase - 1
COX-2	Ciclooxigenase - 2
COX-3	Ciclooxigenase - 3
COX-4	Ciclooxigenase - 4
cPGES	Prostaglandina E Sintase Citosólica
DCNT	Doenças Crônicas Não-Transmissíveis
DCV	Doença Cardiovascular
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus do Tipo 2
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Ácido Graxo Sintase
FDA	Food and Drug Administration
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ICOX	Inibidor de Ciclooxigenase
IL-10	Interleucina 10

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPEG	Proteína de membrana envolvida no metabolismo de eicosanoides e glutatona
mPGES	Prostaglandina E Sintase Microssomal
NASH	Esteato-hepatite Não Alcoólica
PCR	Proteína C Reativa
PGC-1 α	Receptor Coativador-1 α de PPAR
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PLA2	Fosfolipase A2
PPAR	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxisoma
RBP4	Proteína Ligante de Retinol
RI	Resistência à Insulina
RNA	Ácido Ribonucléico
SM	Síndrome Metabólica
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c
TA	Tecido Adiposo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Síndrome Metabólica.....	16
3.2 Obesidade	17
3.3 Inflamação na Obesidade.....	20
3.4 Sistema Renina-Angiotensina.....	23
3.5 Esteatose Hepática.....	25
3.6 Antiinflamatórios não estereoidais - Inibidores seletivos da Ciclooxygenase – 2...	29
4 PRODUTOS	34
4.1 Produto 1: Renin-angiotensin system is modulated by celecoxib in adipose tissue of obese mice.....	35
4.2 Produto 2: Celecoxib reduces liver lipogenesis in high-fat fed mice.....	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	82

INTRODUÇÃO

Hábitos de vida relacionados aos avanços tecnológicos têm levado à diminuição da prática de atividades físicas comuns, o que, aliado a mudanças comportamentais e dietéticas, tem contribuído para uma desregulação do balanço energético e das vias metabólicas essenciais para o organismo humano (1).

Este desequilíbrio metabólico tem ocorrido em razão da população brasileira, assim como a mundial, estar passando por um fenômeno denominado transição nutricional, causado por mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas. Esta transição trouxe como consequência o aumento mundial da prevalência da obesidade, que vem sendo considerada uma verdadeira epidemia (1).

A obesidade está associada a uma resposta inflamatória crônica, caracterizada pela produção anormal de adipocinas e pela ativação de algumas vias de sinalização pró-inflamatórias (2). Por outro lado, uma redução do peso corporal é acompanhada por uma diminuição ou até mesmo uma normalização destes parâmetros biológicos. Esta associação é significativa e diversos modelos animais sugerem que estes processos inflamatórios têm uma relação causal com a obesidade e suas co-morbidades como a resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (3).

As alterações no organismo resultantes de todo este processo estão inseridas no contexto da chamada síndrome metabólica (SM). A síndrome metabólica está comumente associada a um conjunto de doenças metabólicas como hipertensão, aterosclerose, dislipidemias e diabetes, caracterizados, principalmente, pela hiperinsulinemia e por diferentes intensidades de resistência à insulina (RI), processo este agravado pela obesidade (4-6).

A expressão hepática desta síndrome é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), caracterizada pela deposição de gordura nos hepatócitos de indivíduos com pouca ou nenhuma ingestão de álcool (7).

O objetivo do tratamento da deposição de gordura nos hepatócitos tem sido melhorar a esteatose e impedir o desenvolvimento de fibrose, que pode evoluir para cirrose e suas complicações. Para este fim, deve ser controlado o colesterol, a glicemia, a dislipidemia, a

hipertensão, o peso corporal e as mudanças de drogas que podem ser prejudiciais à função hepática. Além da modificação de estilo de vida que é subjacente à terapia bem sucedida.

Desta forma, não existem tratamentos específicos para esteatose hepática. A terapia com drogas tem sido focada nos fatores de risco tais como a obesidade, a diabetes, a sensibilidade à insulina, na melhora da função das células β e na função de hepatócitos (8).

Diversos componentes, como os inibidores da ciclooxigenase -2 (ICOX-2) têm apresentado efeitos positivos na resposta inflamatória em modelos de animais obesos, demonstrando-se viáveis na modulação de entidades patológicas envolvidas na síndrome metabólica (9).

Neste contexto, os resultados do presente trabalho permitem conhecer o efeito da administração de inibidores da COX-2, celecoxibe, em modelos animais de obesidade / síndrome metabólica e esteatose hepática, sendo de fundamental importância como testes pré-clínicos de avaliação de efeitos, abrindo a perspectiva de desenvolvimento de novos medicamentos para combater estas doenças cardiometabólicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo-2, celecoxibe, sobre citocinas inflamatórias e sistema renina-angiotensina no tecido adiposo e sobre a lipogênese na esteatose hepática em modelo murino de obesidade.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a regulação glicêmica por meio de testes de sensibilidade insulínica e tolerância a glicose nos diferentes grupos, alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica isolada ou alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com inibidor da ciclooxigenase do tipo-2, celecoxibe, na obesidade.
- Avaliar as alterações ponderais e os níveis séricos lipídicos (triglicérides, colesterol total e HDL), nos diferentes grupos e o efeito do tratamento com celecoxibe, inibidor seletivo da enzima ciclooxigenase do tipo 2, após serem alimentados com dieta hiperlipídica, na obesidade e na esteatose hepática.
- Avaliar o efeito do tratamento oral com inibidor da COX-2 (celecoxibe) sobre mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α), na obesidade; componentes do sistema renina-angiotensina (AGT e ECA), também na obesidade; e compostos envolvidos na via lipogênica (PPAR- γ , SREBP-1c, ACC e FAS), na esteatose hepática.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Síndrome metabólica

A prevalência da síndrome metabólica (SM) é alta em vários países do mundo, na maioria das vezes, ultrapassando 20% do total da população adulta (10, 11), chegando a mais de 80% entre os pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) (12). Beigh *et al.* (13) sugeriram que a SM estava presente em ambos os sexos, masculino e feminino, correspondente a 29% e 23%, respectivamente. No Brasil, a ocorrência desse agravo também é, constantemente, superior a 20% (14-16).

É relevante destacar que frequências semelhantes a essa têm sido observadas em comunidades rurais. Tal fato é atribuído à incorporação de hábitos de vida urbanos pelos habitantes dessas regiões, como o maior consumo de alimentos de alto valor calórico e menor nível de atividade física (17, 18).

O conjunto de fatores de risco que identificam a síndrome metabólica foi reconhecido, pela primeira vez, em 1983 (19), estabelecendo a patogênese da síndrome como multifatorial, na qual a obesidade, a vida sedentária, a dieta e a interação com fatores genéticos são os responsáveis pelo seu aparecimento. Posteriormente, mutações e polimorfismos nos genes associados com a resistência à insulina, anormalidades nos adipócitos, hipertensão e alterações lipídicas passaram a ocupar papel de destaque na etiopatogenia dessa síndrome (20, 21). Considerando-se que os estudos não estabeleceram a presença de resistência à insulina como único fator causal de todos os componentes da síndrome (22) e levando-se em conta a diversidade de fatores relatada, em 1998, a Organização Mundial da Saúde definiu o termo unificado de síndrome metabólica como um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular que está normalmente associado à resistência insulínica, à deposição central de gordura (23), à dislipidemia, à hipertensão arterial, à hiperinsulinemia, à intolerância à glicose, ao estado pró-inflamatório e pró-trombótico, culminando em doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes (24), estando ainda frequentemente associada a alterações hepáticas mais graves (25, 26).

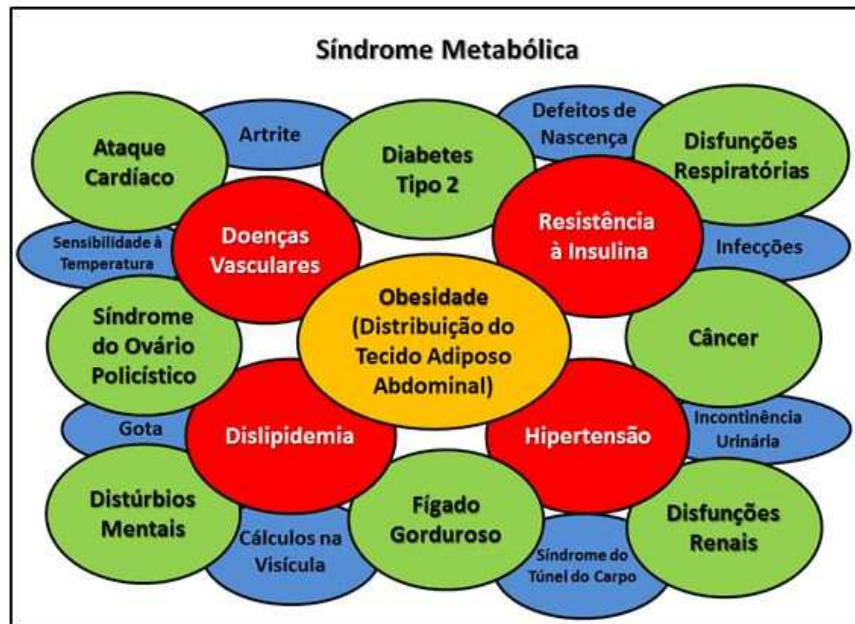


Figura 1: Fatores de risco associados à síndrome metabólica (27).

3.2 Obesidade

A obesidade é considerada como um grande problema de saúde pública, que atinge proporções epidêmicas em muitos países (28). A organização Mundial da Saúde (2014) mostra que a prevalência da obesidade em todo o mundo aumentou enormemente desde 1980 (Figura 2 e 3) (29).

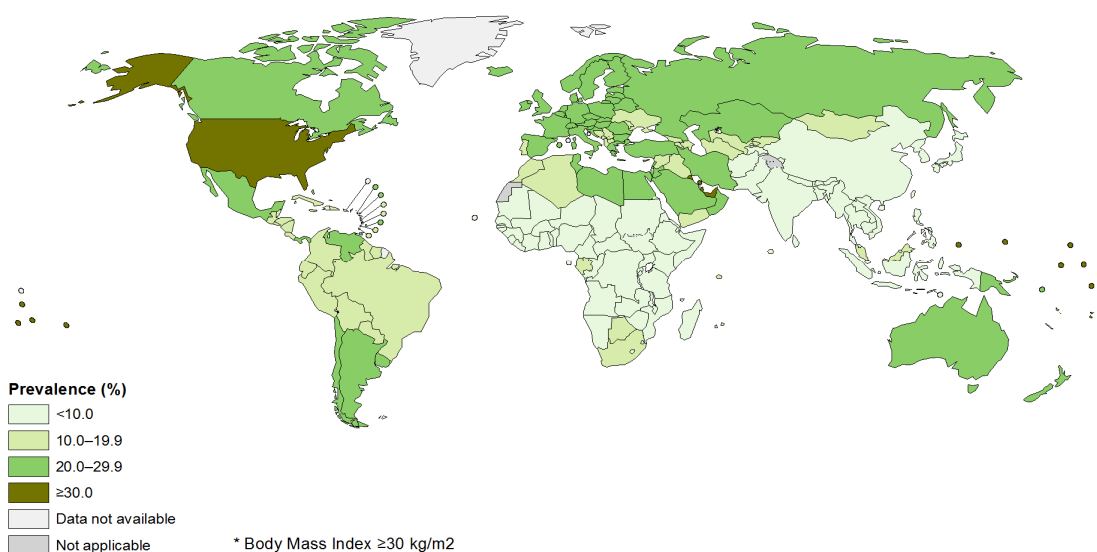


Figura 2: Prevalência da obesidade, indivíduos do sexo masculino com idade superior a 18 anos, 2014 (29).

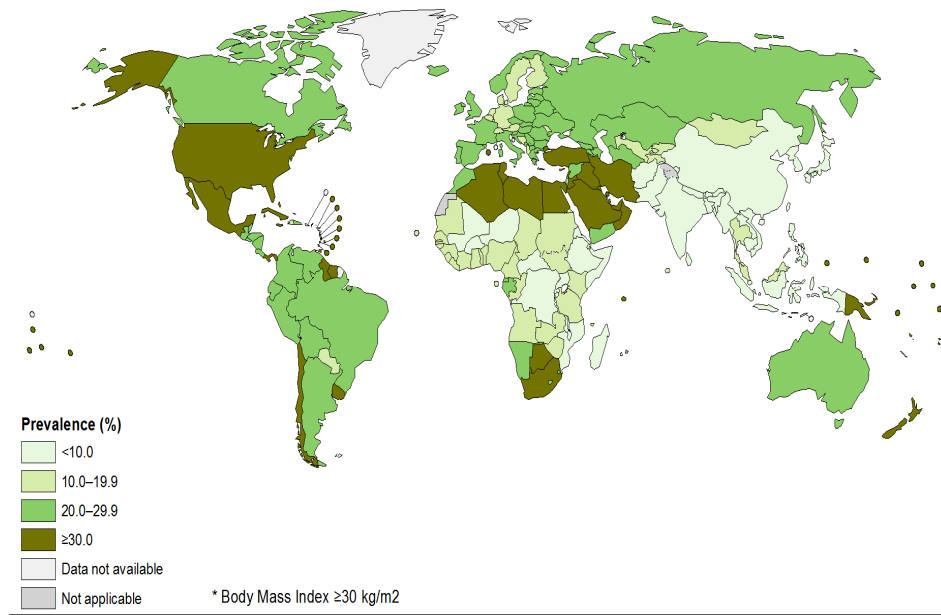


Figura 3: Prevalência da obesidade, indivíduos do sexo feminino com idade superior a 18 anos, 2014 (29).

O relatório indica que 39% e 13% das pessoas com 18 anos ou mais foram sobrepeso e obesas, respectivamente, em 2014 (30).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (2014), o total de obesos adultos tem crescido a cada ano, chegando a 17,9% (Figura 4) (30).

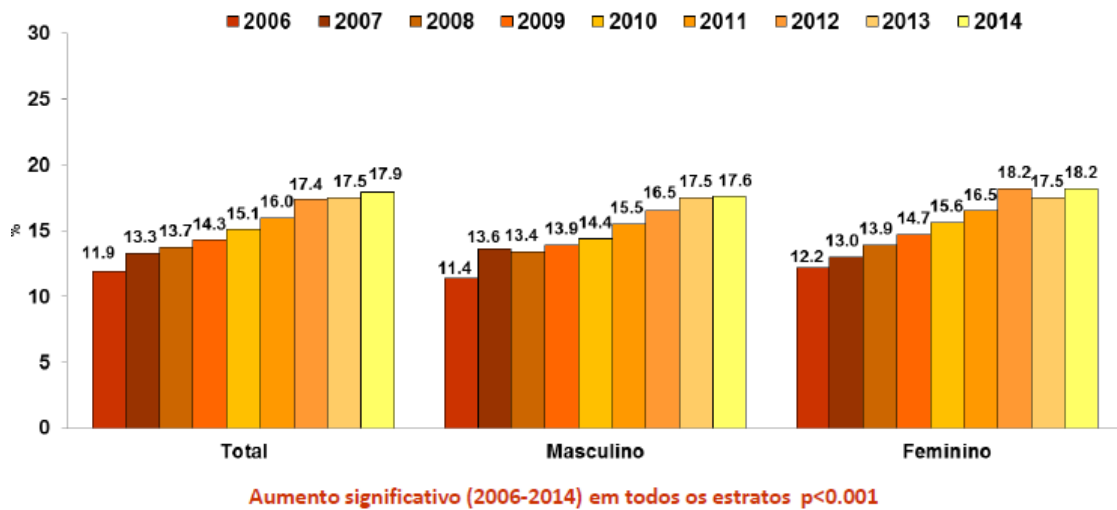


Figura 4: Evolução da frequência de obesidade, de 2006 a 2014, no Brasil, segundo Ministério da Saúde (30).

A determinação da etiopatogenia da obesidade representa um verdadeiro desafio para os serviços de saúde, provavelmente devido ao seu caráter marcadamente heterogêneo e multifatorial. Apesar de ser bem aceito que o estilo de vida e outros fatores ambientais tenham influência sobre os determinantes da obesidade, sabe-se que sua suscetibilidade é, em parte, determinada pelo sinergismo entre genes e meio ambiente, o que significa que um ambiente obesogênico é tipicamente necessário para a expressão do fenótipo (31).

A obesidade é acompanhada de uma inflamação crônica de baixo grau, que afeta negativamente a função de vários tecidos e órgãos, cuja origem parece ser o próprio tecido adiposo, sendo identificado como um órgão secretor (32).

De acordo com esta teoria, o acúmulo de lipídeos leva ao aumento da expressão de genes que codificam citocinas, quimiocinas, e moléculas de adesão em adipócitos, atraindo células do sistema imunológico que contribuem para a síntese de mediadores pró-inflamatórios (32-34). O tecido adiposo secreta múltiplos peptídeos bioativos, que não influenciam apenas a função adipocitária, mas também afetam várias vias metabólicas por meio da circulação sanguínea (35). Cada adipócito produz uma pequena quantidade de substâncias, porém, como o tecido adiposo pode ser considerado o maior órgão do corpo, o conjunto desses fatores produz um grande impacto nas funções corporais, contribuindo, direta ou indiretamente, para processos como a aterosclerose, hipertensão arterial, dislipidemias, resistência insulínica e diabetes tipo 2, representando o elo entre adiposidade, síndrome metabólica e DCV (36, 37). No entanto, a identificação dos produtos secretados pelo tecido adiposo somente foi possível com o desenvolvimento de sofisticadas técnicas moleculares (38).

O excesso de gordura na porção superior do abdômen pode ser secundário ao maior depósito de tecido adiposo no peritônio (gordura intra-abdominal ou visceral) e/ ou no tecido subcutâneo. As contribuições específicas de cada compartimento para a ocorrência de resistência à insulina, dentre outras alterações metabólicas, têm sido foco constante na literatura (4), uma vez que, não está claro quais os tipos de tecido adiposo, subcutâneo ou visceral, executam papel dominante na síntese de mediadores pró-inflamatórios (39).

Apesar das evidências de que o tecido adiposo subcutâneo desempenha um papel na resistência à insulina, a gordura visceral correlaciona-se de forma independente com todos os critérios utilizados para definição da síndrome metabólica (40), o que sugere uma importante participação desse compartimento nos seus mecanismos fisiopatológicos.

Alguns trabalhos têm mostrado a participação da obesidade visceral na diminuição da captação de glicose mediada pela insulina, sugerindo uma relação com a RI, através de mecanismos envolvendo adipocinas (41).

Há também uma correlação inversa da adiponectina, com o TNF- α , (pró inflamatório), cuja expressão é proporcional ao grau de resistência à insulina que pode ser um fator inibidor da atividade promotora do gene da adiponectina, podendo explicar, em parte, a associação inversa observada entre o acúmulo de gordura visceral, a secreção elevada de TNF- α e os níveis diminuídos de adiponectina (42), além da ativação da enzima conversora de angiotensina (ECA), afetando a função hormonal do tecido adiposo (43, 44).

A adiponectina é um hormônio secretado pelos adipócitos e possui propriedades antilipolíticas e anti-inflamatórias (45), sendo considerada um marcador da SM em estudos que demonstraram seus níveis diminuídos em razão da elevação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (46), os quais contribuem para a resistência à insulina e disfunção vascular (47), além de promoverem a lipólise do tecido adiposo, resultando num aumento de ácidos graxos livres (AGL) na circulação (48).

3.3 Inflamação na obesidade

Durante décadas, o tecido adiposo foi considerado como um órgão com papel crucial apenas na regulação da homeostase dos ácidos graxos do organismo. Em períodos de abundância de calorias, os ácidos graxos livres são armazenados na forma de triacilglicerol, através da sua esterificação com glicerol e, em tempos de escassez de energia, esses são liberados de volta para a circulação (49).

Hoje já se sabe que além destas funções, este tecido é capaz de produzir outras substâncias que irão influenciar diversas funções fisiológicas de uma maneira geral.

A primeira ligação entre obesidade e inflamação foi sugerida quando se descobriu que o TNF- α - uma citocina com atividade pró-inflamatória identificada como um regulador negativo da transdução do sinal de insulina - é expresso no tecido adiposo de roedores obesos, passando a ser considerado um órgão secretor (50), pois o tecido adiposo, tanto o subcutâneo quanto o visceral, possui, além de capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central e com o trato

gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições tanto autócrinas quanto parácrinas ou endócrinas.

Em associação a este fato, indivíduos com obesidade visceral possuem maiores concentrações de mediadores inflamatórios sistêmicos, quando comparados a indivíduos com obesidade subcutânea. A contribuição deste depósito para a inflamação sub-clínica observada em alguns indivíduos obesos pode ser a causa da relação entre adiposidade visceral e síndrome metabólica (51).

Em uma perspectiva geral, respostas inflamatórias são disparadas com um propósito de defesa do organismo, reparo tecidual ou celular em função de condições de estresse. No entanto, quando a inflamação tecidual se torna crônica e permanece não resolvida (como é o caso da obesidade), ela progride, na maioria das vezes, para uma condição patofisiológica e sistêmica, caracterizada por resistência à insulina, hiperglicemia, e desenvolvimento do diabetes.

Isto decorre da hipertrofia dos adipócitos, isto é, do aumento do volume da célula adiposa devido ao acúmulo excessivo de triacilgliceróis, especialmente os viscerais, que são mais ativos, que está relacionada com a resistência ao efeito antilipolítico da insulina e ao aumento da ação das catecolaminas, levando à elevação do fluxo dos ácidos graxos não esterificados para o fígado, via sistema porta, culminando em maior produção de glicose hepática, redução da degradação de apolipoproteína B e aumento da produção de triacilgliceróis. Todas essas alterações descritas (nos mecanismos de síntese e oxidação de lipídios, bem como sua função secretória) são fatores que indicam o envolvimento do tecido adiposo com a fisiopatologia da SM (52).

Esta expansão induz à infiltração e ativação de macrófagos, caracterizada por uma produção aumentada de adipocinas pró-inflamatórias como proteína C reativa (PCR), TNF- α e IL-6, culminando no aumento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade (Figura 5) (53, 54), que impede a correta sinalização intracelular da insulina e propicia um estado de resistência a este hormônio (55). Este perfil inflamatório do tecido adiposo induz a secreção de diversas substâncias pelos adipócitos, das quais mais de cinquenta produtos já foram isolados e caracterizados (56). Isso é acompanhado por um aumento da liberação de ácidos graxos livres e desregulação da secreção de vários produtos, dentre eles a leptina, a adiponectina, a resistina e a proteína ligante de retinol (RBP4) (49).

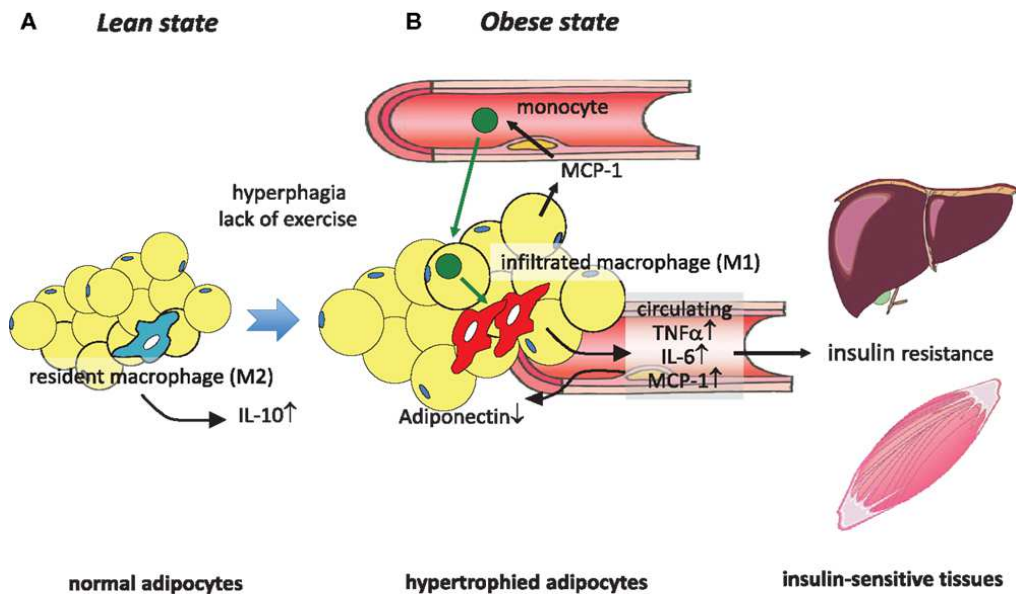


Figura 5: Expansão do tecido adiposo e inflamação (54).

Nesse sentido, estudos experimentais mostraram que ratos obesos aumentam não apenas os níveis de TNF- α , mas também de outras adipocinas pró-inflamatórias incluindo as interleucinas 6 e 1-beta, quimiocina ligante CC 2 (CCL2), dentre outras (34). Em contrapartida, estes animais diminuem os níveis de adipocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (57).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória associada às condições de obesidade e resistência à insulina. Esta citocina tem sido descrita com capacidade de atuar também na oxidação de ácidos graxos em hepatócitos e músculos esqueléticos por meio de efeitos mediados pela indução da proteína fosfatase 2C e supressão da quinase ativada por AMP (AMPK), reduzindo-a. Estas taxas diminuídas são acompanhadas por acúmulo de lipídios bioativos, como triacilgliceróis, que por sua vez, são conhecidos por ativar a proteína quinase C e inibir a função do substrato do receptor de insulina (IRS) (58), agravando ainda mais o quadro.

Originalmente pensava-se que a razão para o aumento observado dos níveis séricos desta citocina em indivíduos obesos fosse a superprodução realizada pelo excesso de tecido adiposo. Entretanto, tem sido reconhecido que esse aumento seja devido à infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo (59).

A IL-6 pode agir de formas distintas, dependendo da sua concentração orgânica, tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central, influenciando o peso corporal, a homeostase energética e a sensibilidade insulínica, induzindo a hiperlipidemia, a hiperglicemia e a resistência insulínica, e suprimindo a expressão de adiponectina e receptores

e sinalizadores de insulina, se mostrando elevada em obesos e com níveis plasmáticos diminuídos em situação oposta, como na perda de peso (60).

3.4 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) consiste em uma cascata na qual o angiotensinogênio (Agt) é enzimaticamente clivado em angiotensina I (Ang I) pela renina. A Ang I é, então, clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang II) (61). Tanto a Ang I quanto a Ang II podem ser convertidas em Angiotensina (1-7) (Ang 1-7) pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (36,62) (Figura 6).

O SRA é um importante mediador entre a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares (63). Ele corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrolítica do organismo, sendo visto como um sistema endócrino cujo principal peptídeo ativo, a Ang II, é responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados (64).

Desta forma, já está bem estabelecido que a ativação do braço produtor de Ang II do SRA é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares (37), pois promove todas as características da síndrome metabólica: hipertensão, hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e obesidade (65). Na obesidade, este sistema é ativado no tecido adiposo, levando à hipertensão arterial e RI (66).

Diversos estudos têm demonstrado a presença e a importância de SRA locais em diversos tecidos. A utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular permitiu a descoberta de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais RNAs mensageiros desses componentes (Agt, renina, ECA) em vários tecidos, como glândulas adrenais, rins, coração, vasos, tecido adiposo e cérebro, deu sustentação à existência de SRAs locais (67).

Por muitos anos acreditava-se que o tecido adiposo (TA) era apenas capaz de estocar o excesso de energia em forma de triglicerídeos e liberá-lo como ácidos graxos (68). No entanto, esse paradigma foi quebrado e já é amplamente aceito que o TA é, também, um órgão endócrino (69) capaz de secretar vários hormônios e citocinas que contribuem no desenvolvimento da obesidade e outras patologias associadas como diabetes *mellitus* do tipo 2 (70). O Agt, primeiro componente do SRA neste tecido, identificado no fim da década de 1980, tem expressão maior no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo,

tanto em roedores quanto em humanos (71, 72).

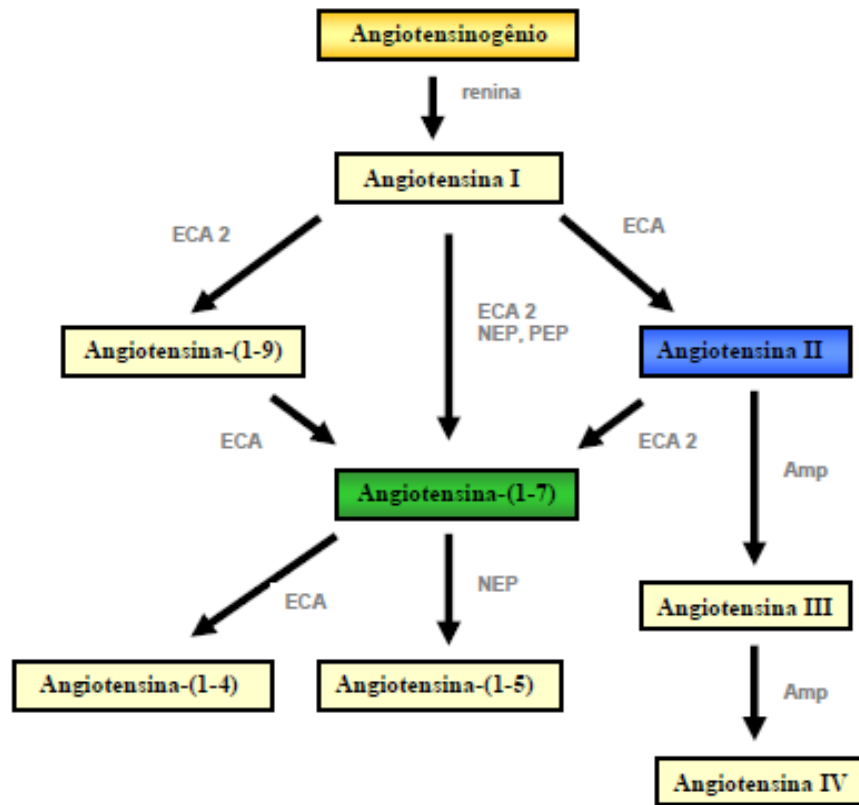


Figura 6: Componentes do Sistema Renina Angiotensina (73).

Posteriormente, outros vários componentes foram descobertos, uma vez que o tecido adiposo é capaz de produzir diversos componentes do SRA (74) [enzima conversora de Angiotensina I (ECA), enzima conversora de angiotensina II (ECA2) (75) e o receptor de angiotensina AT1] (76).

Além da produção dos componentes do SRA e da ação local no tecido adiposo, seus produtos podem ser liberados na circulação alterando a fisiologia sistêmica. Muitos desses efeitos fisiológicos, citados do SRA, estão envolvidos na fisiopatologia da obesidade, apesar da funcionalidade deste sistema no tecido adiposo ainda ser controversa (77).

O controle da ingestão de alimentos e da pressão arterial envolvem sistemas altamente complexos, que integram sinais centrais e periféricos, alguns dos quais podem afetar ambas, a homeostase energética e a pressão arterial. O SRA é um importante controlador da pressão arterial e inúmeros estudos sugerem seu envolvimento na hipertensão associada à obesidade (78) e na atividade da renina plasmática que se encontra aumentada na maioria dos obesos, estando associada à ativação da ECA renal (79).

Diversos trabalhos têm mostrado que a perda da função em qualquer componente individual do SRA, testados até o momento, oferece proteção contra a obesidade induzida por dieta e resistência à insulina. Ou seja, Agt, renina, ECA, AT1R ou roedores nocaute AT2R são magros e sensíveis à insulina (80,81), demonstrando que a manipulação do SRA através da superexpressão ou supressão possui efeitos subsequentes sobre a obesidade e a sensibilidade à insulina.

No entanto, o SRA apresenta também efeitos relacionados com a Ang-(1-7), os quais são geralmente contrários aos da Ang II, sendo o efeito anti-hipertensivo o mais evidente.

Em 2003, foram apresentadas evidências de que o receptor Mas é o receptor da Ang-(1-7) - (82). O efeito anti-hipertensivo da Ang-(1-7) parece ser devido a vários mecanismos diferentes.

3.5 Esteatose Hepática

A expressão hepática da síndrome metabólica é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma condição clínico-patológica emergente, caracterizada por acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos, excedente a 5-10% do peso do fígado (83), que acomete indivíduos com pouca ou nenhuma ingestão de álcool (7), sendo, atualmente, uma das causas mais comuns de doença hepática crônica.

Sua prevalência mundial ainda não foi determinada (84). Estima-se que esteja entre 20% a 30% da população mundial, crescendo alarmantemente entre a população obesa, na qual alcança 75% a 80%. Nos obesos graves ($IMC \geq 35\text{kg/m}^2$) atinge 90% a 100% (85, 86), mostrando-se, portanto, aumentada de maneira importante, principalmente nos obesos (87).

Esta predominância na obesidade se deve ao fato desta condição clínica acontecer devido à deposição de triglicerídeos no tecido adiposo, no qual ao se atingir o limite de expansão, promove o acúmulo ectópico de lipídeos, o que inclui o fígado, sendo este acúmulo identificado como obesidade visceral (88). O excesso de adiposidade, particularmente na região abdominal (obesidade central), é fortemente associado com DHGNA e RI. Isso predispõe a ocorrência de hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e inflamação, fatores presentes na chamada SM. A associação entre essas situações clínicas e o excesso de tecido adiposo envolvem mecanismos metabólicos e inflamatórios (89).

No entanto, alguns trabalhos têm associado a DHGNA à síndrome metabólica mesmo em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) normal. Em um estudo com indivíduos não diabéticos e com DHGNA, a síndrome metabólica esteve presente em 18% dos pacientes

com peso normal para altura e 67% dos obesos (90). A relação obesidade-DHGNA, portanto, não é perfeita. Há obesos mórbidos com histologia hepática normal e, da mesma forma, há pacientes em que há apenas esteatose, sem obesidade (91).

O fato é que a obesidade parece não ser o bastante para levar à doença. Outros fatores estão envolvidos, como a distribuição regional de gordura e a inflamação do tecido adiposo, como já demonstrado em alguns trabalhos que sugerem a inflamação intestino-derivada estar ligada à gênese da DHGNA. Medicamentos, cirurgias abdominais, toxinas ambientais, doenças genéticas (92) e alguns padrões dietéticos como a deficiência de vitamina D e a dieta de origem animal (93, 94) também acarretam o desenvolvimento da referida condição.

Sabe-se que a esteatose hepática é uma condição benigna, que representa o estágio inicial da doença gordurosa não alcoólica do fígado, a qual compreende um amplo espectro de condições patológicas (95). No entanto, apenas uma pequena parcela desses pacientes pode desenvolver estágios mais avançados da doença, como a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), um estado mais grave que pode evoluir para fibrose e cirrose (96).

Os mecanismos patogênicos indicam que a insulinoresistência, o metabolismo lipídico anormal e a desregulação de citocinas/adipocinas estão profundamente envolvidos no desenvolvimento da doença (97) e conduzem à acumulação de triglicerídeos e ácidos graxos nos hepatócitos. Portanto, o teor de gordura hepática elevada e a liberação de ácidos graxos livres de adipócitos disfuncionais resultam em lipotoxicidade, causada pelo acúmulo de metabólitos tóxicos derivados de triglicerídeos em tecidos ectópicos (tais como fígado, músculo, células beta pancreáticas) com subsequente ativação de vias inflamatórias, disfunção celular e lipoapoptose (98).

Desta maneira, esses mecanismos podem ser facilmente compreendidos através do ciclo dos ácidos graxos livres (AGL), entre o tecido adiposo e o fígado, resultando no aumento da entrada e retenção de AGL no hepatócito; no aumento da síntese de AGL no fígado; na beta-oxidação insuficiente dos AGL por disfunção mitocondrial; na síntese ou secreção deficiente de VLDL ou na peroxidação de lipídeos na membrana do hepatócito e produção de citocinas atribuídas ao *stress* oxidativo que são, em parte, responsáveis pela progressão de esteatose para esteato-hepatite e cirrose (99). Qualquer defeito nesse processo resultará na acumulação de triglicerídeos dentro do hepatócito, que clinicamente se apresenta como infiltração de gordura do fígado (100), o qual está exposto diretamente tanto às citocinas e aos ácidos graxos livres liberados pelo tecido adiposo visceral, quanto aos mesmos metabólitos liberados sistemicamente pelo tecido adiposo de outras regiões que alcançam o fígado de forma já diluída pela circulação sistêmica (101), gerando, dessa forma, espécies

oxidantes reativas (102), responsáveis por causar alterações na membrana celular, determinando a liberação de TNF- α a partir dos hepatócitos, células de Kupfer e adipócitos (103). O TNF- α é sabidamente uma citocina pró-inflamatória que dará início ao processo inflamatório, o qual culminará com fibrose, e, mais tardiamente, com desarranjo estrutural do tecido hepático.

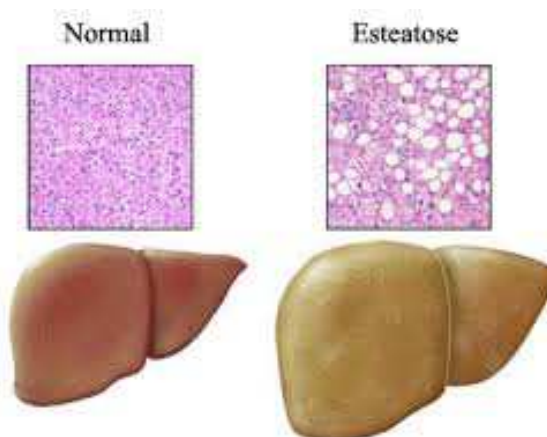


Figura 7: Histologia Hepática (104).

Porém, ainda não está compreendido se é o processo de acumulação de triglicerídeos no hepatócito que leva à subsequente infiltração de células inflamatórias, característica do NASH, ou se a resposta inflamatória observada no fígado é suscitada por outros estímulos capazes de provocar disfunção no hepatócito, que conduza a esteatose (105). No entanto, já foi mostrado que a expressão mais elevada de TNF- α estaria presente em pacientes com NASH comparativamente com doentes com esteatose hepática simples, indicando que os níveis elevados de citocinas estão relacionados com uma evolução pior do quadro, o que foi confirmado por estudos experimentais que descreveram que a produção de TNF- α , induzida por ácidos graxos livres, promove a lipotoxicidade hepática (106).

Este processo se inicia com o desenvolvimento da obesidade, que atua como um estado pró-inflamatório, uma vez que promove o aumento de mediadores da fase aguda, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a indução da inflamação por meio do aumento do estresse oxidativo gerado pela alta ingestão de glicose e gorduras (107).

O desenvolvimento destas características relacionadas à lipotoxicidade do fígado pode ter a participação das proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol do tipo-1 (SREBP-1) conforme estudo prévio (108), no qual foi demonstrado a regulação por SREBP-1c da síntese de ácidos graxos livres e triglicerídeos em mamíferos. O SREBP-1 tem sua

atividade regulada positivamente pela ativação do receptor de peroxisoma ativado por proliferador (PPAR), que, também, regula a obesidade em roedores, aumentando a oxidação de ácidos graxos hepático e diminuindo os níveis circulantes triglicérides responsáveis pela hipertrofia das células adiposo e hiperplasia (109).

A regulação positiva de PPAR- γ por dietas ricas em gordura e em carboidratos maximiza a esteatose hepática através da indução de fatores lipogênicos, que estão implicados na síntese dos ácidos graxos, provocando lipogênese de novo e consequente deposição de gotículas lipídicas dentro de hepatócitos.

Assim, PPARs como alvo para tratar DHGNA parece uma abordagem frutífera como agonista de PPAR- α aumentando beta-oxidação mitocondrial, além de reduzir a lipogênese. PPAR- β / Δ melhora a resistência à insulina hepática, diminuindo a gliconeogênese hepática na fase pós-prandial, enquanto a ativação total de PPAR- γ pode exercer efeitos nocivos, estimulando a lipogênese hepática. No entanto, a ativação parcial PPAR- γ leva a benefícios, mediada principalmente por aumento da expressão de adiponectina e diminuição da resistência à insulina. Não obstante, outros estudos são necessários visando abordagens para o tratamento de DHGNA de seres humanos em todo o mundo, tendo como alvo os PPARs (110).

É possível verificar, portanto, que a lipogênese é regulada por uma série de fatores, tais como nutrição, hormônios, fatores de transcrição nuclear e enzimas lipogênicas (111), sendo que duas delas possuem evidências consideráveis em ter um papel chave na regulação da biossíntese de ácidos graxos em tecidos animais. À semelhança do PPAR, o acetil- CoA carboxilase (ACC) atua como uma enzima limitante da velocidade de lipogênese, e o ácido graxo sintase (FAS) como catalisador da última etapa na via lipogênica (112) (Figura 8).

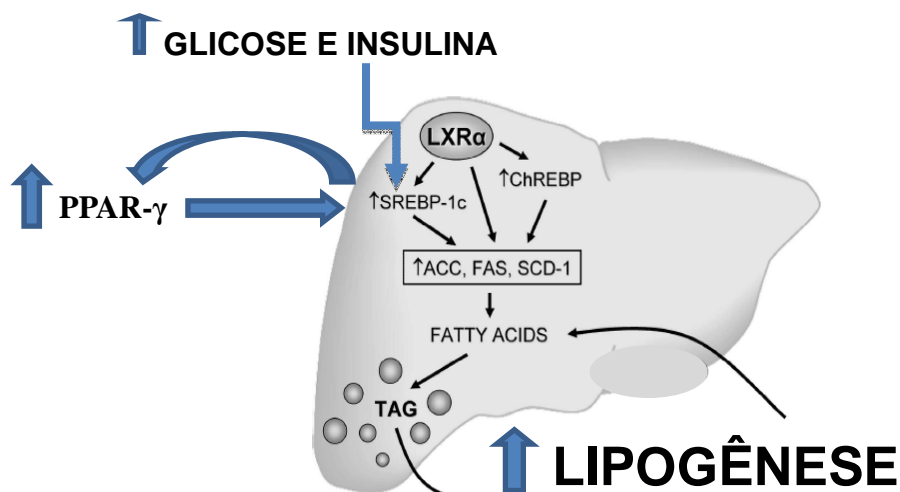


Figura 8: Via lipogênica no fígado, adaptado (113).

3.6 Antiinflamatórios não estereoidais - Inibidores seletivos da Ciclooxigenase – 2

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem um grupo heterogêneo de compostos que apresentam efeitos terapêuticos similares para o tratamento da dor, inflamação e febre causada por várias condições fisiológicas ou patológicas, tendo efeitos antiinflamatório, analgésico e antipirético (114).

A atividade dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) se baseia principalmente na inibição da atividade das isoformas da enzima ciclooxigenase (COX). Essas enzimas são também conhecidas como sintase de prostaglandina H2 e tem importância fundamental na produção de prostanóides como prostaglandinas, envolvidos no desenvolvimento de quadro inflamatório e de dor (115), a partir do ácido araquidônico (AA) (Figura 9). Porém, o uso prolongado dos AINEs pode levar a efeitos colaterais como lesões gástricas no trato gastrointestinal superior, no sistema vascular, além de nefrotoxicidade (116) e insuficiência cardíaca congestiva. Os AINEs seletivos para COX-2 já se diferenciam pelas baixas taxas de danos gastrointestinais (117), estando disponíveis no mercado os convencionais e aqueles seletivos para COX-2, podendo este último ser preferencial ou específico para COX-2 (118), já que os AINEs atuam sobre diferentes isoformas de ciclooxigenases, sendo duas, as mais conhecidas: COX-1 e COX-2. Registre-se que desde o início do presente século já se estuda também a COX-3 (119).

A COX-1 é encontrada constitutivamente expressa em vários tecidos e exerce papéis importantes na proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, regulação do fluxo sanguíneo renal e na homeostase vascular (120). Esta enzima é responsável pela formação dos prostanóides que, em condições fisiológicas, são responsáveis pela regulação da homeostasia, cuja concentração se encontra normalmente constantes. Porém, em alguns casos, pequenos aumentos podem ocorrer em resposta a estímulos por hormônios ou fatores de crescimento (121).

Por outro lado, a COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos normais (exceto para o sistema nervoso central, rins e vesículas seminais), mas é induzida por hormônios, fatores de crescimento e citocinas, após estímulo inflamatório, em vários tipos celulares desempenhando um relevante papel fisiológico (121), além de influenciar no desenvolvimento renal, secreção de renina, reprodução feminina, metabolismo ósseo, cicatrização de úlceras e feridas, inflamação, dor e febre, isquemia e promoção tumoral (122).

A COX-3, descrita por Chandrasekharan *et. al.* (2003) (123), pode ser responsável pelo mecanismo central da dor e da febre. Há ainda, demonstração sobre a possibilidade de

uma quarta forma, a COX-4, cuja real existência e função ainda não foram completamente demonstradas (124).

As COXs são enzimas com dupla função e cada uma delas possui duas atividades catalíticas distintas: a de ciclooxigenase e a de peroxidase. Apesar da semelhança estrutural partilhada pelas duas isoformas principais, as COXs diferem na regulação da sua expressão e nas atividades que executam na biologia e patologia dos tecidos. A COX-2 localiza-se na membrana nuclear e no retículo endoplasmático, enquanto a COX-1 apenas nas membranas do retículo endoplasmático. Estas duas enzimas são codificadas por genes diferentes, localizados em cromossomos diferentes (COX-1 pelo cromossomo 9 e a COX-2 pelo cromossomo 1) (125).

Estas enzimas agem sobre o AA liberado a partir da hidrólise de fosfolipídios da membrana plasmática realizada pela fosfolipase A2, que terá ação sequencial da síntese de prostanóides, as quais irão gerar a síntese das prostaglandinas que pode ser desencadeada por diversos estímulos fisiológicos e/ou patológicos, os quais ativam receptores de membrana, resultando na ativação da fosfolipase A2 (PLA2) (126). Estes prostanóides se difundem para fora da célula e exercem suas ações em vários tecidos por meio da ativação de receptores específicos. O AA liberado, metabolizado pelas ciclooxigenases (COXs) produz uma substância intermediária, prostaglandina G2 (PGG2), a qual rapidamente é convertida em prostaglandina H2 (PGH2) (127), cuja isomerização de PGH2 a PGE2 é catalisada por sintases específicas existentes em três isoformas sendo cada uma delas codificada por diferentes genes: a citosólica (cPGES), as microssomais PGES-1 (mPGES-1) e a PGES-2 (mPGES-2) (128).

A mPGES-1 é uma proteína microssomal pertencente a superfamília MAPEG (proteína associada a membrana envolvida no metabolismo de eicosanóides e glutatona). Em condições basais a mPGES-1 é fracamente expressa na maioria das células e tecidos, sendo sua expressão regulada por estímulos inflamatórios, tais como LPS, IL-1 β e TNF- α (129).

Curiosamente, muitos estudos têm indicado que o aumento da expressão de mPGES-1 está fortemente correlacionado com a indução de COX-2 e com a produção de PGE2. Além disso, mPGES-1 catalisa preferencialmente a síntese de PGE2 da COX-2 em vez de PGH2 derivados de COX-1. Portanto, acoplamento funcional entre COX-2 e mPGES-1 parece ser essencial para a produção de PGE2 durante a inflamação (130), demonstrando mais uma vez a forte relação da COX-2 neste processo.

No final dos anos 80 do século XX, o aumento de evidências de sérios eventos gastrointestinais adversos, como perfuração, ulceração e sangramento gastrointestinais com o

uso dos AINEs convencionais, levou a um progressivo declínio dos mesmos, especialmente no tratamento da osteoartrite. Porém, após 1998, a divulgação da nova classe de AINE com baixa toxicidade gastrointestinal, os inibidores seletivos de COX-2 (Coxibes) modificaram o padrão de recomendação de analgesia para o caso de osteoartrite (131), sendo alguns inibidores de Cicloxigenase-2 (COX-2) do tipo preferenciais (a exemplo do celecoxibe (Celebra®), do meloxicam, do carprofeno e do nimesulide) e outros de uma classe que compreende os inibidores específicos de COX-2 [como o rofecoxibe (Vioxx®), o valdecoxibe (Bextra®), o etoricoxibe (Arcoxia®) e o lumiracoxibe (Prexige®)] (132). Frise-se que o Celecoxibe foi o primeiro inibidor preferencial de COX-2 aprovado para tratar os sinais e sintomas de processos inflamatórios (133).

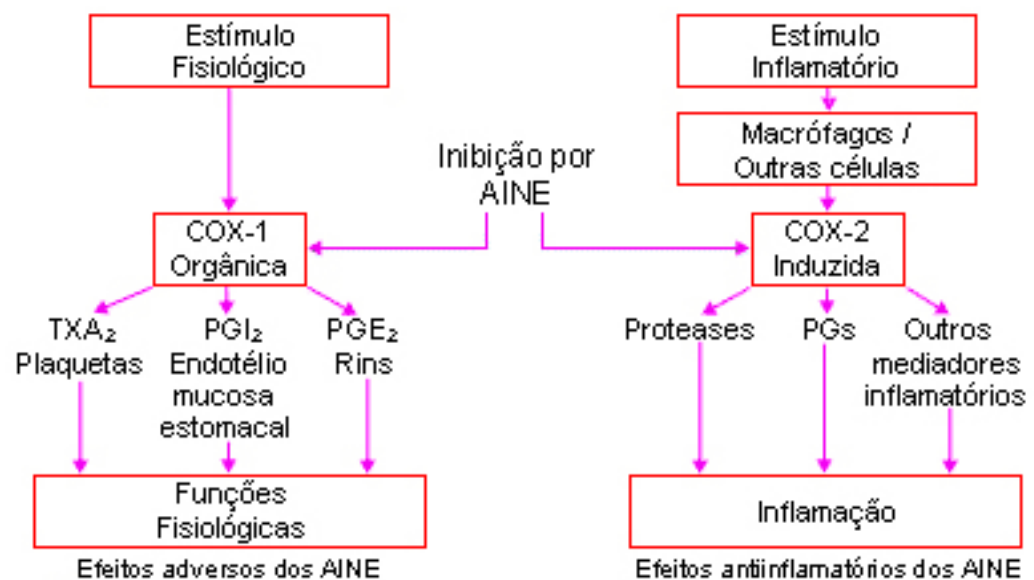


Figura 9: Mecanismo de ação geral dos AINEs (134).

Apesar da vantagem gastrointestinal, esse perfil seguro dos AINEs inibidores seletivos da COX-2 veio a deixar dúvidas depois que, em 2004, o rofecoxibe foi retirado do mercado devido ao aumentado risco de infarto do miocárdio (131).

No entanto, os resultados para celecoxibe são um pouco diferentes. Embora um estudo tenha encontrado associação dos efeitos colaterais cardiovasculares, como infarto, derrame e insuficiência cardíaca, ao prolongado tratamento com este fármaco, outro estudo clínico semelhante - experimental para a prevenção de pólipos adenomatosos espontâneos - não encontrou a relação citada entre o uso de celecoxibe e o aumento do risco cardiovascular. Assim, o FDA permitiu que o celecoxibe permanecesse no mercado, mas exigiu que o

medicamento tivesse uma tarja modificada chamando a atenção para o possível risco cardiovascular, assim como os riscos para o trato gastrointestinal e para a pele (135).

Diante disso, os antiinflamatórios não esteroidais, convencionais ou inibidores preferenciais ou seletivos COX-2, ainda são largamente utilizados como analgésicos nas dores agudas e para o alívio de dores crônicas músculo-esqueléticas e no tratamento das artrites (136).

Apesar de ser considerado que o principal mecanismo de ação desses medicamentos se dê pela diminuição da produção das prostaglandinas (PGs), admite-se que atuem também induzindo a apoptose, ativando os PPAR- α e PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors α and γ*) e inibindo a agregação e a degranulação de neutrófilos (137, 138).

Por outro lado, vários trabalhos mostram a relação da COX-2 em diversas situações patológicas. Segundo Huang *et al.* (2012), os ácidos graxos aumentam a expressão de COX-2 e TNF- α em macrófagos (139) e o COX-2 parece ser capaz de intervir na ação das citocinas envolvidas na inflamação crônica.

Em processos neoplásicos, também é descrito o envolvimento das COXs, em especial a isoforma COX-2, nos carcinomas colorretais, polipose adenomatosa familiar, carcinomas de mama e gástricos, mostrando que níveis elevados de COX-2 estão relacionados à proliferação celular, à supressão da apoptose, à indução da angiogênese e da metástase, ações que contam para a função oncogênica (140), estando o prognóstico dessas neoplasias diretamente relacionado com a expressão da COX-2. Da mesma maneira, em gliomas, a superexpressão da COX-2 está relacionada com o grau de malignidade do glioma e um pior prognóstico dos pacientes (141), refletindo um possível efeito terapêutico das drogas anti-COX-2 no tratamento do câncer, conforme demonstrado em estudos epidemiológicos que relacionam o uso prolongado de AINE com a redução de câncer colorretal, mama, pulmão, próstata e câncer gástrico (142).

No entanto, ainda não foram totalmente elucidados os mecanismos anti-tumorais, mas sabe-se que envolvem o bloqueio da atividade não específica das enzimas COX-1 e COX-2, suprimindo a produção de prostaglandinas e assim afetando a proliferação celular, apoptose, angiogênese, migração e metástase (143), já que a atividade tumoral parece ser desencadeada pelo excesso de produção de PGE2 decorrente de uma super regulação da COX-2(144).

Os níveis de COX-2, também foram descritos em vários estudos sobre obesidade, os quais encontram-se aumentados na obesidade, conforme visto por Berthou *et al.* (2015), em uma co-cultura entre adipócitos e macrófagos (145). Da mesma maneira, camundongos deficientes em COX-2 apresentaram adiposidade atenuada, estando associada com o

recrutamento de macrófagos, infiltração reduzida (9) e expressão aumentada de adiponectina no tecido adiposo (146). A administração oral de Vioxx, um inibidor seletivo de COX-2, resultou em desenvolvimento reduzido do tecido adiposo, associado com uma ingestão alimentar reduzida e adipócitos menores (147).

Assim, a obesidade modula a expressão das enzimas que sintetizam prostaglandinas (PG) e seus receptores, provavelmente, através de alterações induzidas por adipogênese na expressão destes transcritos (148). A prostaglandina E2 (PGE2) têm emergido como um potente regulador da inflamação e funções dos adipócitos em obesos, sendo sintetizada através das ciclooxigenases, mas as vias de sinalização inflamatórias que controlam a expressão de COX-2 e a produção de PGE2 em adipócitos permanecem mal definidas (149). Estas proteínas parecem alterar a função do tecido adiposo, agindo como moduladores da função de PPAR- γ (150, 151).

Contrariamente, outro grupo de pesquisadores encontrou um aumento de gastos energéticos sistêmicos por indução do tecido adiposo marron e proteção contra a obesidade induzida por dieta rica em gordura em animais na superexpressão de COX-2 (152). Assim como em hepatócitos, a expressão constitutiva de COX-2 humano (hCOX-2) protege contra a adiposidade e inflamação (153).

Assim, sabendo dos efeitos dos antiinflamatórios inibidores seletivos da COX-2 associado ao conhecimento das características fisiopatológicas da síndrome metabólica /obesidade e da esteatose hepática, torna-se instigador avaliar o possível efeito do celecoxibe nestas doenças.

4 PRODUTOS

4.1 Produto 1: *Renin-angiotensin system is modulated by celecoxib in adipose tissue of obese mice*, formatado segundo as normas para publicação do periódico Life Sciences, em processo de submissão.

4.2 Produto 2: *Celecoxib reduce liver lipogenesis in high-fat fed mice* formatado segundo as normas para publicação do periódico Digestive and Liver Diseases, em processo de submissão.

4.1 PRODUTO 1

Renin-angiotensin system is modulated by celecoxib in adipose tissue of obese mice

Jamille Fernandes Lula^{a,b}, Alanna Fernandes Paraíso^a, Alfredo Maurício Batista de Paula^{a,b}, Aline Hilzenderguer^c, André Luiz Sena Guimarães^{a,b}, Keila Lopes Mendes^{a,c}, Lucyana Conceição de Farias^{a,b}, Igor Viana Brandi^d, João Marcus Oliveira Andrade^a, Toni Ramos Alves de Souza^a, Sérgio Henrique Sousa Santos^{a,b,d*}

^a *Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Science, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.*

^b *Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.*

^c *Federal Institute of Education, Science and Technology of Minas Gerais (IFMG), São João Evangelista, Minas Gerais, Brazil.*

^d *Institute of Agricultural Sciences (ICA), Food Engineering, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

^e *Department of Pharmacology, University of Florida, Gainesville, Florida.*

* Correspondence to Sérgio Henrique Sousa Santos, Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Avenida Universitária, 1.000 – Universitário, 39.404-547, Montes Claros, MG, Brazil. E-mail: sergiosousas@hotmail.com.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) is a key contributing factor to obesity and related diseases. Several studies also have shown the relationship of obesity with cyclooxygenase -2. Based on these facts, this study aimed to investigate the effect of the oral administration of celecoxib, an anti-inflammatory selective inhibitor of cyclooxygenase-2 (ICOX-2), on the epididymal adipose tissue in mice with obesity induced by high-fat diet through the modulation of the renin-angiotensin system components and inflammatory markers. Mice male FVB / N were divided in 3 groups were fed with the following experimental diets: standard with first (ST); the second high-fat diet (HFD), both for four months; and third, which was fed HFD during four months, and treated with COX-2 inhibitor (HFD + ICOX) for two months at a dosage of 100 mg / kg body weight. They evaluated the body weight and food intake. Blood parameters (glucose tolerance, insulin sensitivity, High Density Lipoprotein-C, total cholesterol, glucose, and triglyceride levels) were also assessed. Real-time PCR was performed in epididymal adipose tissue samples to analyze the expression of angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE), Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). The main findings of the study proposes that celecoxib treatment results in weight loss in obese animals and reduce food consumption. This work shows decreased expression levels of AGT, ECA, TNF- α and IL-6 in the group receiving treatment (HFD+ICOX), still decreasing triglycerides and glucose. In conclusion, ICOX-2 may exhibit therapeutic potential in metabolic syndrome/obesity through the mechanisms of action on the renin-angiotensin system and components of inflammation.

Keywords: renin-angiotensin system, cyclooxygenase-2, nonsteroidal anti-inflammatory drug, obesity, interleukin-6, metabolic disorder.

Introduction

In obesity, the components of the renin-angiotensin system (RAS) have their production exacerbated by the adipocytes, affecting the systemic RAS and generating other consequences. Evidences demonstrate that genes associated with the RAS are overexpressed in the visceral adipose tissue of overweight human subjects (1).

In addition, as the adipose tissue inflammation is related to insulin resistance, it is possible to suggest that the over expression of the RAS components, specifically in the adipose tissue, is associated with obesity and insulin resistance (2).

Several papers describe the low-grade pro-inflammatory state as the pathogenesis of obesity (3, 4). There is evidence of a strong association between tissue arachidonic acid levels, precursor of several inflammatory mediators, and the prevalence of obesity in humans (5-7).

The arachidonic acid is the substrate for enzyme cyclooxygenase (COX) which corresponds to a class of enzymes with two main isoforms: COX-1, which is produced in a constitutive manner and associated, in most cases, with physiological functions, and COX-2, which is normally associated with pathological conditions. Their byproducts are involved in the perception of pain and inflammation (8).

Yet, the expansion of the white adipose tissue (WAT) stimulates the secretion of several proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β due to the tissue inflammation and consequent macrophage infiltration (9). Furthermore, the production of various inflammatory mediators to obesity related disorders have cyclooxygenase 2 as an important enzyme involved in this process. (10, 11).

Thus, the present study was conducted to investigate the effect of a selective inhibitor of COX-2, celecoxib, in the expression renin-angiotensin system components and inflammatory markers.

Materials and methods

Animals and experimental diets

Twenty-two FVB/N male mice, aged 8 weeks, were divided into 3 groups that were fed with the following experimental diets: Standard diet (ST) and high-fat diet (HFD) in a period of 180 days. The third group was fed for four months HFD and treated with COX-2 inhibitor (DH + ICOX) orally for two months at a dosage of 100 mg / kg body weight, which were mixed with the diet. The mice were housed in individual cages, under 12h light-dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00 h) and at a temperature of $25.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$. Food and water were given *ad libitum*. This study was approved by the Ethics Committee of Experimentation and Animal Welfare of Unimontes, Montes Claros, Brazil, by the process n° 022/2012.

Diets

The high-fat diet, composed of 39.0% carbohydrate, 17.0% protein and 44.0% fat, representing a total of 4.27 kcal per 1 g of diet, was prepared according to the protocols previously reported ([12](#)). Standard diet (Purina – Labina®), which was used for the regular maintenance of our mice, was composed of 50.3% carbohydrate, 41.9% protein and 7.8% fat, representing a total of 2.18 kcal per 1g of diet ([13](#)). All of the high-fat diet components were purchased from Rhooster® LTDA (São Paulo, São Paulo, Brazil).

The experimental groups were: ST, HFD and HFD+ICOX. The first group received standard diet (ST) and the second group was fed with high-fat diet (HFD) alone for 16 weeks. The third group of mice was fed with high-fat diet and treated with selective COX – 2 inhibitors (Celebra®) (HFD+ICOX) at a dosage of 100mg/kg of body weight, for 8 weeks (the dosage was corrected every week according with the animals body weight).

Not added the group with standard diet and celecoxib because of previous studies do not show differences in this group compared to the group that received standard diet only (14, 15).

Measurements of body weight, food intake and tissue collection

The food intake was measured twice per week during the treatment to obtain food efficiency (food intake/body weight). Overnight fasted mice were killed by decapitation and samples of blood and epididymal, retroperitoneal, mesenteric white adipose tissue and brown adipose tissue were collected, weighed and immediately frozen in dry ice and stored at -80°C for subsequent analysis.

Glucose tolerance and insulin sensitivity tests

For the glucose tolerance test, d-glucose (2 mg/g body weight) was intraperitoneally injected into overnight fasted mice. Glucose levels from tail blood samples were monitored at 0, 15, 30, 60, and 120 min after injection using an Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics ®, Indianapolis, USA).

The insulin sensitivity test was performed on overnight-fed mice, after intraperitoneal injection of Insulin (0.75 units/kg body weight; Sigma-Aldrich ®, St. Louis, USA). Tail blood samples were taken at 0, 15, 30, and 60 min after injection for measurement of blood glucose level.

Determination of plasma parameters

Blood samples were centrifuged (3.200 rpm for 10 min) and the serum was separated for the determination of triglycerides, HDL, and total cholesterol, by enzymatic tests (Wiener Lab, Argentina).

Reverse transcription and real-time PCR

The total RNA from the tissue samples was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Corp. VR, San Diego, CA, USA) and treated with DNase. Reverse transcription was carried out with M-MLV (Invitrogen Corp. VR) using random hexamer primers. The gene expression levels were determined by Real Time PCR (SYBR Green reagent) in Step One Plus equipment (Applied Biosystems-EUA).

Gene expression was normalized to the reference gene GAPDH (FW: 5' AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC 3'; RV: 5' CTT CCC ATT CTC GGC CTT GAC 3'). The genes of interest and respective primers were: TNF- α (FW: 5' CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A 3'; RV: 5' TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC 3'), IL-6 (FW: 5' TTG GGA GTG GTA TCC TCT GTG 3'; RV: 5' TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG 3'), AGT (FW: 5' GAC GTG ACC CTG AGC AGT CC 3'; RV: 5' TGA GTC CCG CTC GTA GAT GG 3') and ACE (FW: 5' CTC AGC CTG GGA CTT CTA CAA C 3'; RV: 5' CTC CAT GTT CAC AGA GGT ACA CT 3').

The relative comparative CT method of Livak and Schmittgen was applied to compare gene expression levels between groups. Normalization of the target genes to the reference gene was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, where $\Delta\Delta C_T = (C_{T,target} - C_{T,reference})_{treated\ sample} - (C_{T,target} - C_{T,reference})_{untreated\ sample}$ ([16](#)).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance of differences in mean values between mice groups was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

Data from the insulin sensitivity and glucose tolerance tests were evaluated by two-way ANOVA; the other parameters were analyzed by one-way ANOVA. Statistical differences, considered at an error probability of 0.01 and 0.05, were contrasted by student's t-test.

Results

ICOX-2 treatment lowered fat deposition in mice fed with HFD

Analysis of the animals weight indicated that the group HFD+ICOX had a significant increased weight loss ($28.92\text{g} \pm 0.50$) when compared to the HFD-fed group ($30.83\text{g} \pm 0.57$). However, no difference between the HFD and HFD+ICOX when compared to the control group was found ($29.82\text{g} \pm 0.47$) (Fig. 1A).

Regarding the food intake average (per body weight), the animals fed with HFD+ICOX had a significantly lower food intake when compared to the ST and HFD groups.

The epididymal white adipose tissue mass was significantly higher in HFD-fed group ($1.039\text{ mg} \pm 0.39$), when compared to the ST ($0.47\text{mg} \pm 0.12$), while the HFD+ICOX group showed the lowest epididymal white adipose tissue mass ($0.4320\text{ mg} \pm 0.36$) (Fig. 1B). The retroperitoneal (Fig. 1C) and mesenteric (Fig. 1D) white adipose tissue mass were also significantly affected by the treatments. Concerning the retroperitoneal tissue, the HFD-fed group ($0.44\text{mg} \pm 0.09$) showed a higher value when compared to the ST ($0.19\text{mg} \pm 0.02$) and HFD+ICOX groups ($0.11\text{mg} \pm 0.05$). The mesenteric tissue had a higher mass in the HFD group ($0.58\text{mg} \pm 0.14$), when compared to the ST ($0.18\text{mg} \pm 0.02$) and HFD+ICOX ($0.11\text{mg} \pm 0.04$) groups. Moreover, the brown adipose tissue showed a higher mass value in the HFD-fed group ($0.25\text{ mg} \pm 0.01$) in comparison to the HFD+ICOX group ($0.12\text{mg} \pm 0.03$) (Fig. 1E).

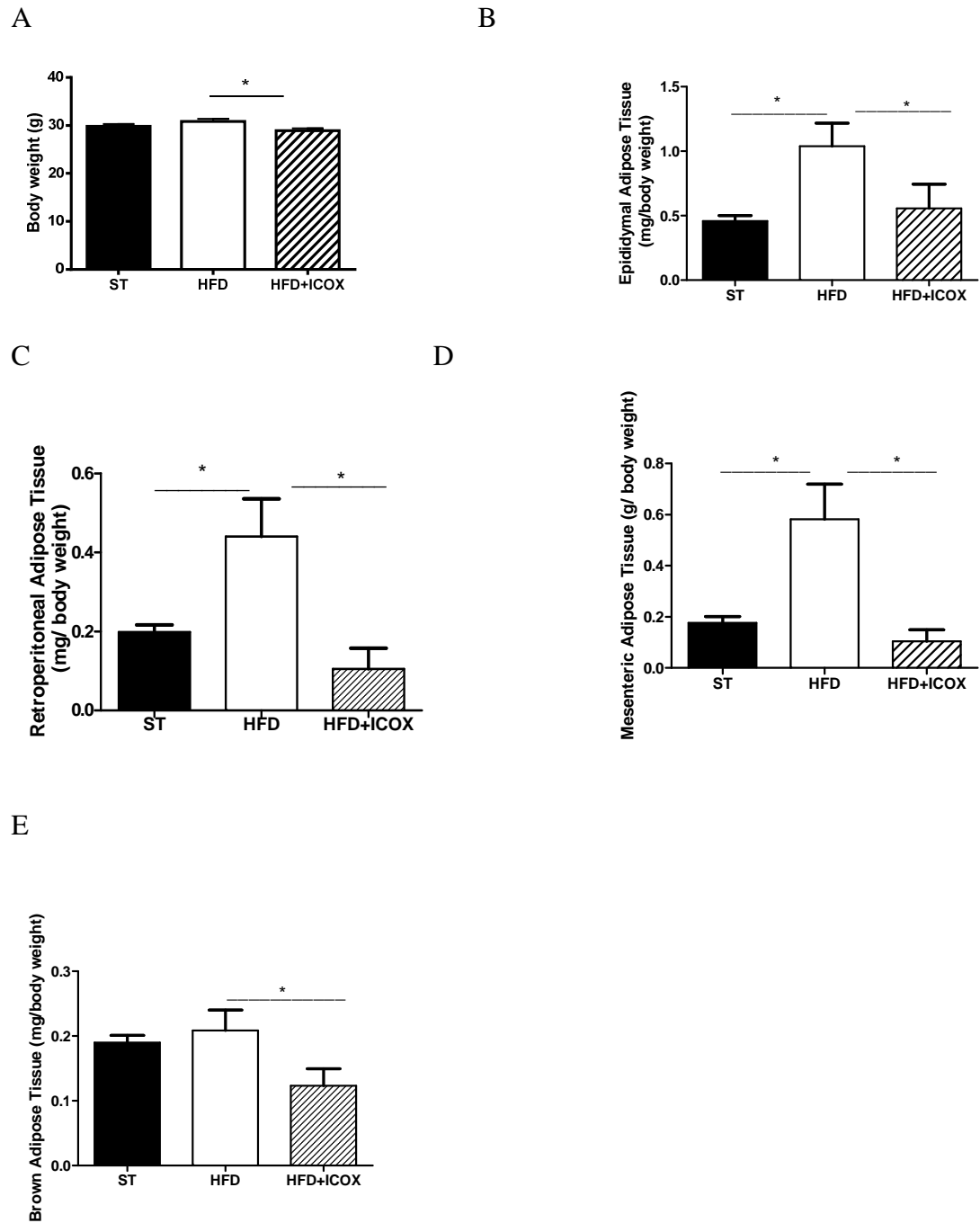


Fig. 1. Effect of the chronic administration of ICOX-2 on fat deposition in mice-fed standard (ST), high-fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD+ICOX). **(A)** Body weight (g) **(B)** epididymal adipose tissue **(C)** retroperitoneal adipose tissue **(D)** mesenteric adipose tissue **(E)** brown adipose tissue. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

ICOX-2 treatment changed blood parameters in mice fed with HFD

Mice from the HFD-fed group had significantly higher glucose levels (160.8 ± 42.7 , in mg/dL) when compared to ST ($115.5\text{mg/dL} \pm 17.1$) and HFD+ICOX groups ($104.0\text{mg/dL} \pm 24.8$) (Fig. 2A).

In addition, the levels of triglyceride were higher in the ST group (139.4 ± 37.5 , in mg/dL) when compared to the HFD+ICOX (85.0 ± 6.1) (Fig. 2C), but similar to the HFD group ($132.5\text{mg/dL} \pm 18.9$). The levels of total cholesterol ($172.5\text{mg/dL} \pm 30.5$) and HDL-c ($111.4\text{mg/dL} \pm 19.4$) were higher in the HFD+ICOX group when compared to the ST group ($143.3\text{mg/dL} \pm 12.0$; $83.2\text{mg/dL} \pm 8.8$) (Fig. 2B e 2D). The total cholesterol was higher in the group treated with celecoxib reason for the high levels of HDL in this group.

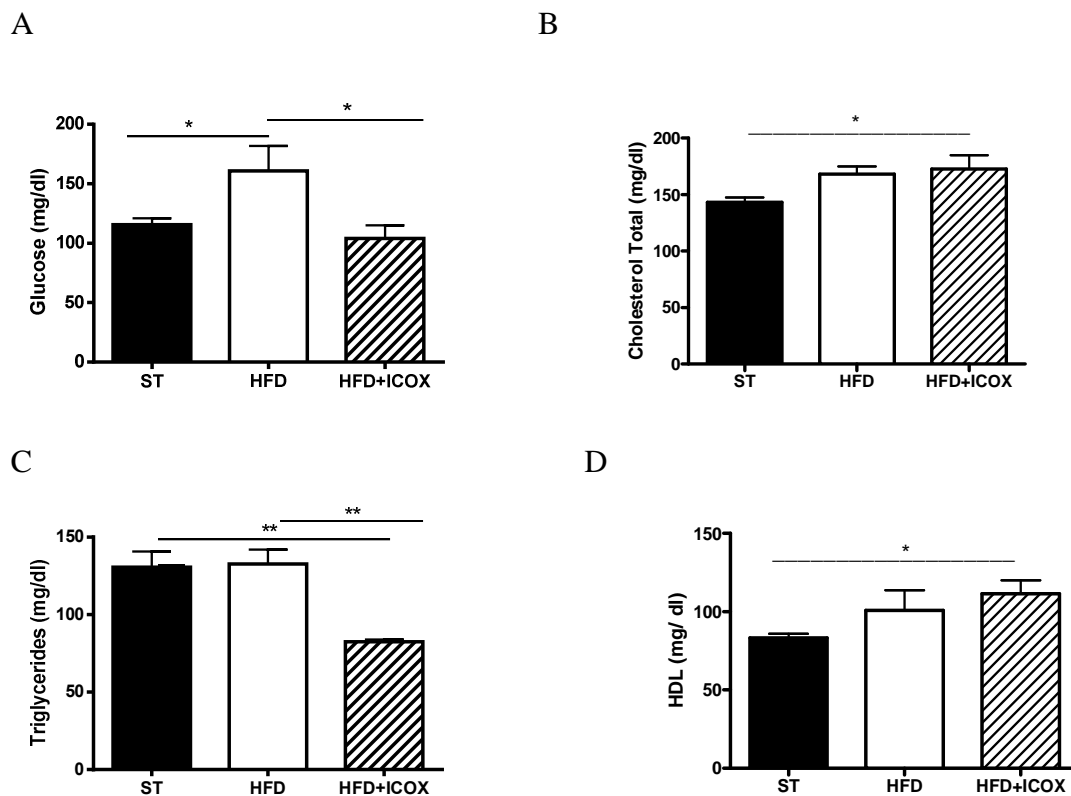


Fig. 2. Blood parameters of mice-fed standard (ST), high-fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). **(A)** Glucose (mg/dL) **(B)** Total cholesterol (mg/dL) **(C)** Triglycerides (mg/dL) **(D)** HDL cholesterol (mg/dL). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA).

ICOX-2 treatment improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice fed HFD

The glucose levels assessed during the insulin sensitivity (Fig. 3A) and glucose tolerance tests were significantly different between the groups. For the insulin sensitivity test,

the glucose levels were higher in the HFD (12643 ± 2411) when compared to the ST (8409 ± 554.5) and also the HFD+ICOX group (7100 ± 1259). Additionally, the glucose levels were shown in the area under the curve and also in glucose tolerance test (Fig. 3B) to be higher in the HFD group (35411 ± 3014) when compared to the ST (26444 ± 2339) and HFD+ICOX (30853 ± 2077) groups. While the levels were higher in HFD+ICOX (30853 ± 2077) when compared to ST (26444 ± 2339).

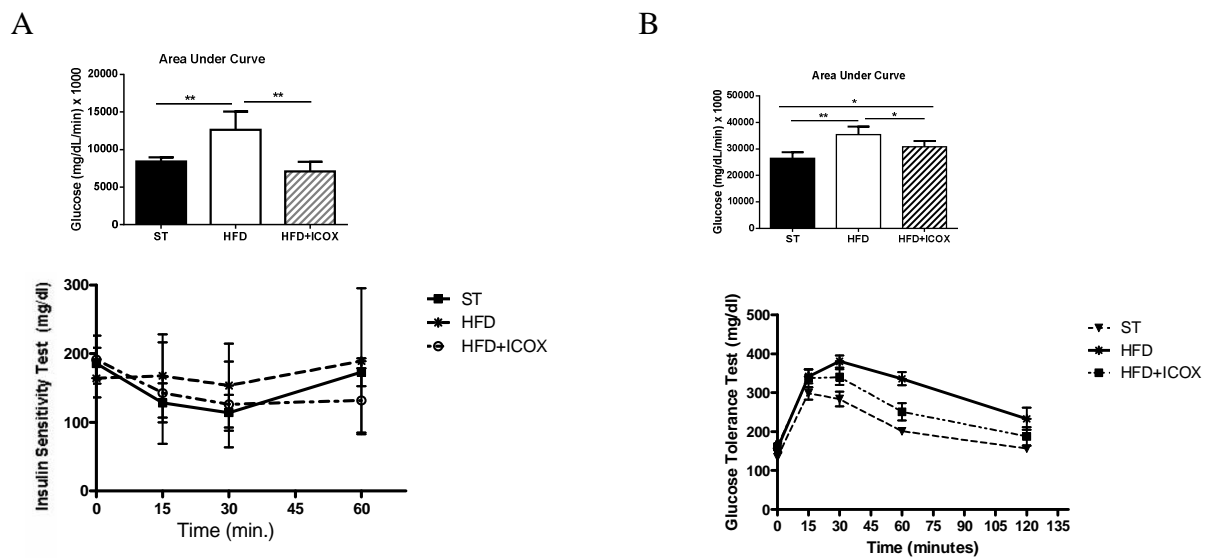


Fig. 3. Insulin sensitivity and glucose tolerance tests in mice-fed standard (ST), high-fat diet (HFD) and HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). (A) Insulin sensitivity test (mg/dL) (B) Glucose tolerance test (mg/dL). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Two-way ANOVA).

ICOX-2 treatment can modify inflammatory response in HFD fed mice

The real-time PCR analysis, evidenced that the expression of TNF- α in the epididymal adipose tissue show significant differences between the groups analyzed (Fig. 4A), it is higher in the HFD group (2.44 ± 0.45) when compared to ST (1.00 ± 0.00) and HFD+ICOX (0.46 ± 0.02) groups. On the other hand, the expression of interleukin 6 was lower in the HFD+ICOX group (0.48 ± 0.05) when compared to the group fed standard (1.00 ± 0.00) high-fat diet (1.33 ± 0.16) (Fig. 4B).

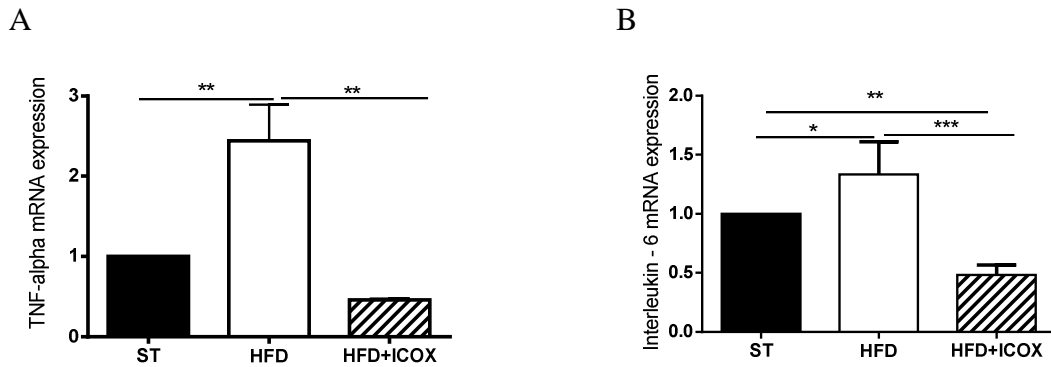


Fig. 4. Expression of components of the inflammatory system in epididymal adipose tissue of mice-fed standard (ST), high fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). **(A)** Tumor necrosis factor - alpha (TNF- α) mRNA expression **(B)** Interleukin-6 (IL-6) mRNA expression. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA).

ICOX-2 treatment modulates the renin-angiotensin system in HFD fed mice

The mRNA expression of AGT was significantly higher in HFD (2.67 ± 1.22) when compared to ST (1.00) and HFD-ICOX (0.89 ± 0.59) (Fig. 5A). The expression of ACE was higher in HFD (2.47 ± 0.21) in comparison to HFD-ICOX (1.22 ± 1.00) and ST (1.00 ± 0.00) (Fig. 5B).

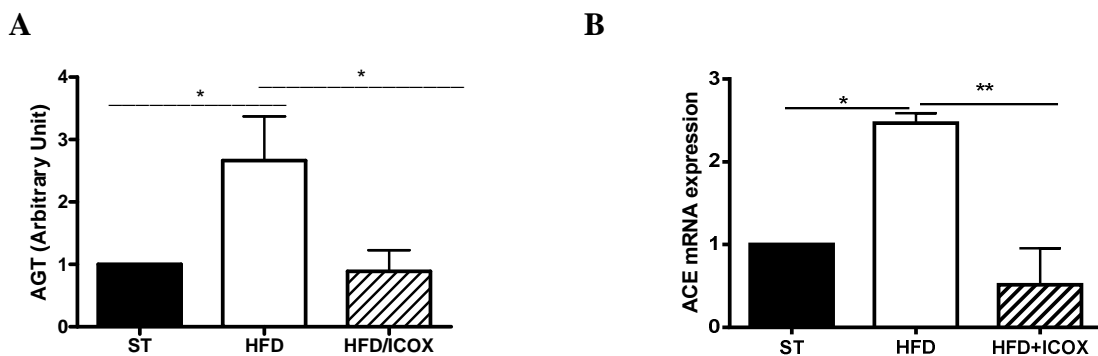


Fig. 5. Expression of components of the renin-angiotensin system in epididymal adipose tissue of mice-fed standard (ST), high-fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). **(A)** Angiotensinogen (AGT) **(B)** Angiotensin-converting enzyme (ACE). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA).

Discussion

The main findings of this study show that the treatment with an anti-inflammatory selective inhibitor of cyclooxygenase II, in HFD fed mice modulates RAS expression in adipose tissue, reversing various parameters of metabolic syndrome. Therefore, one of the anti-obesity effects of Celebra® may be mediated through the levels of interleukin 6 (IL-6), TNF- α , Agt and ACE, as described below.

As shown in previous studies, it is observed that changes in adipose tissue could regulate the RAS. ACE may be a modulator of the body's response to high-fat diet (HFD) (17). It is known that high-fat diet increases the deleterious enzyme ACE (12), which is consistent with our findings that showed an increased expression of ACE in the HFD group when compared to ST and HFD+ICOX reinforcing the pro-inflammatory effects of this diet.

In addition, our results showed significant differences in the mRNA levels of Agt and ACE gene among groups, since the expression levels of Agt in the white adipose tissue were higher in the HFD group and reduced in HFD+ICOX group, similar to the ST group.

These data are consistent with those found by Kalupahana *et al.*, who found data associating the Agt gene in the process of lipid metabolism in adipocytes (2) and that whole Agt body deficiency leads to a lean phenotype which is manifested with a decrease in fat mass and the engagement of the weight gain induced by high-fat diet in rodents (18, 19).

Other studies show that the adipose tissue-secreted Agt, induces obesity and an associated inflammation, a major factor for the pathogenesis of metabolic disorders, and therefore is a potential target for obesity research (20-22), suggesting a pivotal role of the RAS in obesity.

As in the study by Andrade *et al.* (2014) that shows that an increase in Ang- (1-7) levels at the beginning of the current treatment diet has a protective effect against the pro-inflammatory state of adipose tissue in overweight mouse induced by HFD (13). In addition, transgenic rats expressing an Ang-(1-7) showed a decrease in body weight, COX-2 and IL-1 β expression in abdominal fat and increasing levels of HDL cholesterol (23).

Lim *et al.* (2015) had demonstrated that COX-2 is induced by inflammatory stimulation (23-25).

In the present work, ICOX-2 treatment improved body weight loss in obese mice after being fed with high-fat diet (HFD), justified by the high dietary fat content and the greater amount of calories in comparison to the standard diet.

In our study, the treatment with the aforementioned anti-inflammatory drug (Celecoxib) was able to lower the adipose tissue mass of the epididymal, retroperitoneal, mesenteric and brown adipose tissue compared to the HFD group.

Hsieh *et al.* (2010) demonstrated that the inhibition of the COX-2 activation in rats with obesity induced by high-fat diet may be responsible for alleviating the inflammation in visceral and subcutaneous adipose tissue ([11](#)).

Analyzing the lipid parameters, the triglyceride levels were higher in the HFD group, but when there was the addition of the COX2 inhibitor, a decrease was observed in the levels of triglycerides. This occurs because HFD is rich in high saturated fat, which is directly associated with increased triglyceride levels.

In addition, we demonstrated that fat-rich diet affects the serum lipid profile of mice, reducing the expression of HDL-C, which was reverted by the treatment with the ICOX that increased the HDL-C levels and decreased the triglyceride levels.

The levels of total cholesterol were found to be lower in the HFD group and increased in the HFD+ICOX2 group, which does not corroborate with the findings reported in the literature, as observed in a study where Vioxx administration, another selective cyclooxygenase-2 inhibitor, resulted in decreased levels of HDL and total cholesterol ([26](#)).

The insulin sensitivity and glucose tolerance tests allowed us to observe reduced circulating glucose levels in the HFD+ICOX group, which were similar to the glucose levels found in the ST group.

Other studies show the indirect suppression of muscle insulin resistance, by decreasing systemic oxidative stress generated by COX-2 in mice with obesity induced by high-fat diet after inhibition of COX-2([27](#)). Still another recent study suggested that cyclooxygenase (COX) 2-mediated inflammation in adipose tissue could be heavily involved in insulin resistance associated with obesity and fatty liver ([23](#)), and visceral fat ignited in response to COX-2 activation, significantly deteriorated the pancreatic β -cell function in obesity ([28-31](#)).

In obesity, the adipose tissue has been described to present an inflammation of low intensity along with increased secretion of cytokines ([32-34](#)). It has been demonstrated in various types of cells, being able to stimulate COX-2 expression, particularly in obese patients ([35-37](#)) and to inhibit the secretion of insulin from murine islets promoters, and lines of insulin secreting cells ([6](#), [21](#), [33](#)).

Furthermore, this work shows that the inhibition of COX2 decreases the mRNA expression of the tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL 6), in epididymal adipose tissue, when compared to the groups fed a diet with standard and high-fat diet without ICOX treatment.

Several studies reported that TNF- α and IL- 6 are increased in obesity and this increase is correlated with numerous metabolic disorders ([38-40](#)).

In this study we observed that the high-fat diet modulates the inflammatory and RAS profiles in adipose tissue pointing to a strong participation of RAS in related obesity diseases. Our study also highlights that the anti-inflammatory cyclooxygenase type 2 inhibitor alters these systems producing a reduction in body weight, blood glucose and triglycerides levels, which indicates a strong potential of this drug in the prevention or treatment of metabolic syndrome/obesity.

Conclusion

Concerning the mechanisms involved in the prevention of a proinflammatory profile and the improvement of metabolism in mice, despite the deleterious stimulus of high-fat diet, we hypothesize that decreased proinflammatory proteins in adipose tissue induced by selective inhibitor cyclooxygenase type 2, celecoxib, is able to improve metabolism, through the modulation of the renin-angiotensin system.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

1. Frigolet ME, Torres N, Tovar AR. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013 Dec;24(12):2003-15. PubMed PMID: 24120291.
2. Kalupahana NS, Massiera F, Quignard-Boulange A, Ailhaud G, Voy BH, Wasserman DH, et al. Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose

- inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity*. 2012 Jan;20(1):48-56. PubMed PMID: 21979391. Pubmed Central PMCID: 4465436.
3. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine*. 2005 Feb;11(2):183-90. PubMed PMID: 15685173. Pubmed Central PMCID: 1440292. Epub 2005/02/03. eng.
 4. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Jun;121(6):2111-7. PubMed PMID: 21633179. Pubmed Central PMCID: 3104776. Epub 2011/06/03. eng.
 5. Kawai M, Rosen CJ. PPARgamma: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nature reviews Endocrinology*. 2010 Nov;6(11):629-36. PubMed PMID: 20820194. Pubmed Central PMCID: 3132113.
 6. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry*. 2008;77:289-312. PubMed PMID: 18518822.
 7. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & development*. 1994 May 15;8(10):1224-34. PubMed PMID: 7926726.
 8. Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, dos Santos FA, Fernandes D. Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Revista brasileira de reumatologia*. 2012 Oct;52(5):767-82. PubMed PMID: 23090376.
 9. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*. 2003 Aug;52(8):2097-101. PubMed PMID: 12882928.
 10. Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity*. 2009 Jun;17(6):1150-7. PubMed PMID: 19247274.
 11. Hsieh PS, Lu KC, Chiang CF, Chen CH. Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *European journal of clinical investigation*. 2010 Feb;40(2):164-71. PubMed PMID: 20039930.
 12. Santos SH, Andrade JM, Fernandes LR, Sinisterra RD, Sousa FB, Feltenberger JD, et al. Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kappaB in rats fed with high-fat diet. *Peptides*. 2013 Aug;46:47-52. PubMed PMID: 23714175.
 13. Andrade JM, Frade AC, Guimaraes JB, Freitas KM, Lopes MT, Guimaraes AL, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European journal of nutrition*. 2014 Oct;53(7):1503-10. PubMed PMID: 24468941.
 14. Kurhe Y, Mahesh R, Gupta D. Effect of a selective cyclooxygenase type 2 inhibitor celecoxib on depression associated with obesity in mice: an approach using behavioral tests. *Neurochemical research*. 2014 Jul;39(7):1395-402. PubMed PMID: 24816895.
 15. Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes*. 2007 Dec;56(12):2997-3005. PubMed PMID: 17720896.
 16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.
 17. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005 Apr;16(3):120-6. PubMed PMID: 15808810.

18. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, et al. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5220-5. PubMed PMID: 11713218.
19. Kim S, Urs S, Massiera F, Wortmann P, Joshi R, Heo YR, et al. Effects of high-fat diet, angiotensinogen (agt) gene inactivation, and targeted expression to adipose tissue on lipid metabolism and renal gene expression. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2002 Nov-Dec;34(11-12):721-5. PubMed PMID: 12660889.
20. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2012 Feb;13(2):136-49. PubMed PMID: 22034852.
21. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obesity research*. 2000 Jul;8(4):337-41. PubMed PMID: 10933310.
22. Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005 Mar;45(3):356-62. PubMed PMID: 15630041.
23. Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimaraes AL, de Paula AM, Campagnole-Santos MJ, et al. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regulatory peptides*. 2012 Oct 10;178(1-3):64-70. PubMed PMID: 22749992. Epub 2012/07/04. eng.
24. Deacon K, Knox AJ. Human airway smooth muscle cells secrete amphiregulin via bradykinin/COX-2/PGE2, inducing COX-2, CXCL8 and VEGF expression in airway epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015 Jun 5:ajplung 00390 2014. PubMed PMID: 26047642. Epub 2015/06/07. Eng.
25. Lim W, Shim MK, Kim S, Lee Y. Red ginseng represses hypoxia-induced cyclooxygenase-2 through sirtuin1 activation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2015 Jun 1;22(6):597-604. PubMed PMID: 26055124. Epub 2015/06/10. eng.
26. Lijnen HR, Van Hoef B, Lu HR, Gallacher DJ. Rofecoxib impairs adipose tissue development in a murine model of nutritionally induced obesity. *Thrombosis and haemostasis*. 2008 Aug;100(2):338-42. PubMed PMID: 18690356.
27. Tian YF, Hsia TL, Hsieh CH, Huang DW, Chen CH, Hsieh PS. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life sciences*. 2011 Jul 18;89(3-4):107-14. PubMed PMID: 21640730. Epub 2011/06/07. eng.
28. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec;112(12):1821-30. PubMed PMID: 14679177. Pubmed Central PMCID: 296998.
29. Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, Rice T, Leon AS, Skinner JS, et al. Body fat, resting and exercise blood pressure and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study. *Obesity research*. 1999 Sep;7(5):423-30. PubMed PMID: 10509598.
30. Lv N, Song MY, Kim EK, Park JW, Kwon KB, Park BH. Guggulsterone, a plant sterol, inhibits NF-kappaB activation and protects pancreatic beta cells from cytokine toxicity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008 Jul 16;289(1-2):49-59. PubMed PMID: 18343024. Epub 2008/03/18. eng.

31. Burke SJ, Karlstad MD, Regal KM, Sparer TE, Lu D, Elks CM, et al. CCL20 is elevated during obesity and differentially regulated by NF-kappaB subunits in pancreatic beta-cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2015 Jun;1849(6):637-52. PubMed PMID: 25882704. Pubmed Central PMCID: 4437873. Epub 2015/04/18. eng.
32. Andrade JM, Paraiso AF, de Oliveira MV, Martins AM, Neto JF, Guimaraes AL, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition*. 2014 Jul-Aug;30(7-8):915-9. PubMed PMID: 24985011. Epub 2014/07/06. eng.
33. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society transactions*. 2005 Nov;33(Pt 5):1078-81. PubMed PMID: 16246049. Epub 2005/10/26. eng.
34. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007 Nov;27(11):2276-83. PubMed PMID: 17823366.
35. Bowers LW, Cavazos DA, Maximo IX, Brenner AJ, Hursting SD, deGraffenried LA. Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with the PI3K/Akt and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(4):R59. PubMed PMID: 23880059. Pubmed Central PMCID: 3978844. Epub 2013/07/25. eng.
36. Geng Y, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *Journal of immunology*. 1995 Jul 15;155(2):796-801. PubMed PMID: 7608556.
37. Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2003 Apr;24(4):665-71. PubMed PMID: 12727794.
38. Rosc D, Adamczyk P, Boinska J, Szafkowski R, Ponikowska I, Stankowska K, et al. CRP, but not TNF-alpha or IL-6, decreases after weight loss in patients with morbid obesity exposed to intensive weight reduction and balneological treatment. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2015 May;16(5):404-11. PubMed PMID: 25990058. Pubmed Central PMCID: 4432993.
39. Xu LL, Shi CM, Xu GF, Chen L, Zhu LL, Zhu L, et al. TNF-alpha, IL-6, and leptin increase the expression of miR-378, an adipogenesis-related microRNA in human adipocytes. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014 Nov;70(2):771-6. PubMed PMID: 24771406.
40. Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, et al. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF-alpha and the development of inflammation in obese subjects. *European journal of medical research*. 2010 Nov 4;15 Suppl 2:120-2. PubMed PMID: 21147638. Pubmed Central PMCID: 4360270.

4.2 PRODUTO 2

Celecoxib reduces liver lipogenesis in high-fat fed mice

Jamille Fernandes Lula^{a,c}, Alfredo Maurício Batista de Paula^{a,b}, André Luiz Sena Guimarães^{a,b}, Erivelton Pereira dos Santos^{a,c}, Igor Vianna Brandi^d, Karla Nayara de Oliveira Santana^a, Leandro de Freitas Teles^{a,c}, Sérgio Henrique Sousa Santosa^{a,b,d}

a- Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Science, State University of Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

b- State University of Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

c – Universitary Hospital Clemente de Faria, State University of Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

d- Institute of Biological Sciences (ICB), Pharmacology Department, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence to: Sergio Henrique Sousa Santos, adress: Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College, Universidade Federal de Minas (UFMG); Avenida Universitária, 1000, Universitário, 39.404-547, Montes Claros, MG, Brazil, sergiosousas@hotmail.com.

This Work supported by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease is a lipid accumulation (mainly as triglyceride) in the hepatic tissue. The aim of this study was to investigate the role of celecoxib on hepatic triacylglycerol metabolism in non-alcoholic fatty liver and to explore the potential mechanism through expression of yours liver markers in mice treated with a high-fat diet. Males FVB/N mice were divided into 3 groups that were fed with experimental diets, standard and high-fat diet, for 180 days. The third group was treated with high-fat diet for 120 days and treated with cyclooxygenase-2 inhibitor for two months at a dose of 100mg / kg of body weight. The body weight, food intake, blood parameters and liver histology were analyzed. Expression of ACC, PPAR- γ , FAS, SREBP-1 c was evaluated by quantitative real-time reverse transcriptase. The main finding of the present study proposes that celecoxib treatment results in weight loss in obese animals, reduced food consumption and decreased triglycerides. The analyses of liver adipogenesis related genes indicated that ACC, FAS and SREBP1-c mRNA expression were significantly suppressed in high fat diet + cyclooxygenase-2 inhibitor mice. In conclusion, we observed that celecoxib improved lipid metabolism and decreased fat deposition in liver of mice with obesity-inducible diets.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drug. Obesity. Cyclooxygenase-2. Fatty Liver.

1. Introduction

Obesity is described as a major risk factor for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a disease spectrum that includes hepatic steatosis, steatohepatitis, fibrosis, and liver cirrhosis [1,2].

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common manifestations of chronic liver disorders worldwide [3]. NAFLD represents a continuum of hepatic injuries, which progress from simple hepatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis, with some people even ultimately progressing to fibrosis, cirrhosis, and liver failure [4]. The mechanism leading to non-alcoholic fatty liver disease remains unclear. Actually, fatty liver disease is considered the most prevalent form of hepatosteatosis associated with obesity and metabolic syndrome [5].

Elevated insulin also leads to activation of the lipid biosynthetic pathway through activation of the expression and proteolytic maturation of the transcription factor sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) [6], thereby leading to the increased expression of fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in the lipogenesis pathway, resulting in steatosis [7].

Several genes associated with lipid metabolism play important roles in regulation of lipogenesis-associated transcription factor [8], such as SREBP1, FAS, ACC and PPAR γ , this last one selectively induces expression of several adipogenic proteins [9].

The cyclooxygenase (COX) inhibitors are widely used worldwide. COX corresponds to a class of enzymes with two main isoforms: COX-1 is produced in a constitutive manner, is associated, in most cases, the physiological functions, and COX-2 is normally associated with pathological conditions. Their byproducts involved in the perception of pain and inflammation [10]. Celecoxib is a non-steroidal antiinflammatory drug (NSAID) and a highly

selective inhibitor of cyclo-oxygenase-2 (COX-2), which is a rate-limiting enzyme in the prostaglandin synthesis pathway [11], but the contribution of celecoxib in the liver steatosis via lipolysis/lipogenesis remains inconclusive.

Thus, the present study aimed to investigate whether celecoxib treatment could improve NAFLD, and we explored the possible mechanisms associated with lipogenesis. A deeper understanding of the role of celecoxib in modulating the biological markers of NAFLD will substantiate its potential as a therapeutic candidate.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-two FVB\N male mice, aged 8 weeks, were divided into 3 groups that were fed with the following experimental diets: Standard diet (ST) and high-fat diet (HFD) in a period of 180 days. The third group was fed HFD during four months, and treated with COX-2 inhibitor (HFD + ICOX) for two months at a dosage of 100 mg / kg body weight. The mice were housed in individual cages, under 12h light-dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00 h) and at a temperature of $25.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$. Food and water were given *ad libitum*. This study was approved by the Ethics Committee of Experimentation and Animal Welfare of Unimontes, Montes Claros, Brazil, by the process n° 022/2012.

2.2. Diets

The high-fat diet, composed of 39.0% carbohydrate, 17.0% protein and 44.0% fat, representing a total of 4.27 kcal per 1 g of diet, was prepared according to the protocols

previously reported [12]. Standard diet (Purina – Labina®), which was used for the regular maintenance of our mice, was composed of 50.3% carbohydrate, 41.9% protein and 7.8% fat, representing a total of 2.18 kcal per 1g of diet [13]. All of the high-fat diet components were purchased from Rhooster® LTDA (São Paulo, São Paulo, Brazil).

The experimental groups were: ST (n=9), HFD (n=7) and HFD+ICOX (n=6). The first group received standard diet (ST) and the second group was fed with high-fat diet (HFD) alone for 24 weeks. The third group of mice was fed with high-fat diet for 16 weeks and treated with selective COX – 2 inhibitors (Celebra®) (HFD+ICOX) at a dosage of 100mg/kg of body weight, for 8 weeks (the dosage was corrected every week according with the animals body weight).

Not added the group with standard diet and celecoxib because of previous studies do not show differences in this group compared to the group that received standard diet only [14,15].

2.3. Measurements of body weight, food intake and tissue collection

The mice were individually housed and the food intake was measured twice per week during the treatment to obtain food efficiency (food intake/body weight). Overnight fasted mice were killed by decapitation and samples of blood and liver were collected, weighed and immediately frozen in dry ice and stored at – 80 °C for subsequent analysis.

2.4. Determination of plasma parameters

Blood samples were centrifuged (3.200 rpm for 10 min) and the serum was separated for the determination of triglycerides and HDL, by enzymatic tests (Wiener Lab, Argentina).

2.5. Reverse transcription and real-time PCR

The tissues were prepared in Trizol reagent (Invitrogen Corp. VR, San Diego, CA, USA) and treated with DNase. Reverse transcription was carried out with M-MLV (Invitrogen Corp.VR) using random hexamer primers. The endogenous glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (internal control), acetyl-CoA carboxylase (ACC), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1 c) and fatty acid synthase (FAS) mRNA were determined by quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) using SYBR Green reagent (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) in Step One Plus equipment (Applied Biosystems-EUA).

Gene expression was normalized to the endogenous GAPDH (FW:5' AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC 3'; RV: 5'CTT CCC ATT CTC GGC CTT GAC 3'). The genes of interest and respective primers were: PPAR- γ (FW:5'TTA TGG GTG AAA CTC TGG G 3'; RV: 5'CAA CCA TTG GGT CAG CTC 3'), ACC (FW: 5'GAA CAT CCC CAC GCT AAA CAG A 3'; RV: 5'CTG ACA AGG TGG CGT GAA GG 3'), SREBP1-c (FW: 5'TGC GTG GTT TCC AAC ATG AC 3'; RV: 5'CCT CAT GTA GGA ATA CCC TCC TCA TA 3') and FAS (FW: 5'CAT CCT AGG CAT CCG AGA CCT 3'; RV: 5'ATC GTG TTC TCG TTC CAG GAT C 3').

The relative comparative CT method of Livak and Schmittgen was applied to compare gene expression levels between groups. Normalization of the target genes to the reference gene was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, where $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}})_{\text{treated sample}} - (C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}})_{\text{untreated sample}}$ [16].

2.6. Hematoxylin and eosin staining

Liver samples were fixed in formaldehyde solution (10%) and embedded in paraffin serially sectioned at 5 mm, stained with hematoxylin and eosin (HE), and evaluated under a conventional light microscope using an Olympus BX50 microscope (Tokyo, Japan). Images of fat tissue areas (10 ocular and 40 objective lenses) were captured with Evolution LC color light camera (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

2.7. Statistical analysis

All data were transferred to GraphPad Prism software (Version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and analyzed with confidence 95% ($P < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SD. The statistical significance of differences in mean values among mice groups was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

3. Results

3.1. ICOS-2 treatment lowered food intake and weight gain in mice fed with the HF diet

During the experiments, analysis of the animal weight indicated that animals of the group receiving treatment with drugs inhibitory of cyclooxygenase (ICOS) had significant weight loss ($28.92\text{g} \pm 0.50$) compared to the HF-fed group ($30.83\text{g} \pm 0.57$). But no difference between these and control group ($29.82\text{g} \pm 0.47$) (Fig. 1A).

Food intake average (per body weight) (Fig. 1B) was lower significantly in the group of animals fed high-fat diet and treated with cyclooxygenase inhibitor when compared with both groups (mice-fed standard (ST) and HF-fed group without treatment).

3.2. *ICOX-2 treatment changed blood parameters in mice fed with the HF diet*

Triglyceride levels were higher in ST group (139.4 ± 37.5 , in mg/ dL) when compared to the group fed HFD and treated with cyclooxygenase inhibitor (85.0 ± 6.1) (Fig. 2A), but was similar to the group fed high-fat diet ($132.5\text{mg/dL} \pm 18.9$). Levels HDL-c ($111.4\text{mg/dL} \pm 19.4$) was higher the group fed high-fat diet and treated with cyclooxygenase inhibitor when compared to the ST group ($83.2\text{mg/dL} \pm 8.8$) (Fig. 2B).

3.3. *ICOX-2 treatment lowered fat deposition and steatosis in mice fed with the HF diet*

Analysis indicated that the HFD + ICOX group had a substantial decrease in the total liver weight in relation to HFD mice (Fig. 3A).

The liver histologic examinations in mice fed the HFD indicated prominent steatosis (Figura 3B). Hence, we performed a histologic analysis to examine the effect of celecoxib on the development of fatty liver. Large hepatic lipid droplets were diffusely present in the livers of the HFD group mice compared with the other groups (Fig. 3B).

3.4. *ICOX-2 treatment can modify adipogenesis in mice fed with the HF diet*

In real-time PCR analysis, mRNA expression of adipogenesis-related genes indicated that ACC (ST: 1.19 ± 0.61 ; HFD: 4.93 ± 0.24 ; HFD + ICOX: 0.73 ± 0.34), SREBP-1 c (ST: 1.01 ± 0.01 ; HFD: 4.76 ± 0.22 ; HFD + ICOX: 1.57 ± 0.32) and FAS (ST: 1.00 ± 0.00 ; HFD: 1.22 ± 0.16 ; HFD + ICOX: 0.57 ± 0.18) mRNA expression in the liver was significantly suppressed in HFD + ICOX (Fig. 4 A, C and D) when compared to HFD. However, the difference was not significant in the expression of PPAR- γ (ST: 1.00 ± 0.00 ; HFD: $2.19 \pm$

0.50; HFD + ICOX: 1.60 ± 0.18) in the treated group compared to the HFD, there is only one difference between groups ST and HFD (Fig. 4B).

4. Discussion

Liver is a complex and important organ and plays an essential role on lipid and glucose metabolic regulation [17].

Non-alcoholic fatty liver disease is an inflammation of the liver that is currently highly relevant because of its strong association with diseases such as obesity and type-2 diabetes mellitus [18].

We observed an important reduction in fat mass, liver weight, and hepatic steatosis associated with decreased circulating triglyceride and increase of HDL; improved lipid metabolism; and decreased expression lipogenesis markers. All of these effects of hepatic diseases were attenuated after treatment with celecoxib, a COX-2 inhibitor.

In this context, recent studies suggested that COX-2 expression protects against obesity by an increase in thermogenic activity [19]. Moreover, this effect has been attributed principally to COX-2–derived PGE₂ [20].

The present study shows that the administration of celecoxib in mice fed with high fat diet induced neuroendocrine obesity, which were accompanied by hepatic steatosis. These results are in agreement with the data obtained in previous studies [21-23].

Other previous studies show that prolonged low-dose celecoxib treatment with ethanol enhances alcohol-induced steatosis and liver inflammatory reactions above that from ethanol or celecoxib alone, suggesting that reduction in PGE(2) by treatment with celecoxib removes the endogenous protective effect of this prostaglandin. [23].

Moreover, studies have revealed that COX-2 activation in fat inflammation is crucial to the development of insulin resistance and fatty liver in high-fat-induced obese rats [24]. And that, the COX-2 inhibition (celecoxib) attenuates cardiovascular, liver steatosis and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats [25].

Other work has demonstrated that constitutive expression of COX-2 in hepatocytes protects against steatosis, adiposity, inflammation, and hepatic IR in mice under HFD, implicating the lack of COX-2 expression under these circumstances as a novel key player in the development of obesity-associated metabolic dysfunction. Furthermore, pharmacological inhibition of COX-2 reverts to the situation [26].

Several studies have documented the possible role of decreased liver fatty acid oxidation in the development and diet-induced obesity is largely caused by disorders of fat metabolism, resulting in a massive accumulation of fat in several tissues [27]. Lipid and energy metabolism are regulated by a complex network of signaling processes, and we, therefore, investigated mRNA expression of key genes regulating lipid metabolism [28].

The hepatic release of triacylglycerol to the bloodstream, fatty acid oxidation, and de novo lipogenesis are three key metabolic pathways that control hepatic triacylglycerol metabolism. They play a crucial role in the development of liver steatosis.

Additionally, we showed an inhibition of the lipogenic pathway- ACC/FAS/ SREBP-1c/ PPAR- γ , through mediators in the liver of obese mice, associated with celecoxib treatment.

A possible explanation would be decreased levels of mRNA expression in genes encoding lipogenic proteins, such as SREBP-1c. The lipogenic transcription factor, SREBP-1c, plays a crucial role in regulating fatty acid synthesis, and SREBP-1c-responsive major genes encode a rate-limiting enzyme in de novo fatty acid biosynthesis [29]. SREBP-1c is an activator of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [30].

Thus, celecoxib can have an effect on de novo lipogenesis and lipid metabolism in liver, as the results published by Hsieh *et al.* [24,31].

It has been shown that the high-fat diet promoted lipogenesis and lipid storage by upregulating the lipid synthesis genes, such as ACC, FAS, SCD1, LXR, and ChREBP1, important for fatty acid uptake, transport, and metabolism in the liver [32].

PPAR- γ is a nuclear receptor central to glucose and lipid homeostasis [33] and is upregulated in the liver of obese patients with NAFLD, representing an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction in the development of hepatic steatosis [34].

In conclusion, the present study indicates that treatment with celecoxib offers a protective effect against the pro-inflammatory response profile in the liver and improves lipid metabolism in high-fat-fed mice, decreasing lipogenesis.

Conflict of interest

None declared.

References

- [1] Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual review of pathology* 2010;5:145-71.
- [2] Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007;132:2191-207.
- [3] Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009;13:9-19.
- [4] Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta pharmacologica Sinica* 2008;29:698-706.
- [5] Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, obesity & metabolism* 2011;13:692-702.
- [6] Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:13656-61.
- [7] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:32345-53.

- [8] Beyea MM, Heslop CL, Sawyez CG, et al. Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:5207-16.
- [9] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry* 2008;77:289-312.
- [10] Majed BH, Khalil RA. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacological reviews* 2012;64:540-82.
- [11] Allaj V, Guo C, Nie D. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell & bioscience* 2013;3:8.
- [12] Santos SH, Andrade JM, Fernandes LR, et al. Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kappaB in rats fed with high-fat diet. *Peptides* 2013;46:47-52.
- [13] Andrade JM, Frade AC, Guimaraes JB, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European journal of nutrition* 2014;53:1503-10.
- [14] Kurhe Y, Mahesh R, Gupta D. Effect of a selective cyclooxygenase type 2 inhibitor celecoxib on depression associated with obesity in mice: an approach using behavioral tests. *Neurochemical research* 2014;39:1395-402.
- [15] Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 2007;56:2997-3005.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [17] Liu Y, Dentin R, Chen D, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008;456:269-73.
- [18] Buque X, Aspichueta P, Ochoa B. [Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis]. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* 2008;100:565-78.
- [19] Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, et al. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PloS one* 2010;5:e11391.
- [20] Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009;30:377-86.
- [21] Tian F, Zhang YJ, Li Y, Xie Y. Celecoxib ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetic rats via suppression of the non-canonical Wnt signaling pathway expression. *PloS one* 2014;9:e83819.
- [22] Chen J, Liu D, Bai Q, et al. Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats. *Molecular medicine reports* 2011;4:811-6.
- [23] Bykov IL, Palmén M, Rainsford KD, Lindros KO. Chronic effects of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, cause enhanced alcohol-induced liver steatosis in rats. *Inflammopharmacology* 2006;14:36-41.
- [24] Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity* 2009;17:1150-7.

- [25] Cunha NV, de Abreu SB, Panis C, et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life sciences* 2010;87:375-81.
- [26] Frances DE, Motino O, Agra N, et al. Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance. *Diabetes* 2015;64:1522-31.
- [27] Feltenberger JD, Andrade JM, Paraiso A, et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension* 2013;62:324-30.
- [28] Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome* 2012;4:32.
- [29] Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2010;45:199-214.
- [30] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2002;67:491-8.
- [31] Yu J, Ip E, Dela Pena A, et al. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006;43:826-36.
- [32] Peng Y, Rideout D, Rakita S, Lee J, Murr M. Diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress, and inflammation in liver. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* 2012;8:73-81.
- [33] Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:2538-50.
- [34] Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011;96:1424-30.

Figure legends

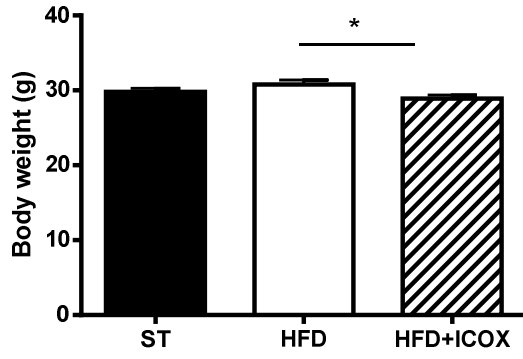
Fig. 1. Effect of chronic administration of ICOX on body weight and food intake in mice-fed standard (ST), high fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD+ICOX). **(A)** Body weight (g) **(B)** Triglycerides (mg/dL).. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA).

Fig. 2. Hepatic parameters. Liver sample of mice-fed standard (ST), high fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). **(A)** Liver total weight (g/100 g body weight) **(B)** Lipid droplet **(C)** Hematoxylin and eosin (HE) staining. Scale bar, 50 μm . 40x. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA).

Fig. 3. Analyses of mRNA expression of lipogenesis markers by qRT to PCR in liver of mice-fed standard (ST), high fat diet (HFD), HFD plus cyclooxygenase inhibitor (HFD-ICOX). **(A)** ACC **(B)** PPAR- γ **(C)** SREBP-1 c **(D)** FAS. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA).

Fig. 1

A



B

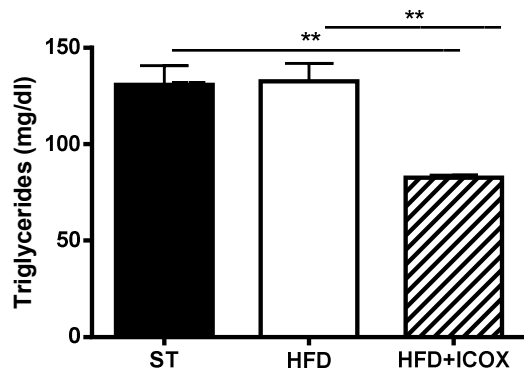


Fig. 2

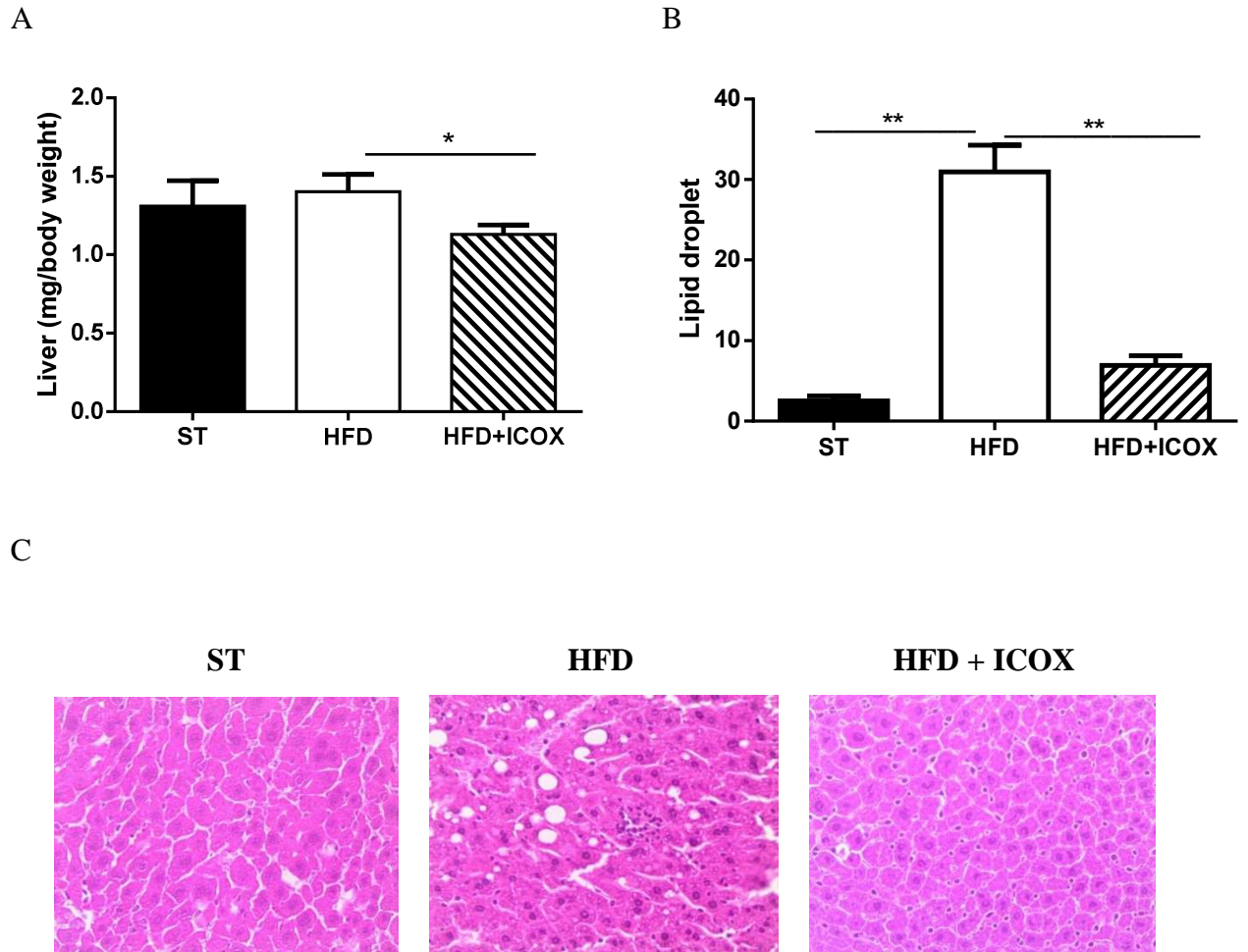
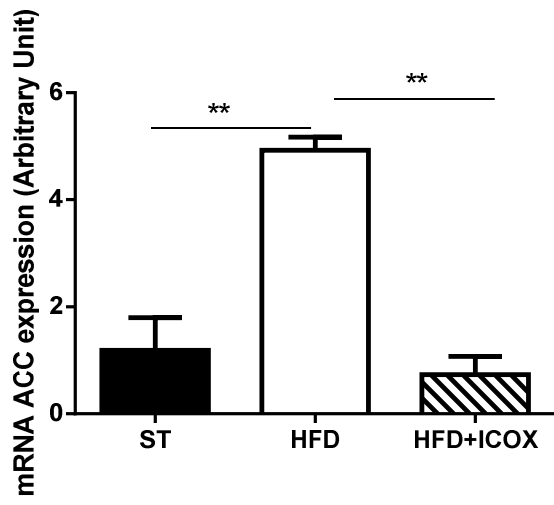
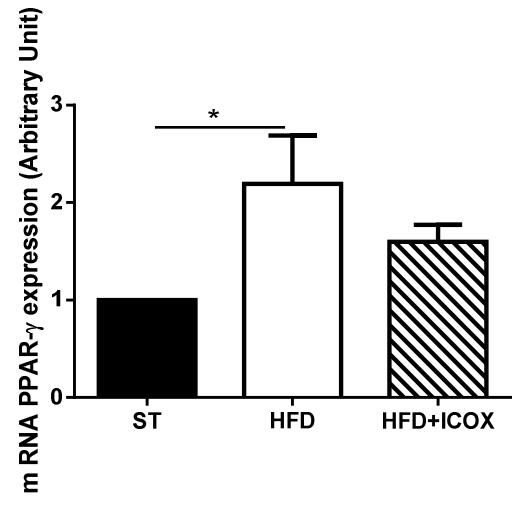


Fig. 3

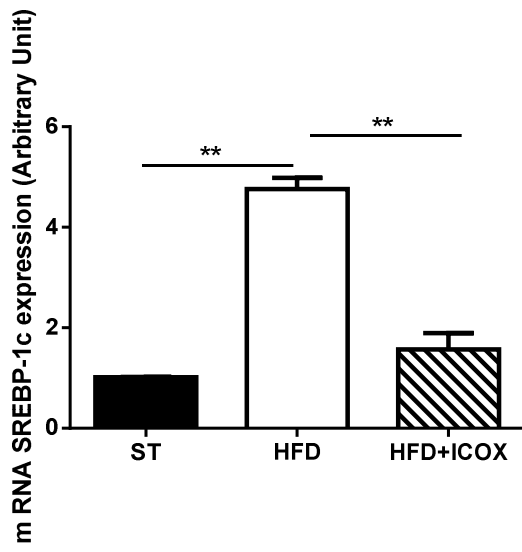
A



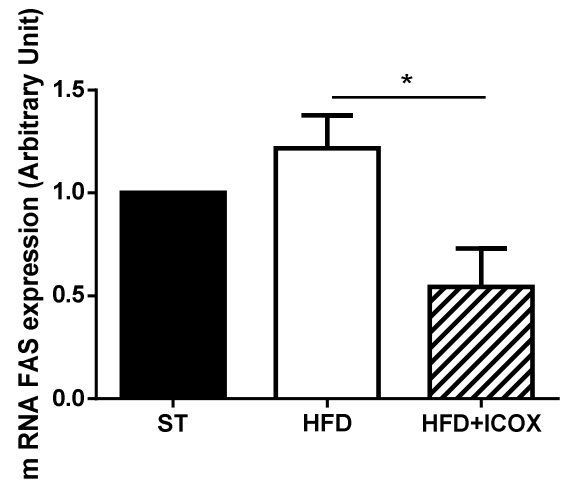
B



C



D



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a obesidade/síndrome metabólica e a esteatose hepática tem emergido como um problema de saúde pública de relevância e em plena expansão.

Por esta razão, estas enfermidades, conhecidas como doenças crônicas não transmissíveis, tem se tornado alvo constante de pesquisas, em busca de tratamento capaz de minorar os seus efeitos.

Desta maneira, os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o celecoxib foi eficaz na redução do peso corporal e da glicose de camundongos obesos, oferecendo um efeito protetor contra um perfil de resposta pró-inflamatória e modulando a atividade do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo branco. Além de agir na esteatose hepática reduzindo fatores ligados à lipogênese.

Diante disso, conclui-se que a administração oral de celecoxib foi eficaz no tratamento da síndrome metabólica/obesidade e da esteatose hepática, em modelo murino.

REFERÊNCIAS

1. Wanderley EN, Ferreira VA. [Obesity: a plural perspective]. *Ciencia & saude coletiva*. 2010 Jan;15(1):185-94. PubMed PMID: 20169245. Obesidade: uma perspectiva plural.
2. Fuentes E, Guzman-Jofre L, Moore-Carrasco R, Palomo I. Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome (Review). *Molecular medicine reports*. 2013 Dec;8(6):1611-6. PubMed PMID: 24100795.
3. Morrison MC, Kleemann R. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Frontiers in immunology*. 2015;6:308. PubMed PMID: 26124760. Pubmed Central PMCID: 4467247.
4. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52. PubMed PMID: 16157765.
5. Singh PP, Mahadi F, Roy A, Sharma P. Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2009 Oct;24(4):324-42. PubMed PMID: 23105858. Pubmed Central PMCID: 3453064.
6. Dobson R, Burgess MI, Sprung VS, Irwin A, Hamer M, Jones J, et al. Metabolically healthy and unhealthy obesity: differential effects on myocardial function according to metabolic syndrome, rather than obesity. *International journal of obesity*. 2015 Aug 14. PubMed PMID: 26271188.
7. Hwang IC, Suh SY, Suh AR, Ahn HY. The relationship between normal serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Korean medical science*. 2011 Mar;26(3):386-91. PubMed PMID: 21394307. Pubmed Central PMCID: 3051086.
8. Saito T, Misawa K, Kawata S. 1. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. *Internal medicine*. 2007;46(2):101-3. PubMed PMID: 17220609.
9. Hsieh PS, Lu KC, Chiang CF, Chen CH. Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *European journal of clinical investigation*. 2010 Feb;40(2):164-71. PubMed PMID: 20039930.
10. Liu H, Yu JM, Pan CY, Chen F, Li J, Hu DY. [Cross-sectional study on the prevalence of metabolic syndrome in patients with coronary heart disease in China]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2006 Aug 15;86(30):2095-8. PubMed PMID: 17064610.
11. Lim S, Jang HC, Park KS, Cho SI, Lee MG, Joung H, et al. Changes in metabolic syndrome in American and Korean youth, 1997-2008. *Pediatrics*. 2013 Jan;131(1):e214-22. PubMed PMID: 23209102.

12. Mogre V, Salifu ZS, Abedandi R. Prevalence, components and associated demographic and lifestyle factors of the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2014;13:80. PubMed PMID: 25054102. Pubmed Central PMCID: 4106220.
13. Beigh SH, Jain S. Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformation*. 2012;8(13):613-6. PubMed PMID: 22829741. Pubmed Central PMCID: 3400989.
14. Borges PK, Gimeno SG, Tomita NE, Ferreira SR. [Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease]. *Cadernos de saude publica*. 2007 Mar;23(3):657-68. PubMed PMID: 17334579. Prevalencia e características associadas a síndrome metabólica em nipo-brasileiros com e sem doença periodontal.
15. Abraham SB, Rubino D, Sinaï N, Ramsey S, Nieman LK. Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: a cross-sectional study of obese subjects and review of the literature. *Obesity*. 2013 Jan;21(1):E105-17. PubMed PMID: 23505190. Pubmed Central PMCID: 3602916.
16. Teixeira de Paula JA, Costa Moreira O, Diniz da Silva C, Santos Silva D, Dos Santos Amorim PR. Metabolic syndrome prevalence in elderly of urban and rural communities participants in the HIPERDIA in the city of Coimbra/MG, Brazil. *Investigacion y educacion en enfermeria*. 2015 Aug;33(2):325-33. PubMed PMID: 26535853.
17. Echavarria-Pinto M, Hernandez-Lomeli A, Alcocer-Gamba MA, Morales-Flores H, Vazquez-Mellado A. [Metabolic syndrome in adults from 20 to 40 years old in a rural Mexican community]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2006 Jul-Aug;44(4):329-35. PubMed PMID: 16904036. Síndrome metabólico en adultos de 20 a 40 años en una comunidad rural mexicana.
18. Jahangiry L, Shojaeizadeh D, Najafi M, Mohammad K, Abbasalizad Farhangi M, Montazeri A. 'Red Ruby': an interactive web-based intervention for lifestyle modification on metabolic syndrome: a study protocol for a randomized controlled trial. *BMC public health*. 2014;14:748. PubMed PMID: 25059121. Pubmed Central PMCID: 4122769.
19. Olsen MH, Hansen TW, Christensen MK, Gustafsson F, Rasmussen S, Wachtell K, et al. Impact of the metabolic syndrome on the predictive values of new risk markers in the general population. *Journal of human hypertension*. 2008 Sep;22(9):634-40. PubMed PMID: 18528412.
20. Hashemi M, Rezaei H, Eskandari-Nasab E, Kaykhaei MA, Taheri M. Association between the apelin rs2235306 gene polymorphism and metabolic syndrome. *Turkish journal of medical sciences*. 2014;44(5):775-80. PubMed PMID: 25539544.
21. Malczewska-Malec M, Wybranska I, Leszczynska-Golabek I, Partyka L, Hartwich J, Jabrocka A, et al. Analysis of candidate genes in Polish families with obesity. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2004 May;42(5):487-93. PubMed PMID: 15202783.

22. Luna RL. [Metabolic syndrome]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2007 May;88(5):e124-6. PubMed PMID: 17589618. Síndrome metabólica.
23. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M, American Diabetes A, European Association for the Study of D. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*. 2005 Sep;28(9):2289-304. PubMed PMID: 16123508.
24. Damiani D, Kuba VM, Cominato L, Damiani D, Dichtchekian V, Menezes Filho HC. [Metabolic syndrome in children and adolescents: doubts about terminology but not about cardiometabolic risks]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2011 Nov;55(8):576-82. PubMed PMID: 22218439. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes: dúvidas na terminologia, mas não nos riscos cardiometabólicos.
25. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2014 Aug;28(4):637-53. PubMed PMID: 25194181.
26. Kawai K, Sakairi T, Harada S, Shinozuka J, Ide M, Sato H, et al. Diet modification and its influence on metabolic and related pathological alterations in the SHR/NDmcr-cp rat, an animal model of the metabolic syndrome. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*. 2012 May;64(4):333-8. PubMed PMID: 20965707.
27. Neto JMF, Nader BB. Síndrome metab[ol]ica e exercício físico: fatores relacionados à resistência à insulina. *EFDeportes.com. Revista digital*. 2012 Sep;172(17).
28. Vasan RS, Pencina MJ, Cobain M, Freiberg MS, D'Agostino RB. Estimated risks for developing obesity in the Framingham Heart Study. *Annals of internal medicine*. 2005 Oct 4;143(7):473-80. PubMed PMID: 16204159.
29. World Health Organization [Internet]. Global Health Observatory Map Gallery: Noncommunicable diseases/obesity; 2014 - [citado em 2015 nov 8]. Disponível em: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>
30. Ministério da Saúde [Internet]. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: Evolução da frequência de obesidade; 2014 [citado em 2015 nov 8]. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/72/553a243c4b9f3.pdf>
31. Torrens JM, Konieczna J, Palou M, Sanchez J, Pico C, Palou A. Early biomarkers identified in a rat model of a healthier phenotype based on early postnatal dietary intervention may predict the response to an obesogenic environment in adulthood. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014 Feb;25(2):208-18. PubMed PMID: 24445046.
32. Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(12):1225-30. PubMed PMID: 18473870.
33. Jiao P, Chen Q, Shah S, Du J, Tao B, Tzamelis I, et al. Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun

NH2-terminal kinase pathways. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):104-15. PubMed PMID: 18835938. Pubmed Central PMCID: 2606857.

34. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*. 2011;29:415-45. PubMed PMID: 21219177.

35. Korek E, Krauss H. Novel adipokines: their potential role in the pathogenesis of obesity and metabolic disorders. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 2015;69(0):799-810. PubMed PMID: 26206994.

36. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert opinion on investigational drugs*. 2005 Aug;14(8):1019-31. PubMed PMID: 16050794.

37. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2002 Jan 24;89(2A):3A-9A; discussion 10A. PubMed PMID: 11835903.

38. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GM, et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *Journal of cellular biochemistry*. 2010 Jun 1;110(3):564-72. PubMed PMID: 20512917.

39. Jonas MI, Kurylowicz A, Bartoszewicz Z, Lisik W, Jonas M, Wierzbicki Z, et al. Interleukins 6 and 15 Levels Are Higher in Subcutaneous Adipose Tissue, but Obesity Is Associated with Their Increased Content in Visceral Fat Depots. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):25817-30. PubMed PMID: 26516848.

40. Fernandez Munoz MJ, Basurto Acevedo L, Cordova Perez N, Vazquez Martinez AL, Tepach Gutierrez N, Vega Garcia S, et al. Epicardial adipose tissue is associated with visceral fat, metabolic syndrome, and insulin resistance in menopausal women. *Revista espanola de cardiologia*. 2014 Jun;67(6):436-41. PubMed PMID: 24863591.

41. Mario EG, Santos SH, Ferreira AV, Bader M, Santos RA, Botion LM. Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*. 2012 Jan;33(1):174-7. PubMed PMID: 22119778.

42. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 May;30(5):953-61. PubMed PMID: 20203301.

43. Kohlstedt K, Gershon C, Trouvain C, Hofmann WK, Fichtlscherer S, Fleming I. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors modulate cellular retinol-binding protein 1 and adiponectin expression in adipocytes via the ACE-dependent signaling cascade. *Molecular pharmacology*. 2009 Mar;75(3):685-92. PubMed PMID: 19114589.

44. Krysiak R, Sierant M, Marek B, Okopien B. The effect of perindopril and enalapril on plasma resistin levels in normotensive patients with coronary heart disease. *Endokrynologia Polska*. 2010 Nov-Dec;61(6):683-90. PubMed PMID: 21104642.

45. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World journal of diabetes*. 2015 Feb 15;6(1):151-66. PubMed PMID: 25685286. Pubmed Central PMCID: 4317307.
46. Liao SB, Wong PF, Wso, Cheung BM, Tang F. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2013 Jan;45(1):31-7. PubMed PMID: 22956308.
47. Balsan GA, Vieira JL, Oliveira AM, Portal VL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2015 Jan-Feb;61(1):72-80. PubMed PMID: 25909213.
48. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Nov;93(11 Suppl 1):S57-63. PubMed PMID: 18987271. Pubmed Central PMCID: 2585758.
49. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 Mar 25;316(2):129-39. PubMed PMID: 19723556.
50. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91. PubMed PMID: 7678183.
51. Weiss EP, Brandauer J, Kulaputana O, Ghu IA, Wohn CR, Phares DA, et al. FABP2 Ala54Thr genotype is associated with glucoregulatory function and lipid oxidation after a high-fat meal in sedentary nondiabetic men and women. *The American journal of clinical nutrition*. 2007 Jan;85(1):102-8. PubMed PMID: 17209184.
52. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881-7. PubMed PMID: 17167477.
53. Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *The American journal of medicine*. 2009 Mar;122(3):248-56 e5. PubMed PMID: 19272486.
54. Caio Jr JS, Caio VH. *Clínicas Caio*[Internet]. São Paulo: MMXI, Van Der Haagen; [atualizado em 2015 Nov 24; citado em 2013]. Disponível em: http://clincascaioligacao.blogspot.com.br/2015_09_01_archive.html
55. Gao D, Madi M, Ding C, Fok M, Steele T, Ford C, et al. Interleukin-1beta mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014 Aug 1;307(3):E289-304. PubMed PMID: 24918199. Pubmed Central PMCID: 4121578.
56. Matsunaga T, Shoji A, Gu N, Joo E, Li S, Adachi T, et al. gamma-Tocotrienol attenuates TNF-alpha-induced changes in secretion and gene expression of MCP-1, IL-6 and

adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular medicine reports*. 2012 Apr;5(4):905-9. PubMed PMID: 22293775. Pubmed Central PMCID: 3493080.

57. Arslan N, Erdur B, Aydin A. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian pediatrics*. 2010 Oct;47(10):829-39. PubMed PMID: 21048235.

58. Zhu MJ, Han B, Tong J, Ma C, Kimzey JM, Underwood KR, et al. AMP-activated protein kinase signalling pathways are down regulated and skeletal muscle development impaired in fetuses of obese, over-nourished sheep. *The Journal of physiology*. 2008 May 15;586(10):2651-64. PubMed PMID: 18372306. Pubmed Central PMCID: 2464338.

59. Heber D. An integrative view of obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2010 Jan;91(1):280S-3S. PubMed PMID: 19923373. Pubmed Central PMCID: 2793113.

60. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2009 Dec;34(6):1079-86. PubMed PMID: 20029517.

61. Skov J, Persson F, Frokiaer J, Christiansen JS. Tissue Renin-Angiotensin Systems: A Unifying Hypothesis of Metabolic Disease. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:23. PubMed PMID: 24592256. Pubmed Central PMCID: 3938116.

62. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822-8. PubMed PMID: 12075344.

63. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):340-7. PubMed PMID: 18025412.

64. Skipworth JR, Szabadkai G, Olde Damink SW, Leung PS, Humphries SE, Montgomery HE. Review article: pancreatic renin-angiotensin systems in health and disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011 Oct;34(8):840-52. PubMed PMID: 21851372.

65. Howlett TA. Hormonal responses to exercise and training: a short review. *Clinical endocrinology*. 1987 Jun;26(6):723-42. PubMed PMID: 3311482.

66. Rao A, Pandya V, Whaley-Connell A. Obesity and insulin resistance in resistant hypertension: implications for the kidney. *Advances in chronic kidney disease*. 2015 May;22(3):211-7. PubMed PMID: 25908470.

67. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *The Journal of clinical investigation*. 1993 May;91(5):2058-64. PubMed PMID: 8387539. Pubmed Central PMCID: 288204.

68. Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clinical cornerstone*. 2006;8 Suppl 4:S7-S13. PubMed PMID: 17208666.
69. Smitka K, Maresova D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague medical report*. 2015;116(2):87-111. PubMed PMID: 26093665.
70. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2007 May;39(5):314-21. PubMed PMID: 17533572.
71. Faloia E, Camilloni MA, Giacchetti G, Mantero F. Adipose tissue as an endocrine organ? A review of some recent data. *Eating and weight disorders : EWD*. 2000 Sep;5(3):116-23. PubMed PMID: 11082790.
72. Giacchetti G, Faloia E, Sardu C, Camilloni MA, Mariniello B, Gatti C, et al. Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000 Jun;24 Suppl 2:S142-3. PubMed PMID: 10997636.
73. Schweizer JR, Miranda PA, Foscolo RB, Lemos JP, Paula LF, Silveira WC, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition increases glucose-induced insulin secretion in response to acute restraint. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2012 Dec;39(12):1034-7. PubMed PMID: 23734984.
74. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1270-7. PubMed PMID: 10856276.
75. Krskova K, Filipcik P, Zilka N, Olszanecki R, Korbut R, Gajdosechova L, et al. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme mRNA decrease and AT1 receptor mRNA and protein increase in epididymal fat tissue accompany age-induced elevation of adiposity and reductions in expression of GLUT4 and peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma). *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2011 Aug;62(4):403-10. PubMed PMID: 22100841.
76. Mallow H, Trindl A, Loffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2000 Nov-Dec;32(11-12):500-3. PubMed PMID: 11246815.
77. Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, et al. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *American journal of hypertension*. 2002 May;15(5):381-8. PubMed PMID: 12022238.
78. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004 Oct;287(4):R943-9. PubMed PMID: 15191907.

79. Whaley-Connell A, Pavey BS, Chaudhary K, Saab G, Sowers JR. Renin-angiotensin-aldosterone system intervention in the cardiometabolic syndrome and cardio-renal protection. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2007 Oct;1(1):27-35. PubMed PMID: 19124393.
80. Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 May 6;105(18):6531-6. PubMed PMID: 18443281. Pubmed Central PMCID: 2373349.
81. Takahashi N, Li F, Hua K, Deng J, Wang CH, Bowers RR, et al. Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell metabolism*. 2007 Dec;6(6):506-12. PubMed PMID: 18054319. Pubmed Central PMCID: 2174204.
82. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Pôrto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008 Feb; 57(2):340-7. PubMed PMID: 18025412.
83. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005 Sep;22(9):1129-33. PubMed PMID: 16108837.
84. Praveenraj P, Gomes RM, Kumar S, Karthikeyan P, Shankar A, Parthasarathi R, et al. Prevalence and Predictors of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Morbidly Obese South Indian Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Obesity surgery*. 2015 Apr 3. PubMed PMID: 25835982.
85. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):44-52. PubMed PMID: 15895401.
86. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of hepatology*. 2010 Aug;53(2):372-84. PubMed PMID: 20494470.
87. Azzalini L, Ferrer E, Ramalho LN, Moreno M, Dominguez M, Colmenero J, et al. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1567-76. PubMed PMID: 20432253.
88. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*. 2013 Jan;93(1):359-404. PubMed PMID: 23303913.
89. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine*. 2001 Aug;7(8):941-6. PubMed PMID: 11479627.

90. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *Journal of hepatology*. 2008;48 Suppl 1:S104-12. PubMed PMID: 18304679.
91. Nakamuta M, Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. The significance of differences in fatty acid metabolism between obese and non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*. 2008 Nov;22(5):663-7. PubMed PMID: 18949388.
92. Park JS, Seo JH, Youn HS. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*. 2013 Mar;16(1):22-7. PubMed PMID: 24010102. Pubmed Central PMCID: 3746040.
93. Eliades M, Spyrou E. Vitamin D: a new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2015 Feb 14;21(6):1718-27. PubMed PMID: 25684936. Pubmed Central PMCID: 4323447.
94. Yang CQ, Shu L, Wang S, Wang JJ, Zhou Y, Xuan YJ, et al. Dietary Patterns Modulate the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Adults. *Nutrients*. 2015 Jun;7(6):4778-91. PubMed PMID: 26083112. Pubmed Central PMCID: 4488813.
95. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014 Feb 21;20(7):1724-45. PubMed PMID: 24587651. Pubmed Central PMCID: 3930972.
96. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*. 2010 Sep 30;363(14):1341-50. PubMed PMID: 20879883.
97. Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *Journal of gastroenterology*. 2008;43(7):509-18. PubMed PMID: 18648737.
98. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Mar;1801(3):209-14. PubMed PMID: 19948243.
99. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1483-94. PubMed PMID: 18393316.
100. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994 Oct;107(4):1103-9. PubMed PMID: 7523217.
101. Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes & metabolism*. 2008 Sep;34(4 Pt 1):317-27. PubMed PMID: 18550411.
102. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *The*

Journal of clinical investigation. 2009 Nov;119(11):3213-25. PubMed PMID: 19855130. Pubmed Central PMCID: 2769179.

103. Sharma M, Mitnala S, Vishnubhotla RK, Mukherjee R, Reddy DN, Rao PN. The Riddle of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Progression From Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015 Jun;5(2):147-58. PubMed PMID: 26155043. Pubmed Central PMCID: 4491606.

104. Jorge SG. *Hepatologia Médica* [Internet]. São Paulo: Hepcentro; [atualizado em 2011 Abr 16; citado em 2003]. Disponível em: <http://www.hepcentro.com.br/esteatose.htm>.

105. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology*. 1998 Jun;27(6):1463-6. PubMed PMID: 9620314.

106. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004 Jul;40(1):185-94. PubMed PMID: 15239102.

107. Marina A, von Frankenberg AD, Suvag S, Callahan HS, Kratz M, Richards TL, et al. Effects of dietary fat and saturated fat content on liver fat and markers of oxidative stress in overweight/obese men and women under weight-stable conditions. *Nutrients*. 2014 Nov;6(11):4678-90. PubMed PMID: 25353663. Pubmed Central PMCID: 4245556.

108. Kotzka J, Muller-Wieland D. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1: gene regulatory target for insulin resistance? Expert opinion on therapeutic targets. 2004 Apr;8(2):141-9. PubMed PMID: 15102555.

109. Yoon M. The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacological research*. 2009 Sep;60(3):151-9. PubMed PMID: 19646654.

110. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology*. 2015 May 18;7(8):1012-9. PubMed PMID: 26052390. Pubmed Central PMCID: 4450178.

111. Claire D'Andre H, Paul W, Shen X, Jia X, Zhang R, Sun L, et al. Identification and characterization of genes that control fat deposition in chickens. *Journal of animal science and biotechnology*. 2013;4(1):43. PubMed PMID: 24206759. Pubmed Central PMCID: 3874612

112. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*. 2001 Apr;2(4):282-6. PubMed PMID: 11306547. Pubmed Central PMCID: 1083868.

113. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec;59 Suppl 7:31-55. PubMed PMID: 19258656.

114. Aygun D, Kaplan S, Odaci E, Onger ME, Altunkaynak ME. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. *Histology and histopathology*. 2012 Apr;27(4):417-36. PubMed PMID: 22374720.

115. Garavito RM, Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenases. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 2003;32:183-206. PubMed PMID: 12574066.
116. Muscara MN, Wallace JL. COX-inhibiting nitric oxide donors (CINODs): potential benefits on cardiovascular and renal function. Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry. 2006 Apr;4(2):155-64. PubMed PMID: 16611049.
117. Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: balancing gastrointestinal and cardiovascular risk. BMC musculoskeletal disorders. 2007;8:73. PubMed PMID: 17683540. Pubmed Central PMCID: 2001315.
118. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annual review of pharmacology and toxicology. 1998;38:97-120. PubMed PMID: 9597150.
119. Davies NM, Jamali F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques. 2004 Oct 29;7(3):332-6. PubMed PMID: 15576013.
120. Huang HC, Wang SS, Chen YC, Lee FY, Chang FY, Lin HC, et al. Cyclooxygenase expression in splanchnic hyposensitivity to glypressin of bleeding portal hypertensive rats. European journal of clinical investigation. 2003 Jun;33(6):505-12. PubMed PMID: 12795648.
121. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological reviews. 2004 Sep;56(3):387-437. PubMed PMID: 15317910.
122. Hatazawa R, Tanaka A, Tanigami M, Amagase K, Kato S, Ashida Y, et al. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2007 Oct;293(4):G788-97. PubMed PMID: 17673547.
123. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Oct 15;99(21):13926-31. PubMed PMID: 12242329. Pubmed Central PMCID: 129799.
124. Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2005 Feb;72(2):85-7. PubMed PMID: 15626590.
125. Kern MA, Hagg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. Cancer research. 2006 Jul 15;66(14):7059-66. PubMed PMID: 16849551.

126. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacology & therapeutics*. 2011 Feb;129(2):195-205. PubMed PMID: 20920529.
127. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer metastasis reviews*. 2007 Dec;26(3-4):525-34. PubMed PMID: 17763971.
128. Kudo I, Murakami M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2005 Nov 30;38(6):633-8. PubMed PMID: 16336776.
129. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Oct 20;275(42):32783-92. PubMed PMID: 10869354.
130. Stichtenoth DO, Frolich JC. [Therapy with preferential and specific COX-2 inhibitors]. *Der Internist*. 2001 Mar;42(3):421-6. PubMed PMID: 11277028. Therapie mit praferentiellen und spezifischen COX-2-Inhibitoren.
131. Alacqua M, Trifiro G, Cavagna L, Caporali R, Montecucco CM, Moretti S, et al. Prescribing pattern of drugs in the treatment of osteoarthritis in Italian general practice: the effect of rofecoxib withdrawal. *Arthritis and rheumatism*. 2008 Apr 15;59(4):568-74. PubMed PMID: 18383398.
132. Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2004 Dec;27(6):479-90. PubMed PMID: 15601442.
133. Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochemical pharmacology*. 2004 Apr 15;67(8):1469-78. PubMed PMID: 15041464.
135. Moodley I. Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDs. *Cardiovascular journal of Africa*. 2008 Mar-Apr;19(2):102-7. PubMed PMID: 18516356. Pubmed Central PMCID: 3975213.
136. Raja R, Kingsbury SR, Wise E, Conaghan PG. Primary care approaches to musculoskeletal multiple-site joint pain pharmacological therapy: a survey of general practitioners. *Primary health care research & development*. 2014 Oct;15(4):476-81. PubMed PMID: 24451110.
137. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Advances in experimental medicine and biology*. 1997;433:131-8. PubMed PMID: 9561120.

138. Fuhr L, Rousseau M, Plauth A, Schroeder FC, Sauer S. Amorfrutins Are Natural PPAR γ Agonists with Potent Anti-inflammatory Properties. *Journal of natural products*. 2015 May 22;78(5):1160-4. PubMed PMID: 25938459.
139. Huang GJ, Deng JS, Chiu CS, Liao JC, Hsieh WT, Sheu MJ, et al. Hispolon Protects against Acute Liver Damage in the Rat by Inhibiting Lipid Peroxidation, Proinflammatory Cytokine, and Oxidative Stress and Downregulating the Expressions of iNOS, COX-2, and MMP-9. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2012;2012:480714. PubMed PMID: 22013489. Pubmed Central PMCID: 3195309.
140. Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *International journal of oncology*. 2005 May;26(5):1419-28. PubMed PMID: 15809736.
141. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer research*. 2001 Jun 1;61(11):4375-81. PubMed PMID: 11389063.
142. Johnson CC, Hayes RB, Schoen RE, Gunter MJ, Huang WY, Team PT. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and colorectal polyps in the Prostate, Lung, Colorectal, And Ovarian Cancer Screening Trial. *The American journal of gastroenterology*. 2010 Dec;105(12):2646-55. PubMed PMID: 20808298.
143. Harris RE, Casto BC, Harris ZM. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2014 Oct 10;5(4):677-92. PubMed PMID: 25302170. Pubmed Central PMCID: 4129532.
144. Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Baglolle CJ, Phipps RP, et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004 Nov;287(5):L981-91. PubMed PMID: 15234907.
145. Berthou F, Ceppo F, Dumas K, Massa F, Vergoni B, Alemany S, et al. The Tpl2 Kinase Regulates the COX-2/Prostaglandin E2 Axis in Adipocytes in Inflammatory Conditions. *Molecular endocrinology*. 2015 Jul;29(7):1025-36. PubMed PMID: 26020725.
146. Granado M, Martin AI, Castellero E, Lopez-Calderon A, Villanua MA. Cyclooxygenase-2 inhibition reverts the decrease in adiponectin levels and attenuates the loss of white adipose tissue during chronic inflammation. *European journal of pharmacology*. 2009 Apr 17;608(1-3):97-103. PubMed PMID: 19239908.
147. Lijnen HR, Van Hoef B, Lu HR, Gallacher DJ. Rofecoxib impairs adipose tissue development in a murine model of nutritionally induced obesity. *Thrombosis and haemostasis*. 2008 Aug;100(2):338-42. PubMed PMID: 18690356.
148. Michaud A, Lacroix-Pepin N, Pelletier M, Daris M, Biertho L, Fortier MA, et al. Expression of genes related to prostaglandin synthesis or signaling in human subcutaneous and omental adipose tissue: depot differences and modulation by adipogenesis. *Mediators of*

inflammation. 2014;2014:451620. PubMed PMID: 25477713. Pubmed Central PMCID: 4244696.

149. Bhattacharya I, Dominguez AP, Dragert K, Humar R, Haas E, Battegay EJ. Hypoxia potentiates tumor necrosis factor-alpha induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015 May 29;461(2):287-92. PubMed PMID: 25881506.

150. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society transactions*. 2005 Nov;33(Pt 5):1078-81. PubMed PMID: 16246049.

151. Fujimori K. Prostaglandins as PPARgamma Modulators in Adipogenesis. *PPAR research*. 2012;2012:527607. PubMed PMID: 23319937. Pubmed Central PMCID: 3540890.

152. Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, et al. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science*. 2010 May 28;328(5982):1158-61. PubMed PMID: 20448152.

153. Frances DE, Motino O, Agra N, Gonzalez-Rodriguez A, Fernandez-Alvarez A, Cucarella C, et al. Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance. *Diabetes*. 2015 May;64(5):1522-31. PubMed PMID: 25422106.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação e Bem-estar Animal da UNIMONTES.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL



PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 29 de fevereiro de 2012.

Processo N. °22

Título do Projeto: Avaliação do Perfil Metabólico e de marcadores associados à inflamação em camundongos da linhagem FVB/N submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com inibidores da ciclooxigenase II (COX-2) e Resveratrol

Orientador: Prof. Sérgio Henrique Sousa Santos

Histórico

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares relacionados à deposição central de gordura e à resistência à ação da insulina (5). Entre esses fatores de risco, incluem-se a dislipidemia, a obesidade centripeta, a alteração na homeostase glicêmica e a hipertensão arterial sistêmica. A prevalência de SM na população em geral é de aproximadamente 24% (6), chegando a mais de 80% entre os pacientes com *Diabetes Mellitus* (DM) tipo 2. A SM é um importante fator de risco de mortalidade precoce em indivíduos não-diabéticos e em pacientes com DM tipo 2. Entretanto, o papel da SM como entidade independente e associada a um maior risco para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares tem sido recentemente questionado. A obesidade está associada a uma resposta inflamatória crônica, caracterizada pela produção anormal de adipocinas e a ativação de alguns vias de sinalização pró-inflamatórias, resultando na indução de vários marcadores de inflamatórios. Diversos componentes, como o resveratrol e os inibidores da COX-2 têm apresentado efeitos positivos na resposta inflamatória em modelos de animais obesos, demonstrando-se viáveis na modulação de entidades patológicas envolvidas na síndrome metabólica.

Mérito

Será avaliado o perfil lipídico e glicêmico de camundongos da linhagem FVB/N submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com resveratrol e inibidores da COX-2. Os resultados do presente projeto permitirão conhecer o efeito da administração do resveratrol e inibidores da COX-2 em modelos animais de síndrome metabólica, sendo de fundamental importância como testes pré-clínicos de avaliação de efeitos adversos abrindo a perspectiva de desenvolvimento de novos medicamentos para combater as doenças cardiometabólicas que mais acometem e matam a população mundial.

Parecer

A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes analisou o processo 022 e entende que o mesmo está completo e dentro das normas da Comissão e das Resoluções do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.

Prof. Orlando Raphael Lopasso Júnior
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da UNIMONTES

ANEXO B – Normas de formatação do produto 1 / Life Science

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Maximum length 150 characters including spaces. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.
- 2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. A structured abstract has to be submitted for full length articles (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:
 - Aims:
 - Main methods:
 - Key findings:
 - Significance:
5. Three or more key words for indexing purposes. In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In full papers, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped

line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/life-sciences>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Bamaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

ANEXO C – Normas de formatação do produto 2 / Digestive and Liver Disease



Guide for Authors

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Digestive and Liver Disease publishes papers reporting basic and clinical research in the field of Gastroenterology and Hepatology:

The Journal's format is in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) and the 2008 guidelines of the Council of Science Editors (CSE) to promote integrity in scientific publications. For details

see: <http://www.icmje.org/> , <http://www.councilscienceeditors.org>

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

Original Papers

The maximum length is 3,500 words, excluding the abstract, references, tables and figures. The abstract should be structured and not exceed 200 words.

Randomized clinical trials must be registered and the CONSORT checklist included with the submission.

PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should have wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections.

Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the Journal to become familiar with layout and conventions.

Values should be expressed in SI and metric system units of measurement. Statistical methods are to be described in detail. If the names of drugs or equipment are used, the name of the manufacturer, town and country should be given.

USE OF ABBREVIATIONS

Title, Abstract, Table headers and Figure legends should not contain abbreviations.

Standard abbreviations may be used in the text; they are to be placed in parentheses after the full term is used for the first time.

All abbreviations contained in the Figures must be explained in the Figure legend, even if already explained in the text.

All abbreviations contained in the Tables must be explained in a footnote below each table, even if already explained in the text.

Each manuscript should be organized in the following order:

1. Title page:

- Title (this should be clear, descriptive and not exceed 160 characters, including spaces)
- Name(s) of Author(s) with their highest earned degrees. Authorship should only be assumed by those workers who have contributed materially to the work and its report. Authorship credit should be based on:
 1. substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
 2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
 3. final approval of the version to be published
 Authors should meet conditions 1, 2, and 3. Colleagues who have otherwise assisted or collaborated should be recognized in the Acknowledgement section.
- Complete postal address(es) of affiliations
- Electronic word count (excluding abstract, references, tables, figures)
- Full telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding Author

- Present address(es) of Author(s) if applicable complete correspondence address (including postal zip code) and e-mail address to which the proofs should be sent
- Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of the above

2. Abstract:

This should contain no more than 200 words. For original articles, the abstract should be structured (i.e., divided into six sections Background, Aims, Methods, Results, and Conclusion). Abstracts should briefly describe the problem being addressed in the study, how the study was performed and which measurements were carried out, the most relevant results, and what the Authors conclude from the results.

An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential they must be cited in full without reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

3. Key words: A list of 2-4 words or short phrases not already included in the title should be included after the abstract for indexing purposes

4. Introduction:

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

5. Materials and Methods:

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Animal studies. Manuscripts reporting experiments using animals must include a statement giving assurance that all animals received humane care and that study protocols comply with the institution's guidelines and animal research laws.

6. Results:

These should be presented precisely, keeping discussion of their importance to a minimum. Do not duplicate information contained in tables and figures.

7. Discussion:

This should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic. Please include the conclusion in this section, unless it is a review article.

8. Appendices:

Identify appendices with capital letters: A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: (Eq. A.1), (Eq. A.2), etc.; in a subsequent appendix, (Eq. B.1) and so forth.

9. Acknowledgements:

This section should acknowledge colleagues who have assisted or collaborated in the study who did not meet full authorship criteria (see Title Page).

10. References:

References should be numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. The format of the references in the bibliography section should conform with the examples provided in *New Engl J Med* 1997;336:309-15.

References with four or more authors, the first three authors only must be listed, followed by et al. E

11. Tables:

Tables should be typed with double spacing each on a separate sheet, numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. The text should include references to all tables. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text. Each table should have a brief and self-explanatory title. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters, indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Authors should

take notice of the limitations set by the size and layout of the Journal. Large tables should be avoided, reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

- Tables must be uploaded separately
- There must be no more than a total of 6 figures and tables

12. Illustrations:

All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, in TIFF, EPS, JPEG or PDF format.

- Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
- Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
- Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
- If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
- Each illustration should have a legend. The legends to all illustrations should be typed on a separate sheet at the end of the manuscript.
- Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
- Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
- If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the Author contributes the additional cost of reproduction: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
- Advice on the preparation of electronic artwork can be found at the following URL: <http://elsevier.com/artworkinstructions>
- There must be no more than a total of 6 figures and tables

13. Figures and Photographs:

Figures and photographs of good quality should be submitted online as a separate file. Please use a lettering that remains clearly readable even after reduction to about 66%. For every figure or photograph a legend should be provided, legends should be typed double-spaced and numbered consecutively in the order of their citation using Arabic numerals. All Authors wishing to use illustrations already published must first obtain the permission of the Author and publisher and/or copyright holders and give precise reference to the original work. This permission must include the right to publish in electronic media.

14. Footnotes:

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.