

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Raquel Rangel Silveiras

Papel de produtos finais de glicação avançada nas alterações hepáticas e metabólicas em modelo experimental de síndrome metabólica

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Anissa Daliry

Rio de Janeiro
2019

Rangel Silveiras, Raquel .

Papel de produtos finais de glicação avançada nas alterações hepáticas e metabólicas em modelo experimental de síndrome metabólica. / Raquel Rangel Silveiras. - Rio de Janeiro, 2019.

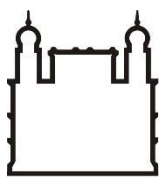
71 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Anissa Daliry.

Bibliografia: f. 60-72

1. DHGNA. 2. Fígado. 3. AGEs. 4. Piridoxamina. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Raquel Rangel Silveiras

Papel de produtos finais de glicação avançada nas alterações hepáticas e metabólicas em modelo experimental de síndrome metabólica

Aprovada em: 16/06/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marco Aurélio Martins – Fundação Oswaldo Cruz **Presidente**

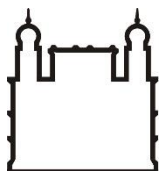
Prof. Dr^a. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Prof. Dr^a. Natália Galito Rocha Ayres – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr^a. Karen de Jesus Oliveira – Universidade Federal Fluminense –
Suplente/Revisor

Prof. Dr^a. Isalira Peroba Ramos de Góes Freitas – Universidade Federal do Rio de Janeiro - Suplente

Rio de Janeiro, 16 de Junho de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Agradecimento

Agradeço, primeiramente, a Deus por permanecer ao meu lado protegendo-me e guiando-me durante toda a minha vida.

À minha orientadora e amiga; Anissa Daliry, uma mãe científica; pela orientação, dedicação e paciência. Sou eternamente grata aos seus ensinamentos, apoio e amizade.

Aos meus bebês, Miguel e Júlia, por serem tudo na minha vida.

Aos meus pais, Fernando e Rosani, que além de toda dedicação, amor e carinho, me proporcionaram a oportunidade de alcançar conhecimentos os quais levarei por toda vida,

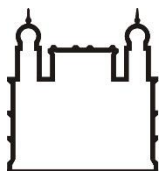
A minha Irmã Fernanda pela amizade, companheirismo e pelo lindo sobrinho.

A minha avó por suas orações.

Aos demais familiares pelo apoio e torcida. Em especial a Tia Rosiléa, por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu namorado Henrique por todo amor, cumplicidade e paciência.

Aos amigos da Fiocruz, em especial Karine Lino, Evelyn Nunes e Edgard Flores, pelo acolhimento, pela boa vontade em esclarecer minhas dúvidas e incentivar minhas descobertas. Muito obrigada por tudo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

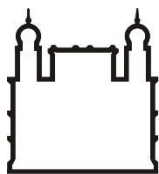
Papel de produtos finais de glicação avançada nas alterações hepáticas e metabólicas em modelo experimental de síndrome metabólica

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raquel Rangel Silveiras

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) afeta um terço da população adulta e é definida como o acúmulo de gordura no fígado de indivíduos que não consomem excessiva quantidade de álcool. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela progressão da doença ainda não foram completamente elucidados. Estudos anteriores do nosso grupo e outros autores demonstraram que o aumento nos níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e distúrbios da microcirculação estão presentes na DHGNA, mas nenhuma evidência direta da ligação entre os níveis de AGEs, estresse oxidativo, inflamação e alterações microcirculatórias hepáticas foi demonstrada. No presente trabalho, nós investigamos os efeitos protetores da piridoxamina (PirPM), um inibidor da formação de AGEs, nas complicações metabólicas e microcirculatórias na DHGNA. A DHGNA foi induzida por uma dieta hiperlipídica (HFD) em ratos Wistar durante 28 semanas. O tratamento com Pir (60 mg/Kg/dia, i.p.) foi administrado entre as semanas 20 e 28. Na microcirculação do fígado, o recrutamento de leucócitos e o número de células estreladas hepáticas (HSC's) ativadas foram examinados por microscopia intravital. A perfusão tecidual foi acessada por fluxometria utilizando o laser speckle. O estresse oxidativo e o marcador de inflamação foram avaliados pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e RT-PCR, respectivamente. Os AGEs no fígado foram avaliados por espectroscopia de fluorescência. Foi observado que a alteração no metabolismo da glicose e aumento do peso corporal, hepático e de tecido adiposo e esteatose no grupo DHGNA foi revertido pelo tratamento com Pir. Em relação aos parâmetros microcirculatórios hepáticos, ratos com DHGNA apresentaram aumento do rolamento e adesão de leucócitos, da ativação de HSCs e diminuição da perfusão tecidual. A Pir mostrou um efeito vasoprotetor nas alterações da microcirculação hepática induzidas pela DHGNA. O fígado de grupo DHGNA apresentou níveis elevados de peroxidação lipídica, que foram parcialmente revertidos pelo tratamento com Pir. Em conclusão, a Pir apresenta importante efeito vasoprotetor e antioxidante, além de modular os distúrbios metabólicos, sendo, portanto, um potencial tratamento para complicações microcirculatórias e metabólicas associadas à DHGNA.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Role of advanced glycation end products in liver and metabolic changes in an experimental model of metabolic syndrome

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raquel Rangel Silveiras

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) affect one-third of the adult population, and is defined as the accumulation of fat in the liver of patients who do not consume excessive alcohol. However, the molecular mechanisms that account for disease progression remains unclear. Previous studies have demonstrated that the increase in liver advanced glycation end-products (AGEs) levels and microcirculatory disturbances are present in NAFLD however no direct evidence of the link between AGE levels, oxidative stress, inflammatory pathways and hepatic microcirculatory alterations have been demonstrated. We investigated the protective effects of pyridoxamine (1) against metabolic and microcirculatory complications in NAFLD. NAFLD was induced by a high-fat diet (HFD) administration over 28 weeks. Pir treatment was administered between weeks 20 and 28. In the liver microcirculation, the recruitment of leukocytes and the number of vitamin A positive hepatic stellate cells (HSCs) were examined by *in vivo* microscopic observations. Tissue perfusion was accessed by laser speckle contrast imaging (LSCI). Oxidative stress and inflammatory parameters were assessed by thiobarbituric acid reactive substances measurement (TBARs) and RT-PCR. AGEs in the liver were evaluated by fluorescence spectroscopy. The increase in body, liver, and fat weight observed in the NAFLD group was reverted by Pir treatment. High-fat diet administration induced steatosis and impairment in glucose metabolism, which were attenuated by Pir treatment. Regarding the hepatic microcirculatory parameters, rats with HFD-induced NAFLD showed increased rolling and adhesion of leukocytes, increased HSC activation and decreased tissue perfusion. Pir showed a vasoprotective effect in the hepatic microcirculation of HFD-induced NAFLD. Livers of NAFLD group of rats had elevated levels of lipid peroxidation, which were partially reverted by the Pir treatment. Pir modulates oxidative stress, AGEs, and/or other metabolic disturbances, thus providing important vasoprotective effects. Therefore, Pir may be a potential treatment for microcirculatory and metabolic complications associated with NAFLD.

Lista de abreviaturas:

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
Alfa-SMA	Alfa-actina de músculo liso Músculo liso actina-alfa
AOS	Apneia obstrutiva do sono
apoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
AT II	Angiotensina II
ATL	Alanina aminotransferase
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	albumina de soro bovino
C/EBP alfa	Proteína alfa de ligação a potenciação/CCAAT
CKs	Células de Kupffer
CML	Carboximetil lisina
COX1	Ciclooxigenases 1
CTL	Controle
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcólica
DMT2	Diabetes mellitus do tipo 2
EHNA	Esteato-hepatite não alécolica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

EROs..... Espécies reativas de oxigênio

FASN Ácido graxo sintase

FGNA Fígado gorduroso não alcoólico

G-CSF Fator estimulador de colônias de granulócitos

HABR Resposta ao tampão arterial hepático

HDL Lipoproteínas de alta densidade

HE hematoxilina-eosina

HFD Dieta hiperlipídica

HFD+PIR Síndrome metabólica tratado com piridoxamina

HNE *Trans* -4-hidroxi-2-nonenal

HOMA-IR Avaliação do modelo homeostático para resistência à insulina

HSC Células estreladas hepáticas

ICAM-1 Molécula de adesão intercelular 1

IDF Federação Internacional de Diabetes

IFG Glicemia de jejum alterada

IFN- gama Interferon gama

IGT Intolerância à glicose

IL-10 Interleucina 10

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice massa corporal

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LPL Lipase lipoprotéica

LSEC Células hepáticas sinusoidais endoteliais

MAP Quinase ativada por mitógeno

MAPKs Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MDA Malondialdeído

MEC Matriz extracelular

NADPH Oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCEP..... Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol

NF-kB Fator de transcrição nuclear kappa B

OMS Organização Mundial da Saúde

ON Óxido nítrico

OST-48 Oligossacariltransferase

PAI-1 Inibidor de ativador de plasminogênio 1

PBS tampão fosfato salino

PI3K Fosfoinositida 3-quinase

Pir Piridoxamina

PPAR γ Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PRC Proteína C reativa

ProCOL1A1 α Cadeia alfa de procolágeno tipo 1

RAGE Receptores para produtos finais de glicação avançada

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SMet..... Síndrome metabólica

SOP..... Síndrome dos ovários policísticos

SRA Sistema Renina-angiotensina

sRAGE RAGE solúvel

SRE Sistema reticuloendotelial

TBARS Quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- beta Fator de transformação do crescimento beta .

TLR4 Receptor do tipo Toll-4

TNF-alfa Fator de necrose tumoral alfa

TXA₂ Tromboxano A₂

VCAM-1 Molécula de adesão celular vascular 1

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade de partículas de apolipoproteína B

Lista de figuras:

Figura 1.1: Mecanismos fisiopatológicos propostos para o agrupamento de características da síndrome metabólica e o aumento do risco de DMT2 e DCV.

Figura 1.2: Patogênese e curso clínico da doença hepática gordurosa não alcoólica.

Figura 1.3: Estrutura da microcirculação, demonstrando a arteríola, metarteríolas, capilares e vênulas.

Figura 1.4: Microscopia eletrônica de varredura de fígados de camundongos magros alimentados com dieta normal (A, C) em comparação com camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em carboidratos e alta gordura (B, D) por 12 meses.

Figura 1.5: Mecanismos celulares da inflamação microvascular na lesão hepática.

Figura 1.6: Principais etapas que levam à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Figura 1.7: Os efeitos extracelulares e intracelulares dos AGEs.

Figura 1.8: Estresse oxidativo e expressão de receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) no fígado.

Figura 1.9: Representação da estrutura química da piridoxamina. Modificado

Figura 1.10: Mecanismos propostos de ação farmacológica de piridoxamina.

Figura 3.1: Sistema para registro indireto da pressão arterial caudal em ratos

Figura 4.1. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o conteúdo de AGE fluorescente hepático em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.2. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o peso corporal em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.3. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a massa do tecido adiposo epididimal, abdominal e visceral em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.4. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os níveis de glicose plasmática durante o teste oral de tolerância à glicose e a glicemia de jejum em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.5. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os níveis de glicose plasmática durante o teste oral de tolerância à insulina intraperitoneal em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.6. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os triglicerídeos hepático e colesterol hepático em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.7. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a pressão arterial sistólica em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.8. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.9. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a avaliação da esteatose no fígado de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica

Figura 4.10. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre as alterações da microcirculação hepáticas em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica

Figura 4.11. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o armazenamento de vitamina A (retinóide) em gotículas citoplásmicas de células estreladas hepáticas em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 4.12. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo através das análises de PCR em

tempo real dos níveis de transcritos de mRNA dos genes que codificam eNOS, IL-1beta e catalase no fígado de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

Lista de tabelas:

Tabela 1.1. Componentes da síndrome metabólica segundo: OMS e NCEP-ATP III.

Tabela 1.2. Fatores de risco associados à DHGNA.

Tabela 3.1. Sequência dos primers que foram utilizados no presente estudo.

Tabela 4.1. Parâmetros bioquímicos séricos em ratos alimentados com dieta controle (CTL), com dieta hiperlipídica (HFD) e com dieta hiperlipídica tratado com piridoxamina (HFD+PIR) por 28 semanas.

Sumário:

1. Introdução	1
1.1. Síndrome metabólica	1
1.1.1. Definições	1
1.1.2. Epidemiologia.....	2
1.1.3. Fisiopatologia	3
1.2. Doença Hepática Gordurosa não alcoólica (DHGNA)	9
1.2.1. Definição	9
1.2.2. Epidemiologia	12
1.2.3. Diagnóstico e tratamento.....	12
1.2.4. Fisiopatologia	13
1.3. Microcirculação e DHGNA	14
1.3.1. Função da microcirculação	14
1.3.2. Microcirculação hepática	16
1.3.3. DHGNA e microcirculação	19
1.4. Via AGE-RAGE	22
1.5. Piridoxamina	28
2. Objetivos	34
Objetivo Geral	34
Objetivos Específicos	34
3. Metodologia	35
4. Resultados	41
5. Discussão	52
6. Conclusões	59
7. Referências	60

1. Introdução

1.1. Síndrome Metabólica

1.1.1. Definições:

A síndrome metabólica (SMet) é definida como um conjunto de sinais e sintomas para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) e tornou-se um dos principais desafios de saúde pública em todo o mundo. Os pacientes com síndrome metabólica têm um risco três vezes maior de desenvolver DCV e cinco vezes maior de desenvolver DMT2 (2-5). A SMet é definida como a presença de três ou mais dentre as seguintes anormalidades endócrinas e bioquímicas: (a) Adiposidade visceral, (b) dislipidemia, (c) hipertensão arterial, (d) altos níveis de glicose plasmática e resistência à insulina (6-9). Destes, a resistência à insulina e obesidade são os principais fatores influenciadores no fenótipo da SMet (10).

Dois definições de SMet predominam na literatura: a do *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). É um requisito absoluto na definição da OMS ter resistência à insulina (com comprometimento da tolerância a glicose e glicemia em jejum, DMT2, ou outra evidências de resistência à insulina) e além da resistência à insulina ter mais dois dos cinco critérios (Ver tabela 1.1) (11). A definição do NCEP ATP III é o critério mais utilizados para definição da SMet e estipula que para o enquadramento na SMet o indivíduo precisa ter três dos cinco critérios descritos na Tabela 1.1 (5, 7). Ambas as definições irão prever a mortalidade cardiovascular, enquanto a definição do NCEP ATP III pode prever a mortalidade por todas as causas (12). No entanto, há um grande problema com as definições da OMS e do NCEP ATP III em relação a sua aplicabilidade aos diferentes grupos étnicos, especialmente ao tentar definir limites de obesidade. Tendo em vista essa problemática, em 2005 a Federação Internacional de Diabetes (IDF – do inglês *International Diabetes Foundation*) publicou novos critérios para a SMet, incluindo os mesmos critérios gerais que as outras definições, porém a obesidade como requisito absoluto e não a resistência à insulina como na OMS (13) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Componentes da síndrome metabólica segundo: OMS, NCEP-ATP III e IDF.

	OMS	NCEP ATP III	IDF
Absolutamente necessário	Resistência à insulina *(IGT, IFG, DMT2 ou outras evidências de RI)	Nenhum	Obesidade *[Perímetro da cintura \geq 94 cm (M) e \geq 80 cm (F)]
Critério	Resistência à insulina ou diabetes, mais dois dos cinco critérios abaixo	Quaisquer três dos cinco critérios abaixo	Obesidade e mais dois dos cinco critérios abaixo
Obesidade	Relação cintura/quadril: $> 0,90$ (M), $> 0,85$ (F); ou IMC > 30 kg/m ²	Circunferência da cintura: > 40 polegadas (M), > 35 polegadas (F)	Perímetro da cintura ≥ 94 cm (M) e ≥ 80 cm (F)
Hiperglicemia	Resistência à insulina já necessária	Glicose em jejum 100 mg/dl ou em terapia	Glicose em jejum 100 mg/dl ou em terapia
Dislipidemia	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl ou HDL-C: < 35 mg/dl (M), < 39 mg/dl (F)	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl ou em terapia	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl ou em terapia
Dislipidemia (segundo critério separado)		Colesterol HDL: < 40 mg/dl (M), < 50 mg/dl (F) ou em Terapia	Colesterol HDL: < 40 mg/dl (M), < 50 mg/dl (F) ou em Terapia
Hipertensão	$\geq 140 / 90$ mmHg	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou em terapia	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou em terapia

* IGT, intolerância à glicose; IFG, glicemia de jejum alterada; DMT2, Diabetes tipo 2; RI, resistência à insulina; IMC – índice de massa corporal, M, masculino e F, feminino.

Todas as definições estabelecidas de SMet reconhecem que são fatores de riscos para o desenvolvimento das condições fisiopatológicas metabólicas e cardiovasculares, e seu uso é de grande valor na avaliação clínica diária dos pacientes, identificando pacientes com maior risco de desenvolver tanto DCV quanto DMT2 (10).

1.1.2. Epidemiologia:

Segundo a IDF, um quarto da população mundial é afetada pela SMet (14). A prevalência mundial da SMet varia entre $< 10\%$ até 84% em relação a

população estudada e a definição de SMet utilizada (6, 15). Gorter P. (2004) relatou que a prevalência da SMet usando a definição da NCEP ATP III é de 41% em pacientes com doença arterial coronariana (DAC), 43% em pacientes com doença cerebrovascular, 58% em pacientes com doença arterial periférica e 47% em pacientes com aneurisma da aorta abdominal (16). Utilizando os critérios da OMS, a SMet está presente em 80% dos pacientes com DMT2 (17). Um estudo epidemiológico realizado no Brasil com 1369 adultos avaliou a prevalência de SMet de acordo com idade, sexo, nível socioeconômico, níveis educacionais, índice de massa corporal (IMC), índice de avaliação do modelo homeostático para resistência à insulina (HOMA-IR) e atividade física; e a prevalência estimada é de 22,7%, semelhante à dos países desenvolvidos (18).

1.1.3. Fisiopatologia:

A SMet é a consequência da interação entre fatores genéticos e ambientais que causa um estado de inflamação crônica de baixo grau (19). Destacaremos os mais importantes deles:

Adiposidade visceral: com a obesidade e o aumento progressivo no volume dos adipócitos, os suprimentos sanguíneos aos adipócitos podem ser reduzidos levando a hipóxia (20), essa hipóxia induz uma necrose e atrai infiltrado de macrófagos no tecido adiposo que resulta uma produção excessiva de adipocinas, glicerol, adiponectina, ácidos graxos livres [AGLs] e mediadores inflamatórios. Dentre esses mediadores podemos citar: fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6), inibidor de ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), resistina, leptina, angiotensina II e proteína C reativa (PRC) (21). Juntos esses fatores causam uma inflamação no tecido adiposo que propaga sistemicamente e leva ao desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade (22). A adiponectina é uma proteína com propriedades antiaterogênica secretada pelos adipócitos e cujos níveis plasmáticos estão diminuídos nos estados de resistência à insulina, obesidade e diabetes. A resistina é um biomarcador inflamatório putativo e mediador potencial de doenças metabólicas ligadas à obesidade. A

leptina é um hormônio supressor do apetite, que apresenta ações metabólicas sistêmicas (23-25). A secreção do angiotensinogênio pelo tecido adiposo pode contribuir para a hipertensão sistêmica e a secreção de PAI-1 pode promover um estado pró-trombótico (26). Sabe-se que a expressão de mRNA de angiotensinogênio está aumentada no tecido adiposo visceral, o que explica em parte a relação entre hipertensão arterial sistêmica e obesidade na SMet (27).

Resistência à insulina: A inflamação crônica junto com a obesidade visceral induz a resistência à insulina (28). Devido a inflamação crônica decorrente do aumento na produção de adipocitocinas e citocinas, há inibição na sinalização da insulina causando prejuízo na entrada de glicose mediada pela insulina nos tecidos alvos periféricos como o tecido adiposo, músculo e fígado, levando à hiperglicemia e DM2 (29). De acordo com essa condição, a célula beta pancreática secreta mais insulina (hiperinsulinemia) para superar a hiperglicemia. A hiperinsulinemia tenta compensar a resistência à insulina para a manutenção da normoglicemia, no entanto, causa uma superexpressão da atividade da insulina em alguns tecidos que são sensíveis. Essa ação da insulina aliada à resistência, resulta nas manifestações clínicas da SMet (30). A sinalização fisiológica da insulina ocorre através da ligação da insulina ao seu receptor, uma tirosina quinase ativada por ligante, que ativa duas vias paralelas: a via fosfotidilinositol 3-quinase (PI3K) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP). A via PI3K-Akt é afetada e a via da MAP quinase funciona normalmente nessa condição. A inibição da via PI3K-Akt leva a uma redução na produção de óxido nítrico endotelial (eNOS), provocando uma série de alterações no interior dos vasos que incluem a disfunção endotelial, proliferação celular e uma redução na translocação de GLUT4 (19). Além disso, a resistência à insulina promove (a) produção de PRC e PAI-1, (b) aumento de marcadores inflamatórios, (c) alteração do metabolismo dos glicocorticoides, (d) a ativação da via do sorbitol e (e) formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (12).

Dislipidemia: A resistência à insulina e a obesidade visceral estão associadas à dislipidemia aterogênica (31), que é caracterizada por anormalidades lipídicas que refletem na estrutura, metabolismo e atividade biológica de ambas as lipoproteínas aterogênicas e da lipoproteína antiaterogênicas, assim como dos triglicerídeos. Na SMet, são observadas elevações nos triglicérides plasmáticos e apolipoproteína B (apoB) e reduções nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (28). Já foi visto, que tanto a obesidade visceral quanto a inflamação crônica levam a resistência hepática à insulina, o que por sua vez altera o metabolismo lipoprotéico de várias maneiras (32). Primeiramente, com o prejuízo da sinalização de insulina, há um aumento da lipólise nos adipócitos, que conseqüentemente aumenta os níveis de ácidos graxos livres (13), que servem como substrato para síntese de triglicerídeos e diminuem o catabolismo da lipoproteínas contendo apoB. ApoB é a principal lipoproteína da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). VLDL é metabolizado em lipoproteínas remanescentes e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (subtipo pequeno e denso), e ambas aumentam as chances de formação de placa de ateroma (33). A dislipidemia está intimamente associada ao aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial, instalando a natureza pró-inflamatória da doença ateroscleróticas (34).

Disfunção endotelial: Macrófagos residentes e adipócitos que estão presente no tecido adiposo em conjunto com a hiperglicemia, dislipidemia e hiperinsulinemia na vasculatura e na microcirculação induzem uma disfunção endotelial e um estado pró-inflamatório na SMet (35). A disfunção endotelial é caracterizada por uma vasodilatação dependente de endotélio prejudicada, uma elastância arterial reduzida e um processo acelerado de aterosclerose (36). A deficiência de óxido nítrico (ON), um regulador chave da homeostase endotelial, é o principal defeito que liga a resistência à insulina e a disfunção endotelial (37). Essa deficiência resulta da diminuição da síntese e/ou liberação de ON e o consumo exagerado nos tecidos por altos níveis de espécies reativas

de oxigênio (7), causados por distúrbios celulares no metabolismo da glicose e lipídeos. Espécies reativas de oxigênio são moléculas de vida curta que exercem efeitos locais, atacando os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) iniciando a peroxidação lipídica dentro da célula, o que resulta na formação de subprodutos de aldeído, como *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA). Essas moléculas têm meia-vida mais longa que as EROs e têm o potencial de se difundir de seu local de origem para alcançar alvos intracelulares e extracelulares distantes, amplificando assim os efeitos do estresse oxidativo (38). E uma vez instalada a disfunção endotelial, há prejuízo da ação da insulina, por alterar a passagem transcapilar da insulina para os tecidos-alvo (19). A resistência à insulina leva à disfunção endotelial pela diminuição da atividade da Akt quinase, resultando em diminuição da fosforilação e atividade da eNOS. Como a fosforilação da eNOS é necessária para as ações hemodinâmicas da insulina, isso resulta em diminuição do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, criando um ciclo vicioso em que a disfunção endotelial piora a resistência à insulina. Além disso, outros processos fisiopatológicos causam uma incapacidade de o endotélio exercer seus mecanismos fisiológicos e protetores normais, dentre eles podemos citar a hiperglicemia, AGEs, AGLs, citocinas inflamatórias ou as adipocinas (39). Sabe-se que altos picos de glicose plasmática são capazes de ativar plaquetas, e glicose plasmática cronicamente elevada pode levar à formação de AGEs, que são funcionalmente ligados à disfunção endotelial (39). Os AGL podem ativar diretamente a via inflamatória do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) através do receptor do tipo Toll-4 (TLR4), estabelecendo uma cadeia de distúrbios endoteliais e eventos hemostáticos causados pelo aumento de EROs e moléculas de adesão vascular e celular incluindo molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) (40, 41). Além disso, a adiposidade visceral causa disfunção endotelial através dos efeitos da resistina, IL-6 e TNF-alfa na fosforilação da eNOS (10).

Hipertensão: é um fator complexo, multifatorial e mensurável, associada a diversas anormalidades metabólicas, das quais a obesidade, a resistência à insulina e a dislipidemia são as mais comuns (42). Estudos sugerem, que a hiperglicemia junto com a hiperinsulinemia, ativam o sistema Renina-angiotensina (SRA) que conseqüentemente aumentam a expressão do angiotensinogênio, da Angiotensina II (AT II) e o receptor AT1, que em conjunto podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão em pacientes com resistência à insulina (43). Além disso, a ativação do SRA aumenta a reabsorção de sódio nos rins, pela ativação do sistema nervoso simpático, aumenta o débito cardíaco e causa uma vasoconstrição nas artérias resultando em hipertensão (44).

Coagulação: A disfunção na coagulação, eleva o risco de doença arterial coronariana em indivíduos com SMet (45). Um estado pró-trombótico resulta de anomalias nos fatores pró-coagulantes com um aumento no fibrinogênio, fator VII e fator VIII, além de um aumento no fator antifibrinolítico (PAI-1), agregação plaquetárias e disfunção endotelial. A ativação de trombócitos pela produção de adipocinas (leptina e adiponectina) no tecido adiposo interfere diretamente na função plaquetária, assim como o aumento da massa no tecido adiposo induz resistência à insulina e inflamação sistêmica de baixo grau. Segundo Aso, Y. 2007, através da produção de PAI-1, o tecido adiposo altera diretamente a fibrinólise pelo inibidor de fibrinólise ativado pela trombina (46). Sendo assim, a disfunção do tecido adiposo desempenha um papel importante no estado pró-trombótico observado na obesidade, afetando direta e indiretamente a hemostasia, a coagulação e a fibrinólise (47). Na DMT2, pode ocorrer trombose, pela formação de coágulos através do aumento de níveis de fibrinogênio e PAI-1, as plaquetas que aderem ao endotélio vascular e se agregam mais facilmente pela perda de sensibilidade às restrições homeostáticas normais que são executadas pela prostaciclina e pelo ON. Essa desordem causada na DMT2 leva a eventos macro e microvasculares (48). O PAI-1 é um inibidor do ativador do plasminogênio tecidual e do ativador do plasminogênio tipo uroquinase através da sua função inibidora da protease serínica,

induzindo um estado pró-trombótico e sua expressão é controlada pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) (49) (Figura 1.1).

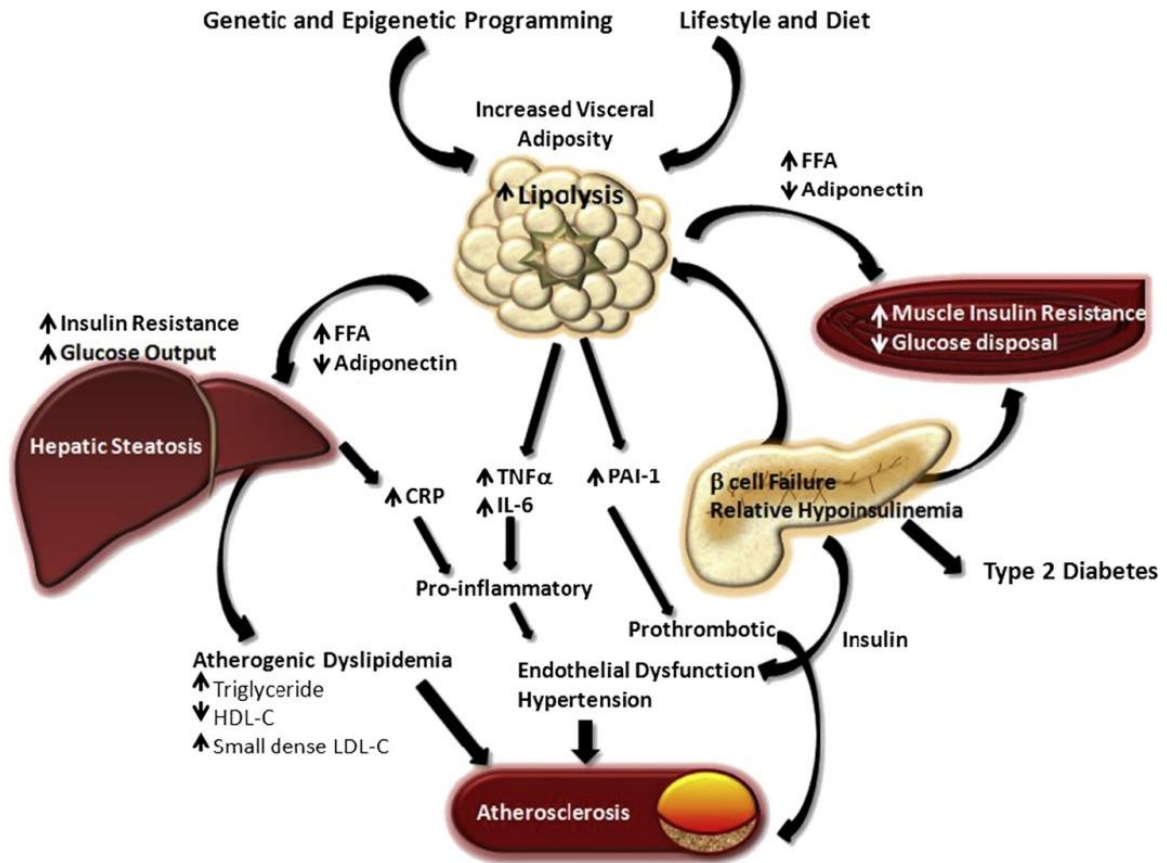


Figura 1.1: Mecanismos fisiopatológicos propostos para o agrupamento de características da síndrome metabólica e o aumento do risco de diabetes mellitus do tipo 2 e doença cardiovasculares. Com uma ingestão calórica extra e um estilo de vida sedentário, o excesso de energia é armazenado como gordura. O tecido adiposo visceral, comparada com o tecido adiposo subcutâneo, tem padrões distintos de expressão gênica e está associada a maior resistência à insulina, menor tamanho de partícula lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e aumento de LDL-C e números de partículas lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Em indivíduos suscetíveis, a incapacidade para a célula beta compensar a resistência à insulina resulta em relativa hipoinsulinemia, promovendo aumento da atividade da lipase sensível a hormônios e excesso de lipólise de triglicerídeos armazenados a partir de adipócitos, especialmente de depósitos de gordura abdominal, com liberação excessiva de ácidos graxos livres [FFA]. Na teoria da síndrome metabólica (SMet) prevê que os FFA derivados do tecido adiposo visceral sejam liberados na circulação portal e transportados para o fígado para serem armazenados como triglicérides. O fluxo de FFA estimula a produção hepática de VLDL, resultando em hipertrigliceridemia. O aumento do fluxo de FFA nos tecidos periféricos também inibe a sinalização da insulina. Com

resistência hepática à insulina e abundância de substratos de FFA, a gliconeogênese é aumentada, contribuindo para a hiperglicemia. A resistência à insulina também resulta na diminuição da liberação de glicose periféricamente. O desenvolvimento da hipertensão é provavelmente multifatorial, parcialmente mediada por disfunção endotelial causada pela geração de espécies reativas de oxigênio mediada por FFA, ativação do sistema nervoso simpático induzido pela hiperinsulinemia e inibição da óxido nítrico sintase e os efeitos das citocinas derivadas do tecido adiposo. Há também hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) na obesidade. Adipocinas são secretadas pelo tecido adiposo com efeitos metabólicos de longo alcance. Há também uma estreita relação com células derivadas da medula óssea, especificamente macrófagos, no tecido adiposo de indivíduos obesos, que provavelmente são responsáveis pelo aumento de citocinas, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). *PAI-1* - fator antifibrinolítico e *PRC* - proteína C reativa. Fonte: (50).

1.2. Doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA):

1.2.1. Definição:

A doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) é a doença hepática mais comum em todo mundo, é considerada o componente hepático da SMet e compreende várias condições patológicas variando de um aumento no conteúdo de triglicerídeos intra-hepáticos (esteatose simples) a esteato-hepatite não alcóolica (EHNA), que leva a fibrose avançada, cirrose e hepato carcinoma. (51-53). O quadro estabelecido é semelhante ao da lesão hepática induzida pelo álcool, porém ocorre em pacientes que não usam álcool e as suas implicações clínicas são pautadas principalmente de sua ocorrência comum na população em geral e seu potencial de progressão. (54). Sabe-se que além da esteatose, a EHNA coexiste com inflamação, lesão de células hepáticas e deposição de fibras de colágeno, podendo causar uma fibrose progressiva que pode evoluir para cirrose ou hepato carcinoma. (55, 56).

Tabela 1.2. Fatores de Risco Associados à DHGNA

Condições Comuns Com Associação Estabelecida	Outras condições associadas com a DHGNA
Obesidade	Hipotireoidismo
DMT2	Apneia obstrutiva do sono
Dislipidemia	Hipopituitarismo
Smet*	Hipogonadismo
Síndrome dos ovários policísticos	Ressecção pancreatoduodenal
	Psoríase

* De acordo com a NCEP ATPIII (2004). *DMT2 – diabetes mellitus do tipo 2 e Smet – síndrome metabólica.*

A DHGNA está intimamente associada a características da Smet, incluindo a obesidade e a resistência à insulina, doenças cardiovasculares e indiretamente a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e apneia obstrutiva do sono (AOS) (Tabela 1.2) (57). De acordo com os achados histopatológicos categoriza a DHGNA em fígado gorduroso não alcoólico (FGNA) e esteato hepatite não alcoólica (EHNA). FGNA é definido como a presença de esteatose hepática sem evidência de lesão hepatocelular na forma de balão dos hepatócitos e risco de progressão para cirrose e insuficiência hepática é mínimo. A EHNA é definida como a presença de esteatose hepática e inflamação com lesão de hepatócitos (balonismo) com ou sem fibrose podendo evoluir para cirrose, insuficiência hepática e raramente câncer de fígado. (58). A grande maioria dos indivíduos com obesidade, resistência à insulina e Smet terá esteatose, porém apenas uma minoria irá desenvolver EHNA, fibrose e cirrose. Dentre os fatores de risco para a progressão da DHGNA para quadros mais graves estão as questões genéticas e ambientais que influenciam a gravidade da esteatose, do estresse oxidativo, aumento de citocinas pró-inflamatórias, a magnitude da resposta imune e/ ou a gravidade da fibrose hepática (59). Estudo recente demonstrou que dietas ricas em gorduras saturadas, refrigerantes e carnes pobres em antioxidantes estão associadas a um risco aumentado de DHGNA/EHNA (60) (Figura 1.2).

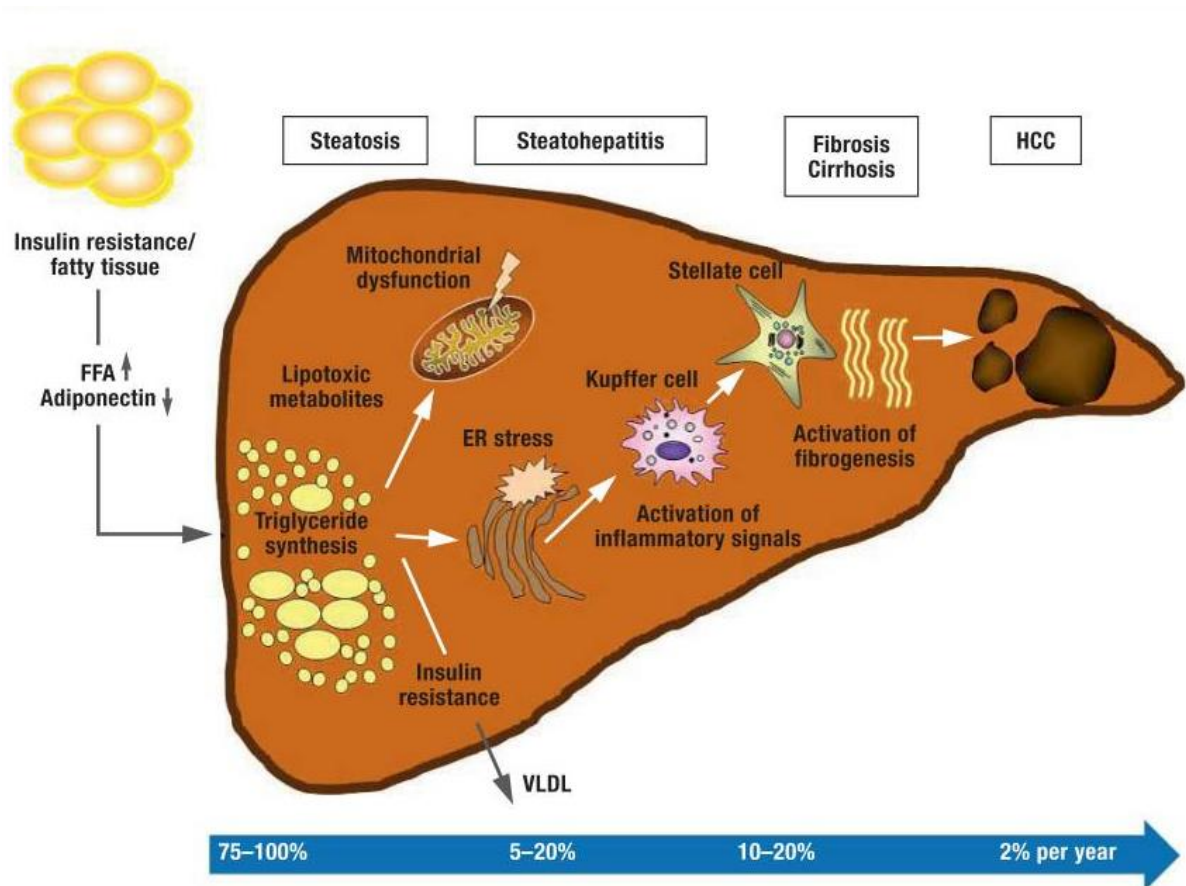


Figura 1.2: Patogênese e curso clínico natural da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A figura mostra as frequências dos estágios individuais da doença. Patogênese: uma parte importante na patogênese da DHGNA é desempenhada pela resistência à insulina, pelo estresse oxidativo e pela cascata inflamatória. De acordo com a teoria do “múltiplo hit”, a hiperinsulinemia no contexto da resistência à insulina leva, como primeiro passo, a uma liberação aumentada de ácidos graxos livres [FFA] de adipócitos e miócitos, que são então absorvidos pelo fígado, onde se acumulam e resultam em esteatose. Este passo inicial é então seguido por uma série de interações complexas entre hepatócitos, células de Kupffer, adipócitos, mediadores inflamatórios e radicais de oxigênio. O resultado é esteato-hepatite (EHNA). Os ácidos graxos livres são oxidados em mitocôndrias, peroxissomas e microsomas, o que leva a subprodutos reativos. A inflamação crônica contribui para a lesão hepatocelular e, ao longo prazo, para o desenvolvimento de fibrose e cirrose. Os mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina-1 beta (IL-1beta), bem como adiponectina (um hormônio dos adipócitos que reduz a oxidação dos ácidos graxos e inibe a gliconeogênese hepática) parecem ser de particular importância nesta configuração. O carcinoma hepatocelular (HCC) se desenvolve com uma incidência de cerca de 2% ao ano, e o câncer também pode se desenvolver em um fígado não cirrótico. ER – *Retículo endoplasmático* e VLDL - *Lipoproteína de partículas de apolipoproteína B*. Fonte: (61).

1.2.2. Epidemiologia:

A prevalência da DHGNA varia de 20 a 25%; no entanto, essas taxas mudam de acordo com os fatores ambientais, genéticos e hormonais. Já foi visto, que pacientes que apresentam DHGNA aumentaram a mortalidade geral em comparação com populações sem DHGNA (62, 63). A prevalência de DHGNA vem aumentando em escala mundial, não sendo apenas uma doença dos obesos, mas está tipicamente associada à disfunção metabólica (64). A maior prevalência de DHGNA foi relatada no Oriente Médio e América do Sul, enquanto a menor taxa foi relatada na África (53). De acordo com estimativas atuais, cerca de 68% dos adultos americanos estão obesos, o que significa dizer que 75 milhões de indivíduos nos Estados Unidos provavelmente têm DHGNA (65). Um estudo pediátrico avaliou a prevalência baseada na histologia do fígado, e relatou que a maior taxa de esteatose hepática (aproximadamente 38%) foi observada em crianças obesas (de 2 a 19 anos), e aumentou com a idade (66). Além disso, o sexo masculino tem sido considerado um fator de risco para a DHGNA e a prevalência nos homens é 2 vezes maior que nas mulheres (67-69). Tendo em vista toda problemática relacionada a DHGNA e SMet, um estudo de 2007 quantificou a quantidade de gordura no fígado em indivíduos com e sem a SMet e observou que a gordura hepática aumenta em média quatro vezes em indivíduos não diabéticos de meia idade com a presença de SMet, sendo assim os componentes da síndrome estão significativamente correlacionados com a gordura do fígado, mesmo independentemente da idade, sexo e IMC (18). Os pacientes com DHGNA que tem EHNA são mais propensos a evoluir para cirrose quando comparados com aqueles com esteatose apenas (70).

1.2.3. Diagnóstico e tratamento:

A maioria dos indivíduos é assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos como fadiga; no entanto, alguns relatam dor no quadrante superior direito. O diagnóstico da DHGNA muitas vezes é feito acidentalmente em exames de imagem quando um paciente é submetido a testes para um

sintoma ou condição não relacionado (71). O teste “padrão ouro” com o objetivo de detectar a DHGNA é a biópsia hepática, sendo que para estudos epidemiológicos na população saudável e/ou assintomática não é viável nem ético (56). Atualmente, os biomarcados séricos, como alanina aminotransferase (ATL) e aspartato aminotransferase (AST); e a ultrassonografia hepática e ressonância magnética, são as ferramentas mais utilizadas para o rastreamento da DHGNA (70). Até o momento, não há tratamento efetivo para a DHGNA. Uma abordagem multidisciplinar é empregada e direcionado principalmente para mudança no hábito de vida como perda de peso e atividade física (72-77).

1.2.4. Fisiopatologia:

Na fisiologia normal do hepatócito, a energia proveniente da circulação de glicose, frutose e galactose é armazenada na forma de glicogênio, e os lipídeos e carboidratos em excesso são redistribuídos para adipócitos ou usados na combustão. Na DHGNA, as teorias iniciais para a patogênese foram pautadas em uma hipótese de “dois hits”. O “primeiro hit”, é caracterizado pelo acúmulo de triglicérides hepáticos ou a esteatose que aumentam a suscetibilidade do fígado à lesão mediada pelo “segundo hit”, como citocinas/adipocinas inflamatórias, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, e produtos finais de glicação avançada, que por sua vez levam à EHNA (78, 79). Sabe-se que na DHGNA, há uma desregulação nos processos de tráfego lipídico, com um aumento de lipídeos intra-hepacelulares, como lipídeos saturados (80, 81). Esse armazenamento excessivo de lipídios nos hepatócitos, contribui diretamente para a falência de organelas, incluindo disfunção mitocondrial e retículo endoplasmático e outros estresses de organelas, e pode ter um papel na resistência à insulina hepática (82, 83). A resistência à insulina é o fator mais reprodutível no desenvolvimento da DHGNA e leva o acúmulo de gordura nos hepatócitos por dois mecanismos principais: lipólise e hiperinsulinemia (84). A resistência à insulina periférica é caracterizada pela redução da captação de glicose do sangue para o músculo esquelético e pela diminuição da supressão da lipólise no tecido adiposo. Por outro lado, resistência à insulina hepática está associada ao comprometimento da

glicogênese e ao aumento da gliconeogênese e glicogenólise (85, 86). Foi visto que, os altos níveis de ALT entre pacientes com DHGNA podem correlacionar-se com resistência à insulina e conteúdo de gordura intra-hepática; no entanto, pacientes com nível ALT normal apresentam risco considerável de progressão da doença (87). Além disso, no hepatócito quantidades clinicamente significativas de ácidos dicarboxílicos, que tem um potencial citotóxico, são formados a partir da ω -oxidação microsomal. Essa via do metabolismo dos ácidos graxos está intimamente relacionada à beta-oxidação mitocondrial e à beta-oxidação peroxisomal. A deficiência das enzimas da beta-oxidação peroxisomal tem sido reconhecida como uma importante causa de esteatose e esteato-hepatite microvesicular (54). No entanto, a principal teoria de “dois hits” tem sido questionada, dado o conhecimento da interação entre a resistência à insulina, as adipocinas, a inflamação do tecido adiposo e outros fatores patogênicos como os AGEs. Em particular, tem sido sugerido que a esteatose hepática representa um fenômeno de vários mecanismos lesivos distintos que devido a hábitos alimentares, fatores ambientais e genéticos, afetam o conteúdo de gordura dos hepatócitos e o ambiente inflamatório hepático, levando a um estado de inflamação hepática crônica. Por essa razão, a teoria inicial de “dois hits”, que explica a progressão da DHGNA para a EHNA, evoluiu para a hipótese dos “múltiplos hits” (88-90).

1.3. Microcirculação e a DHGNA:

1.3.1. Funções da microcirculação

A função mais representativa da microcirculação está relacionada ao transporte de nutrientes para os tecidos e a remoção dos produtos da excreção celular. As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada tecido, e as condições locais nos tecidos, por sua vez, controlam o diâmetro das arteríolas. As paredes dos capilares são delgadas, formadas por camada única de células endoteliais muito permeáveis. Desse modo, pode ocorrer intercâmbio rápido e fácil de água, nutrientes e excretas celulares entre os tecidos e o sangue circulante. Em geral, cada artéria nutriente que penetra em

um órgão se ramifica por seis e oito vezes dando origem as arteríolas que, têm diâmetros internos de apenas 10 a 15 micrômetros. As arteríolas, então, se ramificam de novo por mais duas a cinco vezes, atingindo diâmetros de 5 a 9 micrômetros em suas porções terminais, de onde suprem o sangue para os capilares. As vênulas e veias servem primariamente como canais coletores e vasos de armazenamento (91, 92) (Figura 1.3). Os capilares verdadeiros não têm músculo liso, sendo incapazes de constrição ativa; porém as células endoteliais que formam a parede capilar contêm actina e miosina que alteram sua forma em resposta a certos estímulos químicos (91).

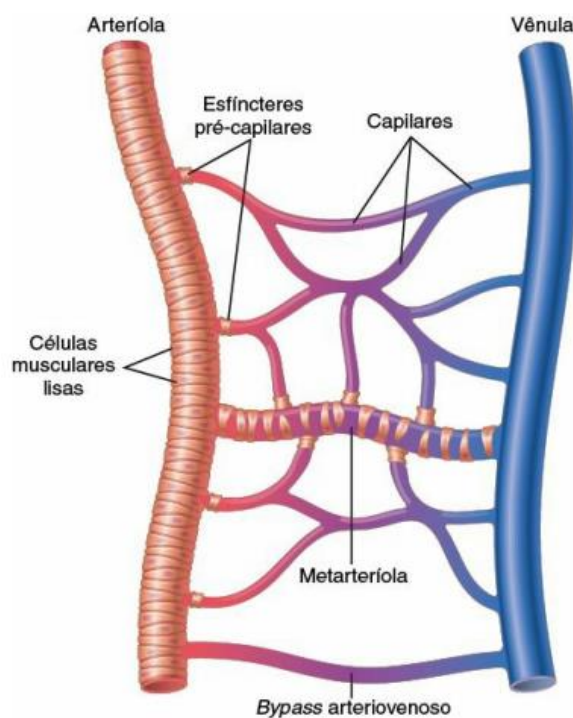


Figura 1.3: Estrutura da microcirculação, demonstrando a arteríola, metarteríolas, capilares e vênulas. Fonte: (92)

Dentre as funções da microcirculação, outra função importante é evitar grandes variações na pressão hidrostática ao nível dos capilares, que podem causar distúrbio nas trocas entre tecidos e capilares. Sendo assim, a microcirculação é de extrema importância na determinação da resistência periférica total (91, 93). Já foi visto que na hipertensão arterial ocorrem alterações microvasculares na resistência de vasos em quase todos os órgãos,

contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica, após a redução da densidade capilar (94, 95). Estudos demonstraram que alterações funcionais no comprometimento do recrutamento capilar e estruturais na rarefação capilar microcirculação, apresentam uma ligação fisiopatológica entre os componentes da SMet, incluindo obesidade, resistência à insulina e hipertensão (96-98). De acordo com isso, na última década nosso grupo demonstrou que ratos Wistar alimentados com uma dieta hiperlipídica (HFD – do inglês *high fat diet*) desenvolvem características da SMet (99-102). Nosso grupo demonstrou que animais alimentados com uma dieta HFD por 20 semanas apresentam alterações estruturais e funcionais na microcirculação cerebral, muscular, hepática e renal (99-103).

1.3.2. Microcirculação hepática:

A microcirculação hepática tem uma importância significativa para a fisiologia e função de todo o organismo, garantindo o fornecimento do tecido parenquimatoso com oxigênio e nutrientes. Além disso serve como uma porta de entrada de leucócitos na inflamação hepática e é responsável pela depuração de metabólitos tóxicos e corpos estranhos da corrente sanguínea. (104). O fígado constitui 2,5% do peso corporal e recebe aproximadamente 25% do débito cardíaco através de dois influxos, a veia porta e a artéria hepática. É organizado em unidades funcionais denominadas de lóbulos, que contém uma estrutura hexagonal com característica diferente de outros órgãos em relação a microcirculação sanguínea. (105). As placas de hepatócitos estão dispostas radialmente ao redor da veia central. Os ramos da veia porta e da artéria hepática estão localizados na periferia do lóbulo e formam, juntamente com o ducto biliar, a tríade portal. O sangue proveniente da veia porta e da artéria hepática circula no interior dos sinusóides que se infiltram entre os hepatócitos, antes de drenar para a veia central que estão posicionadas no centro dos lóbulos. (106). A veia porta é um vaso aferente que drena o sangue do sistema capilar do intestino, baço, pâncreas, omento e vesícula biliar e é responsável por 75% a 80% do suprimento sanguíneo do fígado em sua entrada total. Os restantes 20-25% são provenientes da artéria hepática (107,

108). Na circulação hepática a dupla perfusão tecidual é controlada por um mecanismo de compensação, na qual a

artéria hepática é capaz de mudar o aporte de sangue para o fígado de acordo com a resposta a alterações no fluxo na veia porta (mecanismo denominado de HABR, do inglês *Hepatic arterial buffer response*) (109, 110) (Figura 1.4).

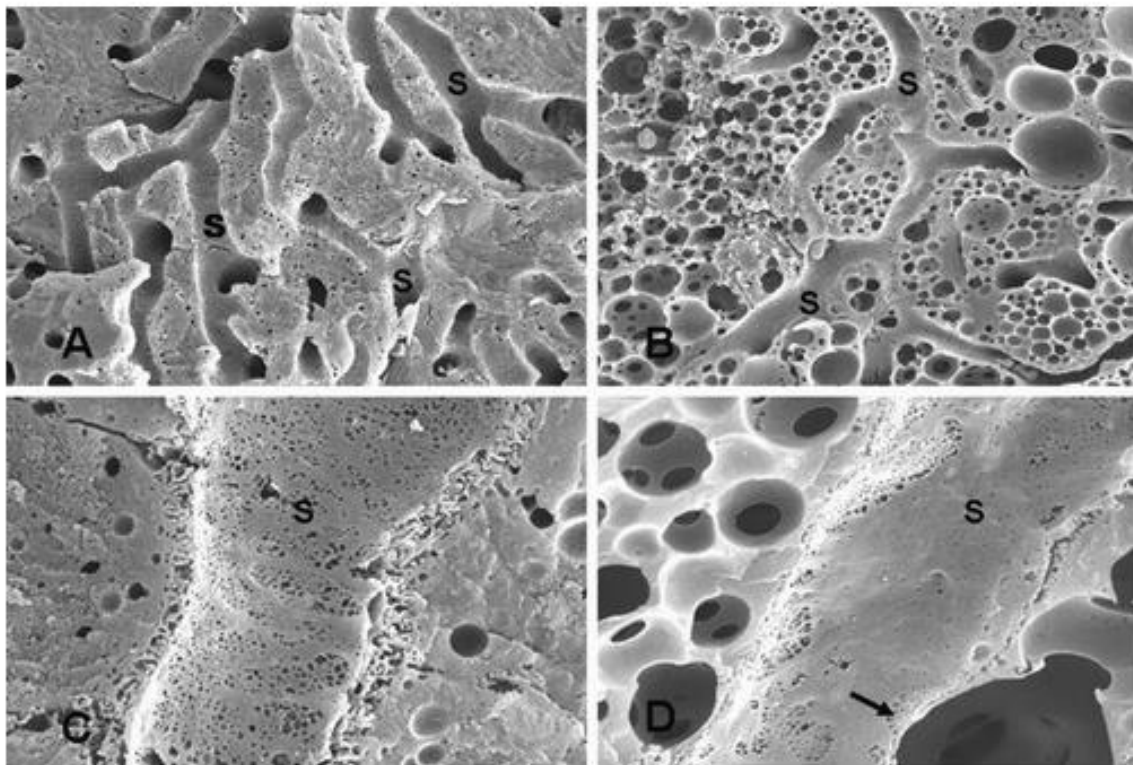


Figura 1.4: Microscopia eletrônica de varredura de fígados de camundongos magros alimentados com dieta normal (A, C) em comparação com camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em carboidratos e gordura (B, D) por 12 meses. Observe os sinusóides e seu padrão distorcidos pelas células parenquimatosas aumentadas, carregadas de gordura em A e B e a perda de fenestras em C e D. A seta em D aponta para a compressão da sinusóide causada por um hepatócito em balão contendo uma grande gotícula de gordura. A e B, 1.000x ampliação original; C e D, ampliação original de 8.000x. Fonte: (111)

Cinco componentes especializados principais podem ser destacados na rede sinusoidal microvascular hepática, que são: (a) as células hepáticas

sinusoidais endoteliais (LSEC – do inglês: *Liver sinusoidal endothelial cells*), que compõem a parede permeabilizada dos sinusóides e apresenta fenestras que são organizadas em aglomerados de 10 a 50 poros com um diâmetro de 150 a 175nm com ausência da membrana basal (112). Em resposta as alterações no fluxo sanguíneo sinusoidal e da pressão de perfusão, as fenestras se contraem e dilatam, por serem estruturas dinâmicas. Além disso, as fenestras funcionam como peneira para o controle da extensa troca de material entre o sangue e as células do fígado, contribuindo para o controle homeostático da microcirculação hepática e exercendo função de limpeza devido sua alta capacidade endocítica mediada por receptores (113); (b) as células estreladas hepáticas (HSC – do inglês: *hepatic stellate cells*), são células perisinusoidal armazenadora de gordura e vitamina A que estão localizadas no espaço de Disse, esse espaço está localizado entre as superfícies ricas em microvilosidades dos hepatócitos e as células de revestimento sinusoidais. Tem uma distribuição quase que homogeneamente pelas diferentes zonas do lóbulo hepático. (114). É responsável pelo metabolismo do retinol e pela fibrose hepática em condições patológicas (115); (c) as Células de Kupffer (CKs), constitui um componente celular dos sinusóides hepáticos estando ancorado ao lúmen do endotélio expondo-se a corrente sanguínea, com cinética específica de fagocitose, sendo o único macrófago residente no fígado responsável pela regulação da inflamação (116). São encontradas principalmente em regiões periportais, onde são maiores e com maior atividade fagocítica do que as localizadas na região perilobular (117, 118). As LSECs, HSCs e CKs são células contráteis, e estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo através dos sinusóides (115); (d) os hepatócitos são as células do parênquima que estão ligadas a LSECs e controlam o metabolismo do fígado e (e) a matriz extracelular (MEC), considerado um arcabouço composto de moléculas secretadas que serve de nicho para as células e pode influenciar seu fenótipo dependendo de sua composição.

A comunicação dinâmica entre esses cinco componentes da microcirculação hepática é responsável pelas principais funções do fígado, como desintoxicação e armazenamento de energia (119). Após a entrada do

sangue nos sinusóides pela veia porta e artéria hepática, o oxigênio e as macromoléculas atravessam a barreira endotelial através dos poros transcelulares das LSECs até os hepatócitos, as HSCs atuam juntamente com as LSECs regulando o tônus vascular com uma produção e liberação equilibrada de vasoconstritores como ciclooxigenases 1 (COX1) e tromboxano A₂ (TXA₂) e vasodiladores como ON (120, 121). O sistema reticuloendotelial (SRE) é composto pelas CKs e LSECs, pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear. Essas células (CKs) atuam como células apresentadoras de antígenos após uma lesão e liberam mediadores inflamatórios como, por exemplo, interleucina 10 (IL-10) e TGF-beta e citocinas como TNF- alfa e interferon gama (IFN-gama). (122)

1.3.3. DHGNA e microcirculação:

Na DHGNA, o acúmulo de gordura no citoplasma dos hepatócitos está associado ao aumento no volume celular que reduz o tamanho do espaço sinusóide hepático em 50% quando comparado com um fígado normal resultando em uma obstrução parcial ou completa do sinusóide hepático, causando importantes alterações no fluxo sanguíneo hepático. (102, 123). De acordo com humanos, vários modelos animais de esteatose hepática, demonstraram também a presença de anormalidades microvasculares em modelos DHGNA, caracterizada pela presença de perfusão sinusoidal reduzida e sinusóides disfuncionais (111, 124-130). Sun *et al.* mostraram que o fígado do rato Zucker obeso é esteatótico e apresenta uma microcirculação anormal manifestada por uma redução na densidade sinusoidal. (131). De acordo com isso, outras linhagens de ratos que receberam uma dieta rica em gordura desenvolveram esteatose de grau 3 (o qual já apresenta > 66% de esteatose de células do fígado) e os resultados microcirculatórios revelaram que a densidade sinusoidal foi afetada e o grau de esteatose correlaciona com a redução da velocidade do fluxo sanguíneo nas veias centrais, assim como nos sinusóides. (128). Acredita-se que o alargamento das placas parenquimatosas, estreita e distorce os lumens sinusóides, reduzindo o volume intra-sinusoidal, bem como a arquitetura da rede sinusoidal; como consequência à redução do suprimento de oxigênio aos hepatócitos. Essa redução na disponibilidade de oxigênio pode prejudicar a oxidação dos ácidos graxos, levando a um maior

acúmulo de gordura e exacerbação dos distúrbios induzidos pela gordura na perfusão sinusoidal, o que gera um ciclo vicioso de progressão da doença (132). Além disso, sob condições de hipóxia, pode alterar a via de fosforilação oxidativa e aumentar a produção de EROs. Assim uma alta quantidade de EROs é produzida, causando dano celular e peroxidação lipídica. Sabe-se também que a esteatose está associada a uma ativação aumentada de fatores de transcrição indutíveis por hipóxia, que estimulam o armazenamento de lipídios e inibem a degradação de lipídios (133-135). As vesículas extracelulares, são partículas revestidas de lipídios com um diâmetro de até 1000 nm, que são liberadas de diferentes tipos de células e demonstram ter papéis fisiopatológicos em muitas doenças. Durante as doenças metabólicas, o “*crosstalk*” do órgão pode ser responsável pela entrega de lipídios do tecido adiposo para o fígado ou de células não parenquimatosas do fígado para hepatócitos, sendo um fator determinante para a resposta hipóxica/esteatótica hepática (124). Burnley *et al.* demonstrou uma relação cruzada entre a ativação do fator induzível por hipóxia, a produção de ON e a modulação das vesículas extracelulares, tendo uma resposta importante na produção dessas vesículas extracelulares provenientes de células endoteliais e com tudo, podendo ser um marcador precoce da DHGNA. (136, 137).

Os hepatócitos, CKs e HSCs, na presença da esteatose, podem ser estimuladas para produzir citocinas e quimiocinas. A produção desses fatores pode ser aumentada através de vias intracelulares ou extracelulares, pela ativação de quinase I κ B e quinase N-terminal c-Jun ou receptores Toll-like, respectivamente, atuando de maneira autócrina ou parácrina promovendo a produção de EROs, a morte celular e o recrutamento de leucócitos da circulação. Figura 5 (138). O ON é uma molécula vasodilatadora essencial e está envolvido em vários processos que são benéficos à homeostase vascular, incluindo a redução da migração e do crescimento do músculo liso vascular, agregação plaquetária e trombose, adesão e inflamação de monócitos e macrófagos (139). O ON é derivado da eNOS e a sua deficiência é importante na etiologia da DHGNA. Distúrbios no metabolismo e biodisponibilidade do ON podem contribuir para a lesão tecidual na DHGNA assim como na obesidade e diabetes. (140). Ijaz *et al.* observaram uma diminuição da biodisponibilidade de

ON em fígados esteatóticos de ratos após a indução com uma dieta rica em colesterol por doze semanas e o metabolismo prejudicado do ON foi relacionado com um menor fluxo sanguíneo portal e a redução na microcirculação hepática (125). Além disso, a insulina é um dos principais fatores possivelmente envolvidos em anormalidades microvasculares e, especificamente, na prejudicada da eNOS observada na DHGNA (124). O recrutamento de leucócitos pode ser ocasionado por substâncias nocivas, como endotoxina, as quais aumentam a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1 nas LSECs que estimula a adesão e transmigração inflamatória de leucócitos (141, 142). As moléculas de adesão são biomarcadores de inflamação vascular e em combinação com as quimiocinas secretadas pelas CK estimulam o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o fígado. Os neutrófilos são fagócitos iniciais e ao chegar ao local alteram seu fenótipo e tornam-se ativados, liberando moléculas citotóxicas como EROs e citocinas que atraem mais neutrófilos e monócitos. Já os monócitos, após o recrutamento para o tecido, sofrem diferenciação para macrófagos teciduais, e liberam mais TNF-alfa, IL-1beta, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que por sua vez, prolongam e sustentam a inflamação local (143 , 144-148).

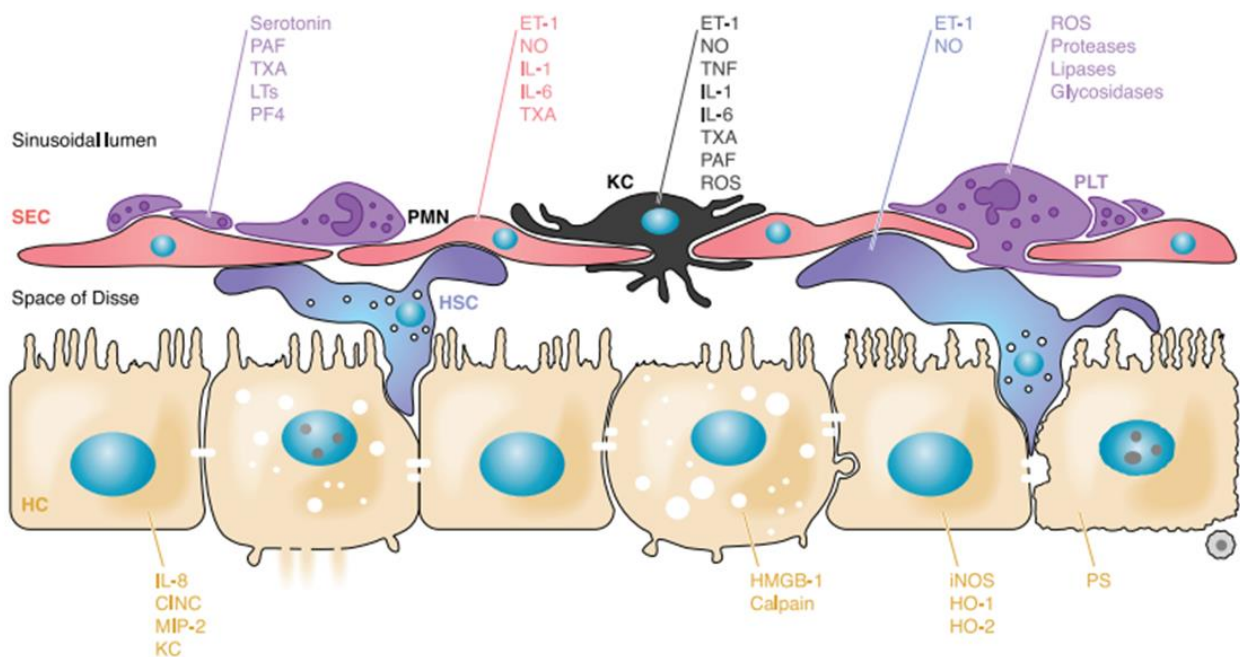


Figura 1.5: Mecanismos celulares da inflamação microvascular na lesão hepática. Estímulos prejudiciais e sinais de estresse causam uma ativação de células endoteliais sinusoidais [SEC], células de Kupffer (KC), leucócitos (PMN) e plaquetas (PLT) com liberação de um arsenal de mediadores agressivos, aumentando o acúmulo intra-hepático de células inflamatórias. O PMN, o PLT e o SEC podem interagir e se ligar uns aos outros, levando a uma maior aderência e acentuação da liberação de mediadores. A regulação positiva das moléculas de adesão permite a ligação firme dos PMN para migrar em direção a sinais quimiotáticos (IL-8, CINC, MIP-2 e KC), sendo liberados por hepatócitos intactos, mas expostos ao estresse. Os PMN infiltrantes de tecidos exercem hepatotoxicidade direta por espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de enzimas hidrolíticas. Os hepatócitos sofrem necrose, apoptose ou aponecrose mista, dependendo da gravidade do insulto e seus armazenamentos de ATP intracelular. Os hepatócitos apoptóticos e necróticos podem atrair ainda PMN tanto pela exposição superficial da fosfatidilserina (PS) quanto pelo vazamento do grupo de alta mobilidade box-1 (HMGB-1). PAF - fator de ativação de plaquetas, PF-4 – fator de plaqueta – 4, LTs – leucotrienos, TXA – Tramboxano A2, ET-1 Fator endotelina 1, NO – Oxido nítrico, IL-1 – Interleucina 1, IL-6 – Interleucina 6, TNF – fator de necrose tumoral, HSC – células estreladas hepática, -, IL-8 - Interleucina 8, iNOS – Oxido nítrico sintase indutível. HO 1 - heme oxigenase 1, HO 2 - heme oxigenase 2, CINC - quimioatraente de neutrófilos induzido por citocinas, MIP-2 - proteína inflamatória de macrófagos -2. Fonte: (104)

1.4. Via AGE-RAGE:

Os produtos finais de glicação avançada (do inglês *advanced glycation end products* - AGEs) modificam propriedades químicas e biológicas de várias moléculas através da ligação cruzada ou interagindo com proteínas de matriz e receptores especializados, como os receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (149-151) contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas como DM, aterosclerose, doença de Alzheimer, insuficiência renal, esteatose hepática e cirrose hepática (152-155). Os AGEs são produzidos endogenamente, mas também são consumidos através da dieta, especialmente através de alimentos cozidos a calor seco (156).

Na rota de produção de AGEs, a reação de Maillard também conhecida como glicação, é a mais descrita. A glicação começa com a formação de bases instáveis de Schiff geradas pela condensação do grupo carbonila de um açúcar redutor (glicose, frutose, galactose e ribose), intermediários do metabolismo da glicose (glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ribose- 5-fosfato, desoxirribose-5-fosfato e gliceraldeído), ou metabólitos do polioliol (frutose ou frutose-3-fosfato) e compostos dicarbonílicos provenientes da peroxidação lipídica (glioxal, MDA) com um grupo amina, originados, por exemplo, da amina lisina ácida (ou outros aminoácidos, ácidos nucleicos e lipídios) (150, 157). Após a formação, a base de Schiff sofre rearranjos que tornam essa estrutura mais estável, formando os produtos Amadori, que são produtos iniciais da reação de Maillard. Os produtos Amadori gerados possuem grupos carbonila reativos que se condensam com grupos amino primários, dando origem aos AGEs (Figura 6). Além disso, produtos de Amadori podem ser fragmentados por glicoxidação na presença de íons de metais de transição como o ferro, formando o glioxal e metilglioxal, que também são gerados durante peroxidação lipídica (155, 158).

Na DHGNA, os níveis aumentados de estresse oxidativos e a peroxidação lipídica estimulam a formação de AGEs, tais como carboximetil lisina (CML), que também é caracterizada como um produto de peroxidação lipídica (153).

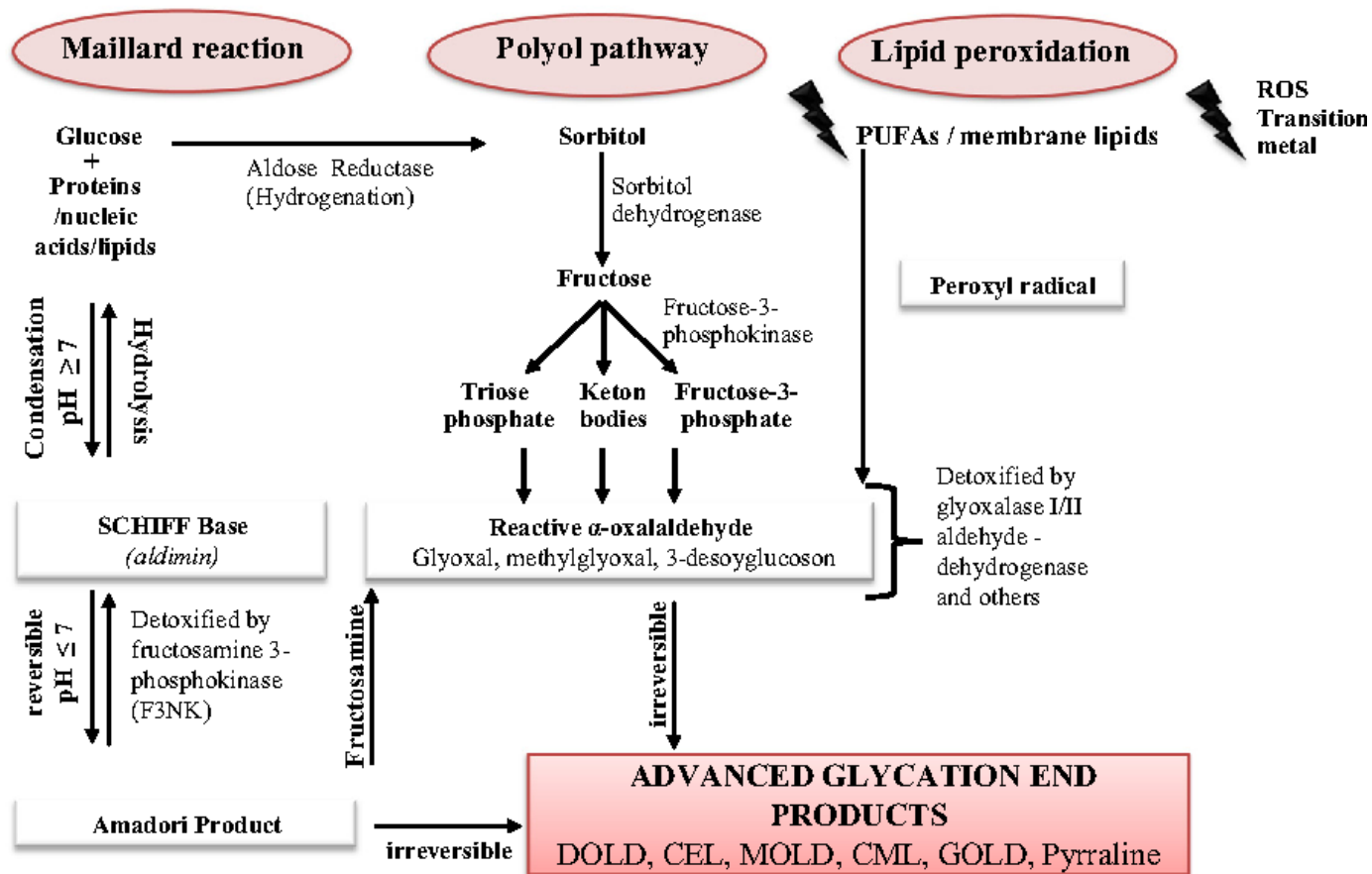


Figura 1.6: Principais etapas que levam à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). A formação endógena de produtos finais de glicação avançada foi descrita por três caminhos diferentes in vivo: a reação não enzimática de Maillard, a via do Poliol e a peroxidação lipídica. Durante as três reações, a formação de AGEs ocorre sobre a formação de compostos carbonílicos reativos, tais como glioal, metilglioal e 3-desoxiglicosona. Se a desintoxicação é prejudicada, eles são capazes de reagir ainda mais até a formação de AGEs irreversíveis. ROS – espécies reativas de oxigênio, GOLD - dímeros de lisina glioal, MOLD - dímeros de metilglioal lisina, DOLD - dímero de lisina 3-desoxiglicose, CEL- carboxietilalisina e CML- carboximetil lisina. Fonte: (159).

Os AGEs, além de alterar a estrutura e função de moléculas, exercem seu efeito através da ligação a receptores, ativando uma cascata intracelular que altera a expressão de diversos genes (Figura 1.7). Vários receptores já foram descritos para AGEs, dentre eles o AGE-R1 homólogo a um componente de k50 kDa do complexo oligossacariltransferase (OST-48) (160); AGE-R2 com homologia completa a uma proteína de 80 kDa, mostrou ser uma proteína

contendo fosfo-tirosina (161); AGE-R3 também chamada de Galectina-3, Mac-2, ou proteína de ligação a carboidrato-35, exibe ligação de alta afinidade para ligantes de AGEs (162); o receptor scavenger de macrófagos-II; CD-36 e RAGE. AGE-R1 e R3 são responsáveis pelo reconhecimento dos AGEs e pela ligação de alta afinidade; e AGE-R2 está sujeito a fosforilação induzida por AGE, desempenhando um papel importante na transdução de sinal e na ativação celular associada à ligação do receptor de AGE. RAGE é uma proteína de aproximadamente 45 kDa localizado no cromossomo 6 no complexo principal de histocompatibilidade entre os genes para as classes II e III, membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular e a sua expressão fisiológica é detectada numa variedade de tecidos incluindo células endoteliais, músculo liso vascular, células mononucleares do sangue periférico e macrófagos, tecido neural, pulmão e músculo esquelético (163). Ao contrário de alguns receptores que frequentemente realizam apenas a limpeza e depuração de AGEs dos tecidos e da circulação, RAGE media várias respostas celulares (164, 165).

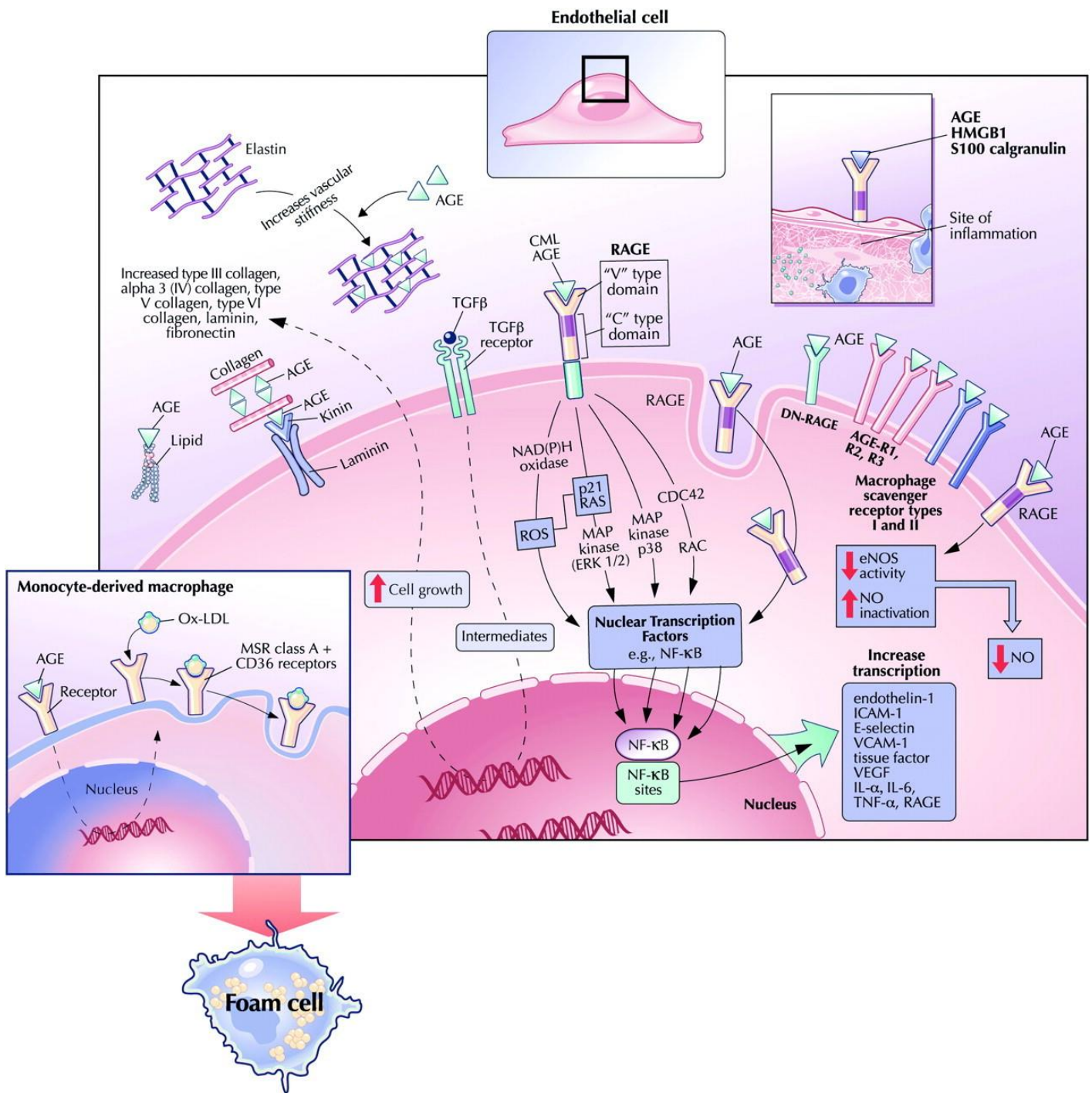


Figura 1.7: Os efeitos extracelulares e intracelulares dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Na matriz extracelular, os AGEs se formam em uma variedade de moléculas diferentes, incluindo lipídios, colágeno, laminina, elastina e vitronectina. A formação de AGEs em moléculas da matriz extracelular altera a constituição da matriz e aumenta a rigidez. Os AGEs também ativam o receptor do fator de crescimento transformador – beta (TGF-beta) que estimula o crescimento celular, levando ao aumento da produção da matriz extracelular. AGEs que se ligam a receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) na superfície da célula endotelial levam a uma cascata de sinalização, estimulando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e

aumentando espécies reativas de oxigênio (7), proteínas proto-oncogênicas p21 (p21 RAS) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Um alvo chave da sinalização RAGE é o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB). O NF-κB é translocado para o núcleo, onde aumenta a transcrição de várias proteínas, incluindo endotelina-1, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), E-selectina e fator tecidual. AGE e ligantes para RAGE, como as calgranulinas, proteína 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e S100, desencadeiam vias inflamatórias. O AGE pode diminuir a disponibilidade de óxido nítrico (ON) pela diminuição da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e pela inibição do ON. *VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular 1, CML - carboximetil lisina, ROS – espécies reativas de oxigênio, CDC-42 - proteína de controle da divisão celular 42, RAC - substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1, MSR class A - receptor de sequestrador de macrófagos classe A, CD36 - cluster de diferenciação 36, LDL - lipoproteína de baixa densidade, VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, TNF - fator de necrose tumoral alfa, IL-6 – interleucina 6, IL-alfa – interleucina alfa.* Fonte: (166).

Na DHGNA, os AGEs podem contribuir para as complicações da doença através da formação de ligações cruzadas entre moléculas como colágeno tipo1 e elastina causando um espessamento da matriz extracelular e rigidez da membrana (1, 167-169). Sua participação em eventos fisiopatológicos está ligada a capacidade de reconhecer vários ligantes, sendo uma das características funcionais dessa molécula disseminando a disfunção celular (163). Além disso, AGEs pode interagir com seu receptor RAGE nas superfícies das células alterando a função celular. O aumento da atividade celular, do estresse ou da inflamação induz o aumento da expressão de RAGE nas células afetadas, podendo atuar como um marcador de inflamação. (163) Como observado em estudos com humanos e ratos, para expressão de RAGE parece haver um padrão específico no fígado, com maior expressão em hepatócitos e HSC e pouco ou nenhum em CKs e LSECs (149) (figura 5). A ligação AGE/RAGE ativa uma cascata de sinalização intracelular com a regulação positiva NF-κB. Transduz sinais múltiplos como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e CDC42 resultando na ativação e translocação do NF-κB, que transcreve genes alvos. Entre os genes alvos podemos citar: endotelina-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, fator tecidual, trombosmodulina, fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1alfa, IL-6 e TNF-alfa (166).

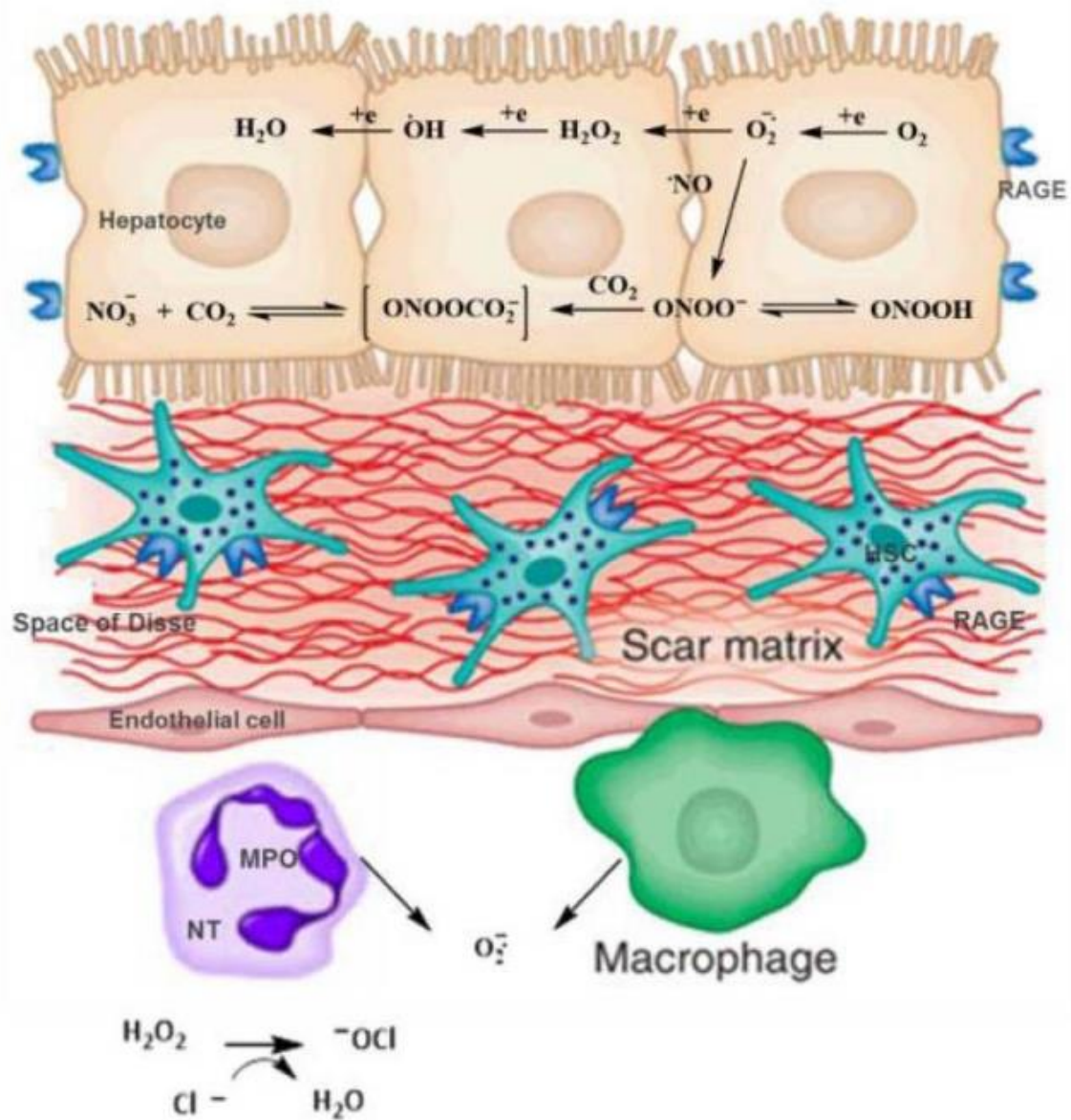


Figura 1.8: Estresse oxidativo e expressão de receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) no fígado. Formação de EROs por etapa de redução de um elétron de oxigênio (O_2). O_2^- é formado em grande parte através da respiração mitocondrial. Durante a dismutação espontânea do O_2^- , forma-se o peróxido de hidrogênio H_2O_2 . H_2O_2 também pode ser formado em peroxissomas. Se óxido nítrico (ON) estiver presente, O_2^- reagirá para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) e ácido peroxinitrito ($ONOOH$). O peroxinitrito pode então reagir com o dióxido de carbono para gerar as espécies de nitrificação a jusante. Nenhum líquido extracelular, como células de Kupffer e os neutrófilos são fontes de O_2^- e os neutrófilos liberam uma enzima para produzir hipoclorito de cálcio (OCl^-) a partir de peróxido de hidrogênio e cloreto. A presença de RAGE nos hepatócitos e HSCs aumenta o

estresse oxidativo hepático. *KC*, células de Kupffer; *NT*, neutrófilo; *HSC*, células estreladas hepáticas; *MPO*, mieloperoxidase. Fonte (124)

Nos hepatócitos e nas LSECs, a interação de AGE/RAGE leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio através da ativação NADPH oxidase, aumentando a proliferação e ativação celular. Essa progressão da fibrose hepática desempenha um papel fundamental na EHNA (150, 170). Nossos estudos anteriores demonstraram que ratos diabéticos induzidos com uma dieta HFD apresentaram importantes danos hepáticos e paralelo a isso apresentaram um aumento na deposição de AGEs no fígado (103). Gaens *et al.* avaliaram os níveis de AGEs e a expressão de RAGE no fígado de pacientes obesos e observaram um aumento significativo desses parâmetros e correlacionaram esse achado ao grau de esteatose hepática. Este estudo aponta que o acúmulo da AGEs é uma resposta inflamatória dependente de RAGE sobre o fígado esteatóticos indicando um papel importante na esteatose hepática e na patogênese da DHGNA (153). Por outro lado, já foi descrito que a interação AGEs/RAGE pode ter um efeito benéfico em relação às atividades e ao destino dos AGEs pois alguns receptores podem ajudar na remoção de AGEs da circulação e, assim, podem diminuir os efeitos pró-oxidantes dos AGEs. De acordo com a Yilmaz *et al.*, que analisou a relação entre os níveis plasmáticos de RAGE solúvel (sRAGE), resistência à insulina, parâmetros bioquímicos e histológicos, e estado pró-inflamatório de lesão hepática em uma coorte de pacientes com DHGNA, as concentrações de sRAGE são significativamente menores em pacientes com EHNA do que em indivíduos controle. Esses achados sugerem que concentrações menores de sRAGE estão associadas às formas mais graves de DHGNA (171). O sRAGE pode atuar como um receptor atrativo de AGEs e outros ligantes pró-inflamatórios, impedindo assim os AGEs de se ligar ao receptor RAGE (172, 173).

1.5. Piridoxamina:

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o aumento dos níveis de AGES no fígado e distúrbios microcirculatórios estão relacionados na lesão

hepática induzida por uma dieta HFD por 20 semanas e que o eixo AGE-RAGE, o estresse oxidativo e a inflamação podem desempenhar um papel importante nas alterações microcirculatórias hepáticas na DHGNA (102). A terapia para DHGNA continua a ser um desafio já que não existem terapias licenciadas para a doença. Portanto, novas abordagens farmacológicas são necessárias. Estudos experimentais em animais e culturas de células indicam que várias vitaminas e seus metabólitos participam de um grande número de processos fisiológicos como na produção de hormônios, antioxidantes, reguladores de crescimento e diferenciação de tecidos; diminuindo o risco associado a doenças crônicas e degenerativas (174). Recentemente, a piridoxamina [Pir], um análogo estrutural da vitamina B6, surgiu como promissor agente farmacológico para proteção contra danos teciduais progressivos que ocorrem na DM e outras doenças, como esquizofrenia, hiperlipidemia e doença renal crônica (175-180). A Pir foi identificada em 1944 no laboratório de Esmond Snell durante o estudo de ensaios microbiológicos para vitamina B₆, purificada a partir de tecidos animais, é uma das três formas naturais da vitamina B6 e sua estrutura é composta por um anel piridina, com hidroxila, metil, substituintes aminometil e hidroximetil (181). Em relação ao seu mecanismo de ação, já era descrito que a Pir possuía uma reatividade com os grupos carbonila em reações de transaminação e levou a hipótese de poderia formar um aduto com o intermediário Amadori, bloqueando a formação de AGEs (180). Diante disso, foi investigado o mecanismo de ação da Pir, através de um intermediário proteína-Amadori formado a partir de concentração fisiológica de glicose, e demonstraram que a Pir não interage diretamente com a porção carbonila do intermediário Amadori, mas interfere nas reações oxidativas pós-Amadori por meio da ligação de íons de metal redox catalítico e sequestra espécies de radicais livres por liberação do próton no íon fenolato (182) (Figura 1.9). A aminoguanidina, anteriormente, foi descrita como um dos principais candidatos à terapia anti-AGE, porém foi visto que a aminoguanidina pode inibir a oxidação catalisada por metais do ácido ascórbico, mas é completamente inativa como um inibidor de reações oxidativas pós-Amadori que levam a formação de AGEs (183, 184).

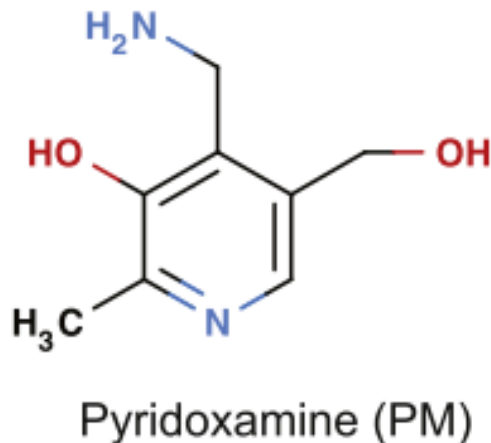


Figura 1.9: Representação da estrutura química da piridoxamina (PM). Modificado de Fonte: (185)

As espécies reativas de oxigênio estão implicadas na patogênese de diversas doenças com diabetes, aterosclerose, câncer e DHGNA (149, 150, 170, 186, 187), e a inibição da produção ou eliminação dessas espécies reativas de oxigênio podem ter efeito terapêutico significativo (182). A Pir atua potencialmente na captura de radicais de oxigênio através da capacidade de doação de átomos de hidrogênio de seu grupo fenólico, embora essa atividade de Pir possa ser fraca (180). Miyata *et al.* descreveu que a Pir reduziu o radical hidroxila gerado pela reação de Fenton, em um estudo *in vitro* (188). Em concordância, Daumer *et al.* demonstraram que a Pir também pode reagir com o ácido hipocloroso, uma espécie altamente reativa produzidos por neutrófilos e monócitos ativados nos locais da inflamação (189). Tendo em vista que as reações oxidativas pós-Amadori geram EROs, inibição dessas reações pelo Pir também pode diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (190). Além disso, o tratamento com Pir resultou em níveis significativamente mais baixos de glicolato na urina e excreção de oxalato em comparação com animais não tratados, acompanhado por uma redução significativa na formação de cristais de oxalato de cálcio nas áreas papilar e medular do rim (191). O oxalato é um produto do metabolismo de aminoácidos que é excretado na urina. Por sua baixa solubilidade, há um aumento na concentração urinária provendo sua cristalização, que leva à formação de cálculos renais (192). Oxalato é sintetizado enzimaticamente, principalmente no fígado, na via do glioxilato e

dois intermediários da biossíntese de oxalato, o glicolaldeído e glioxilato, são compostos de carbonila (193).

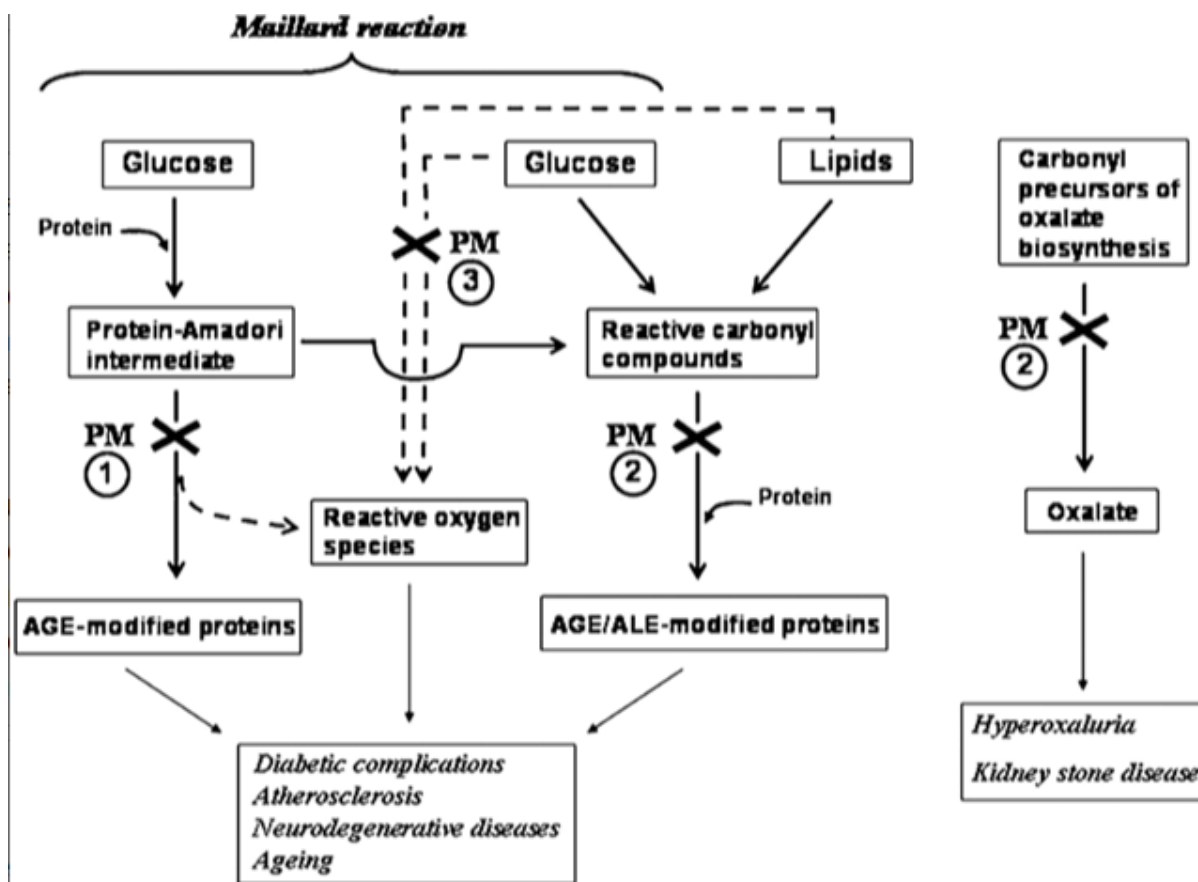


Figura 1.10: Mecanismos propostos de ação farmacológica de Piridoxamina. Em condições patogênicas caracterizadas por níveis elevados de glicose ou pelo aumento de compostos carbonílicos tóxicos, precursores carbonílicos metabólicos ou espécies reativas de oxigênio (ROS), a piridoxamina (PM) tem potencial terapêutico. Os números indicam diferentes mecanismos de ação do MP: **(1)** inibição dos passos oxidativos pós-Amadori da reação de Maillard por meio da ligação de íons metálicos redox catalíticos; **(2)** eliminação de compostos carbonílicos derivados da degradação de glicose e lipídios ou da biossíntese de oxalato; e **(3)** eliminação de ROS. Linhas tracejadas indicam caminhos da geração de ROS. AGEs – produtos finais de glicação avançada, ALEs – produtos finais de lipoxidação avançada. Fonte (190)

Levando em conta que a DHGNA é manifestação hepática da SMet, que a via AGE/RAGE está implicada nas alterações hepáticas presente na DHGNA, causando danos microvasculares e a Pir é um inibidor da formação de AGEs, no presente estudo, investigamos a hipótese de que a inibição da formação de

AGEs usando Pir exerceria efeitos protetores sobre distúrbios microcirculatórios associados à DHGNA.

2. Objetivo:

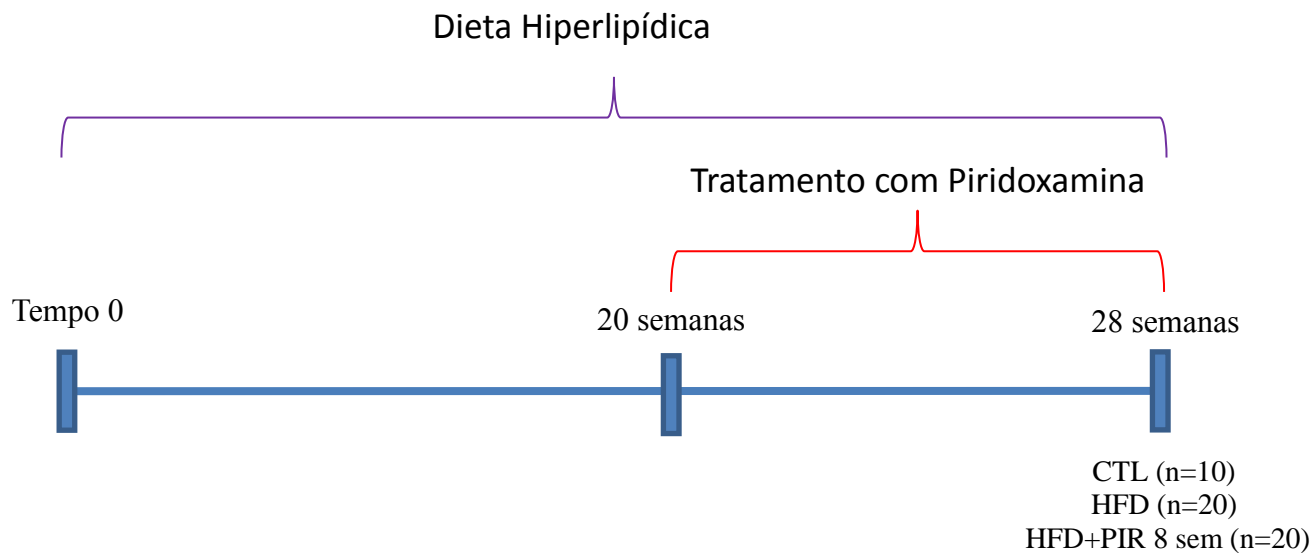
Geral: Avaliar se os níveis de AGEs estão relacionados com o grau de esteatose e disfunção endotelial microvascular em animais com síndrome metabólica e se estes parâmetros são modulados pelo inibidor da formação de AGEs, piridoxamina.

Específicos: Avaliar entre os grupos controle (CTL), síndrome metabólica (HFD) e síndrome metabólica tratado com piridoxamina (HFD+PIR) os seguintes parâmetros:

1. Parâmetro metabólicos como peso corporal, grau de adiposidade visceral e glicemia em jejum;
2. Parâmetros da homeostase glicêmica como tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina;
3. Níveis de AGEs no fígado através de espectroscopia de fluorescência;
4. Marcadores bioquímicos séricos de função hepática
5. Colesterol e Triglicerídeo hepático;
6. Gravidade da esteatose hepática através de histopatologia;
7. Expressão gênica de marcadores de inflamação no tecido hepático através de RT-PCR;
8. Estresse oxidativo no tecido hepático através de análise de peroxidação lipídica por TBARS;
9. Parâmetros microcirculatórios hepáticos: fluxo microvascular basal e em resposta ao vasodilator acetilcolina, número de capilares perfundidos, rolamento e adesão de leucócitos em vênulas pós-sinusoidais.

3. Metodologia:

3.1. Animais e protocolo experimental: Ratos Wistar (n=50) do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz foram usados no estudo. Os ratos (6 semanas, com 120 g) foram mantidos em gaiolas padrão com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e com ciclos de luz/escuro de 12h (início do escuro às 18h). O modelo experimental de DHGNA/SMet foi induzido em 40 animais por 28 semanas de alimentação com dieta hiperlipídica, como previamente descrito pelo nosso grupo (100). A dieta hipercalórica consistiu de ração comum modificada para conter 30% de gordura, 56% carboidrato e 14% proteína (%kcal). A principal fonte de gordura da dieta rica em gordura foi a gordura saturada (banha). Os animais de controle não-SMet (CTL) receberam uma dieta padrão para ratos (n = 10) durante 28 semanas. Os animais DHGNA foram subdivididos em dois grupos: animais não tratados, que receberam o veículo entre 20 a 28 semanas (HFD, n = 20), e animais tratados que além da HFD também receberam piridoxamina (60 mg/kg/dia) entre semanas 20-28 (HFD + Pir, n = 20)(Esquema 1)(194) . Tecidos e amostras foram coletados e as análises foram realizadas no final do protocolo experimental. Após avaliação por microscopia intravital e imagem com contraste de laser speckle, os animais sob anestesia (quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) foram sujeitos a punção cardíaca para colheita de sangue total. Fígado, sangue e tecido adiposo foram coletados após a eutanásia dos animais. Depósitos de tecido adiposo abdominal e epididimal foram dissecados e pesados e o somatório dos dois compartimentos foi expresso no gráfico como tecido adiposo visceral. O soro foi separado por centrifugação a 700xG durante 15 min a 4°C e as alíquotas de soro foram armazenadas a -80°C para as análises posteriores. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios internacionalmente aceitos para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da Fundação Oswaldo Cruz (Licença L-019/2016).



Esquema 1: Desenho experimental do presente projeto.

3.2. Avaliação da pressão: Foi realizada através de medida da pressão arterial não invasiva na cauda dos animais por técnica de fotopletismografia com aquisição automática de dados (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, EUA).



Figura 3.1: Sistema para registro indireto da pressão arterial caudal em ratos.

3.3. Medição glicemia de jejum: Alíquotas de sangue foram coletadas da ponta da cauda dos animais em jejum de 12 horas para análise dos níveis de glicose no sangue utilizando um glicômetro (One Touch Ultra2, Buenos Aires Argentina e Johnson Medical SA)(Mikus *et al.*, 2010).

3.4. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e resposta à insulina: Foram realizados na semana anterior ao ensaio terminal com espaço de dois dias entre um teste e outro. Para o TOTG após 12 horas de jejum foi administrada glicose por via oral na dose de 2g/Kg para todos os animais. As medições de glicose foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após administração oral da glicose usando um monitor automático de glicose.(One Touch Ultra2, Johnson & Johnson Medical S.A., Buenos Aires, Argentina) . Para avaliação da resposta hepática a insulina animais em 6h de jejum foram administrados com insulina na dose de 1U/Kg via i.p. para todos os animais e a glicemia foi avaliada nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após a injeção de insulina usando um monitor automático de glicose (One Touch Ultra2, Johnson & Johnson Medical S.A., Buenos Aires, Argentina).

3.5. Histopatologia: Os fígados foram fixados em solução de formalina tamponada com fosfato Millonig a pH 7,2, embebidos em parafina e processados para microscopia de luz com ,coloração com hematoxilina e eosina (HE). A gravidade da esteatose foi determinada pela percentagem de hepatócitos esteatóticos e foi analisada por um patologista especializado através de um estudo cego e classificada como esteatose leve, moderada ou grave. A infiltração de polimorfonucleares foi avaliada em cortes corados pela HE, com base na localização das células e na morfologia dos núcleos das células. O conteúdo de colágeno no fígado foi quantificado histologicamente usando coloração com picrosirius red. Quatro cortes histológicos de quatro animais por grupo foram analisados.

3.6. Níveis de AGEs no fígado através de fluorescência: As concentrações hepáticas de AGEs fluorescentes foram determinadas pelo método de Nakayama. (195). Resumidamente, a fluorescência das amostras de AGEs foi medida num comprimento de onda de emissão de 440 nm e um comprimento de onda de excitação de 370 nm contra um branco de solução

NaOH 0,1N num Leitor de Microplacas SpectraMax M5 ELISA (Molecular Devices, CA, EUA) (1). Uma preparação de albumina de soro bovino (BSA) nativa (1mg/ml de NaOH 0,1N) foi usada como referência e a sua intensidade de fluorescência foi definida como uma unidade de fluorescência. Os valores de fluorescência das amostras foram medidos a uma concentração de proteína de 1 mg/mL e foram expressos em unidades arbitrárias (AU) em comparação com a preparação de BSA nativa.

3.7. Marcadores bioquímicos: Os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, bilirrubina total e as atividades das enzimas ALT, AST e os níveis hepáticos de colesterol e triglicerídeos foram medidas utilizando kit comerciais (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, EUA) e analisados por espectrofotometria no sistema Cobas c (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, EUA). Para determinação de colesterol e triglicerídeos hepáticos, foi realizada a extração lipídica com 50mg de tecido hepático homogeneizado em 1mL de isopropanol e centrifugado a 2000xG por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado e analisado.

3.8. RT-PCR: O RNA total foi isolado do lobo médio do fígado dos animais utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit high capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems) a partir de 1 µg de RNA, em um volume final de 20 µl. Os primers para a amplificação dos produtos estão descritos na tabela 3. A RT-PCR foi realizada com o power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as indicações do fabricante e foram realizadas na plataforma do 7500 fast (Applied Biosystems). A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada através do método de $\Delta\Delta C_t$ e normalizada pela expressão de beta-actina.

Tabela 3.3. Sequência dos primers que foram utilizados no presente estudo.

Alvo	Sequência	
IL-1beta	F: 5'-GGCTTCCTTGTGCAAGTGT-3'	R: 5'-CGAGATGCTGCTGTGAGATT-3'
eNOS	F: 5'-GCACCCTTCCGGGGATTCT-3'	R: 5'-GGATCCCTGAAAAGGCGGT-3'
Catalase	F: 5' -ACTCAGGTGCGGACATTC-3'	R: 5'-GGAGTTGTACTGGTCCAGAAGAGC-3'
beta-actina	F: 5'-CCACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'	R: 5'-GAAGCCGGCCTTGACATGCC-3'

F: Forward e R: Reverse

3.9. Estresse oxidativo no tecido hepático. O estresse oxidativo no fígado foi avaliado utilizando a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O tecido foi homogenizado em tampão fosfato salino (PBS) gelado (pH 7.4) em hidroxitolueno butilado (BHT) (concentração final 0,2%). As amostras (0,5 mL) foram misturadas com o mesmo volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e aquecidas a 96°C, por 30 min. As amostras foram lidas a 535 nm no leitor SpectraMax Plus (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em níveis de malondialdeído (MDA, $\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

3.10. Parâmetros microcirculatórios: fluxo microvascular, número de capilares perfundidos e rolamento e adesão de leucócitos: (a) *Microscopia intravital*: Para microscopia intravital do fígado (196, 197), os animais em jejum overnight foram anestesiados via injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Uma linha média e uma incisão subcostal esquerda foram feitas para exteriorizar o fígado. Os ligamentos hepáticos foram dissecados e os intestinos foram cobertos com uma gaze embebida em soro fisiológico para minimizar a desidratação do tecido. O lobo esquerdo do fígado foi então exteriorizado e colocado em um disco de vidro e coberto com uma lâmina de vidro para análise da microcirculação. Com o uso de uma objetiva 10X ocular e 10X (Olympus BX150WI; Center Valley, PA, EUA), as imagens foram exibidas em um monitor de televisão e gravadas com um gravador de vídeo digital (DP73; Olympus, MA, EUA) para posterior análise off-line com o software Cellsens standard 1.9 (Olympus, MA, EUA). A interação leucócito-endotelial foi avaliada pela contagem do número de leucócitos marcados (0,3 mg/kg de rodamina 6G, i.v.), rodando ou aderindo a sinusóides e vénulas pós-sinusoidais. Os leucócitos em rolamento foram definidos como glóbulos brancos com uma velocidade mais lenta do que os eritrócitos e um movimento de rotação detectável. Os leucócitos que permaneceram estacionários no endotélio sinusoidal ou venular por 30s ou mais foram considerados células aderentes. Os números de células estreladas hepáticas

positivas de vitamina A (HSCs) foram quantificados com base na fluorescência endógena de vitamina A, utilizando um sistema de filtro UV (198). O número de HSCs positivas para vitamina A, e os leucócitos rolantes e aderentes foram contados em uma área de $170 \mu\text{m}^2$ compreendendo sinusóides e vênulas pós-sinusoidais; (b) *Fluorimetria por Laser Speckle*: O fluxo sanguíneo microvascular hepático foi medido por meio de imagens de contraste com laser speckle (LSCI) (Pericam PSI system, Perimed, Suécia), que fornece um índice de perfusão microcirculatório proporcional à concentração e velocidade média dos eritrócitos usados para avaliar o sangue microvascular fluxo em tempo real (199, 200). O procedimento cirúrgico realizado foi o mesmo da microscopia intravital descrita acima. Os animais foram mantidos em uma superfície estável, em sala com temperatura constante de 25°C , e colocados sob um sistema de luz laser com comprimento de onda de contraste de imagem de 785 nm para mensuração contínua da perfusão do tecido sanguíneo. A distância entre a base de varredura e a superfície do fígado foi de aproximadamente 10 cm. O fluxo sanguíneo hepático relativo dos animais foi expresso em unidades arbitrárias de perfusão (APUs).

3.11. Análises estatísticas: Os resultados foram expressos em médias \pm desvio padrão (DP) para cada grupo. A distribuição normal foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e as comparações entre os grupos foram feitas utilizando o ANOVA one way. Posteriormente foi utilizado o teste de comparação par a par post hoc, seguido da correção de Bonferroni para comparações múltiplas, identificando qual grupo difere dos demais. (GraphPad InStat 5.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados:

Os ratos foram alimentados com a ração padrão (CTL) ou com uma dieta hiperlipídica (HFD) por 28 semanas, após as 20 semanas um grupo (n=10) de ratos com a dieta hiperlipídica foi tratado com a piridoxamina (60mg/kg/dia) por 8 semanas. Primeiramente, confirmamos que o tratamento com piridoxamina foi capaz de diminuir o teor de AGE no fígado de ratos alimentado com a dieta HFD. (Fig. 4.1).

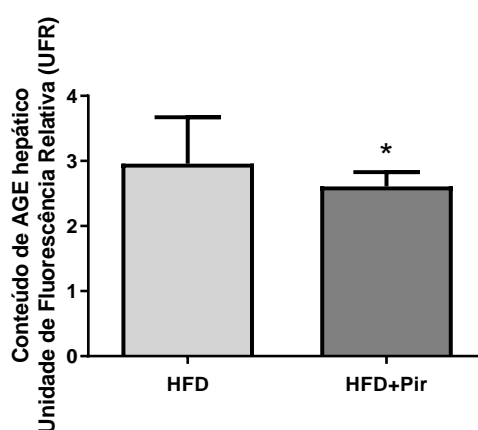


Figura 4.1. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o conteúdo de AGE fluorescente hepático em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. * P <0,05 vs. HFD

No final do tratamento os ratos HFD apresentaram um aumento significativo do peso corporal quando comparado ao CTL e o tratamento com a piridoxamina diminuiu o ganho de peso nos animais com dieta hipercalórica (Figura 4.2).

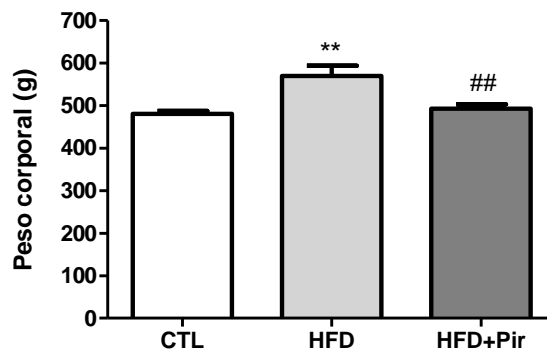


Figura 4.2. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o peso corporal em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. ** $P < 0,01$ vs. CTL. ## $P < 0,01$ vs. HFD.

A dieta hiperlipídica induziu um aumento significativo tanto no depósito de tecido adiposo epididimal quanto de tecido adiposo abdominal quando comparado ao grupo CTL, e o tratamento foi capaz de promover uma redução significativa dos depósitos de gordura epididimal e abdominal quando comparado ao grupo HFD (Figura 4.3A e 4.3B). E o mesmo se reproduz quando somado o tecido adiposo epididimal e o tecido adiposo abdominal (Figura 4.3C).

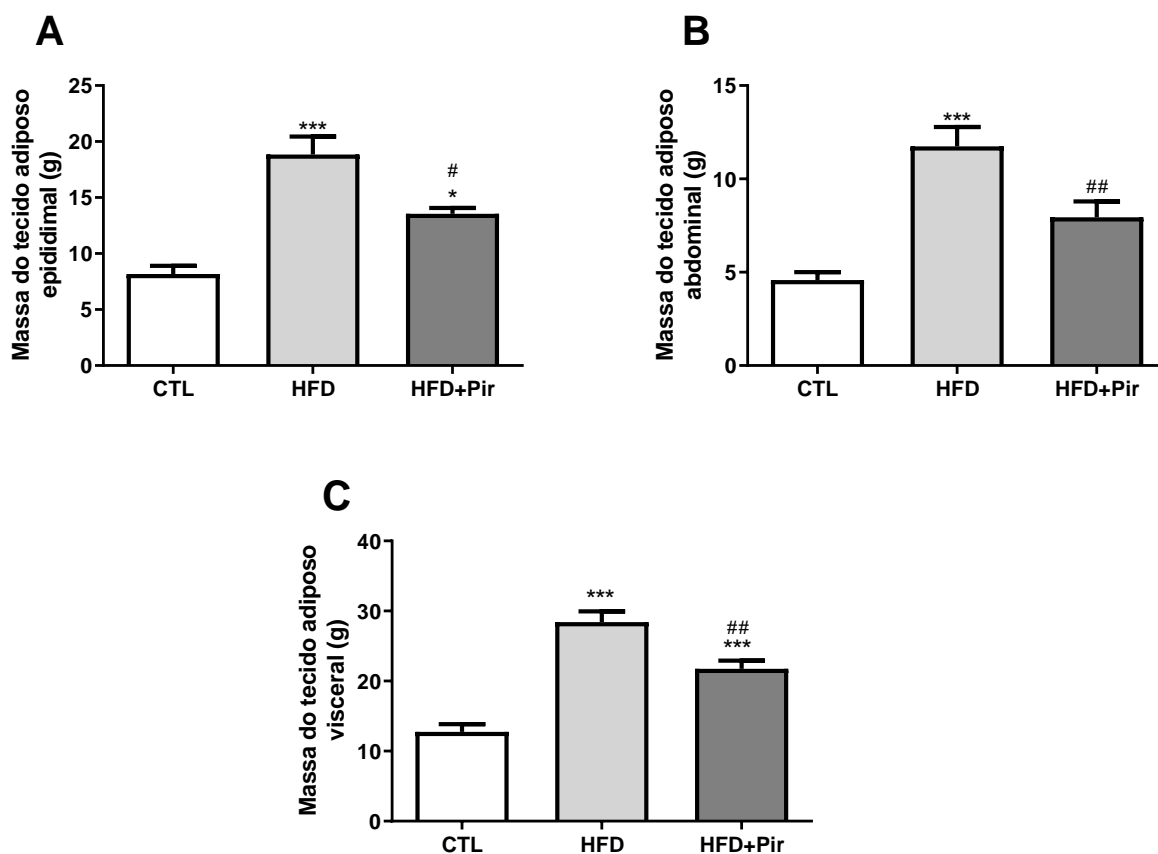


Figura 4.3. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a massa do tecido adiposo epididimal, abdominal e visceral em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. * $P < 0,05$ vs. CTL. *** $P < 0,001$ vs. CTL. # $P < 0,05$ vs. HFD. ## $P < 0,01$ vs. HFD.

Além disso, a dieta hiperlipídica provocou prejuízos no metabolismo da glicose, como demonstrado pelos maiores níveis de glicose no sangue em jejum quando comparado com ratos de dieta padrão e o tratamento com a piridoxamina foi capaz de reverter esse parâmetro (Figura 4.4B). Pode-se observar um maior pico de glicose e um atraso ao retorno à linha de base após o desafio de uma sobrecarga de glicose nos animais HFD em relação ao CTL (Figura 4.4 A). O tratamento com piridoxamina apresenta uma redução significativa destas alterações (Figura 4.4A), assim como uma redução da glicemia de jejum (Figura 4.4B)

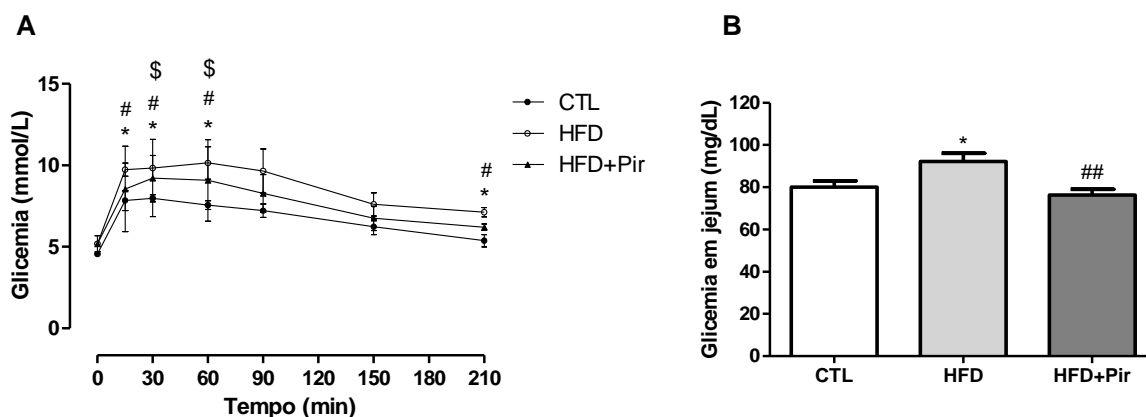


Figura 4.4. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os níveis de glicose plasmática durante o teste oral de tolerância à glicose e a glicemia de jejum em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. * $P < 0,05$ vs. CTL. # $P < 0,05$ vs. HFD. ## $P < 0,01$ vs. HFD. § $P < 0,05$ HFD+Pir vs. CTL.

Não houve diferença significativa no teste de tolerância à insulina intraperitoneal.(Figura 4.5).

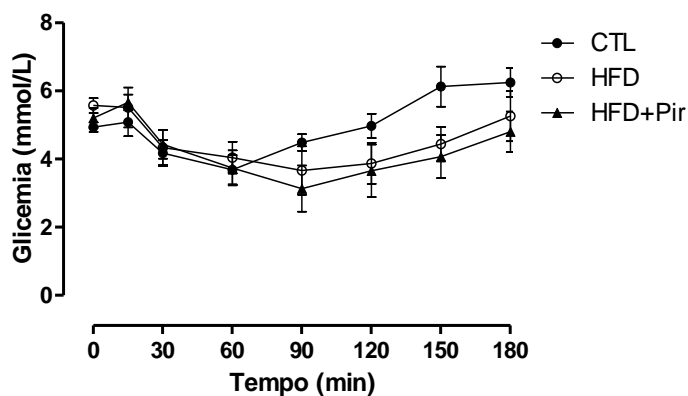


Figura 4.5. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os níveis de glicose plasmática durante o teste oral de tolerância à insulina intraperitoneal em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas.

Em relação ao metabolismo lipídico, os ratos com dieta hipercalórica tiveram um aumento significativo de triglicerídeos hepático, assim como do colesterol hepático quando comparado ao animal CTL e o tratamento foi capaz de reverter parcialmente o aumento do triglicerídeo hepático, porém não foi capaz de diminuir os níveis de colesterol hepático (4.6A e B).

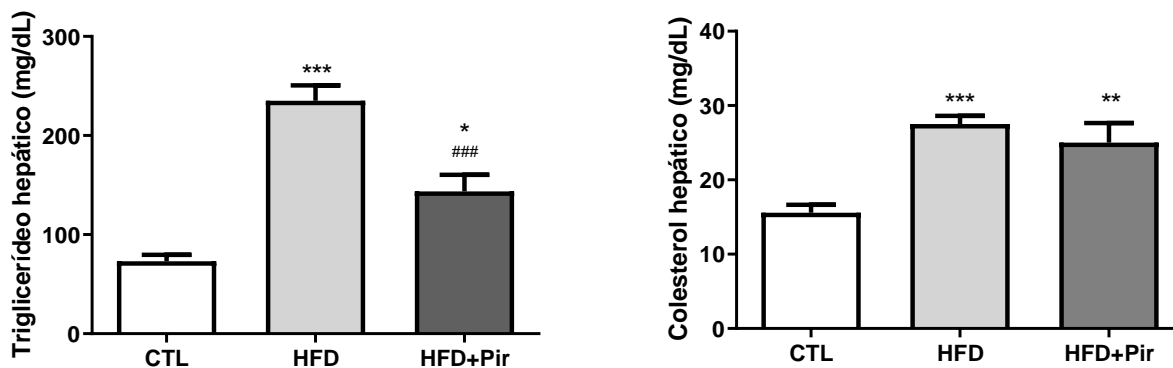


Figura 4.6. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os triglicerídeos hepático e colesterol hepático em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. * $P < 0,05$ vs. CTL. ** $P < 0,01$ vs. CTL. *** $P < 0,001$ vs. CTL. ### $P < 0,001$ vs. HFD.

Não houve diferença significativa em relação a pressão arterial sistólica (PAS) realizado através da pletismografia caudal (Figura 4.7).

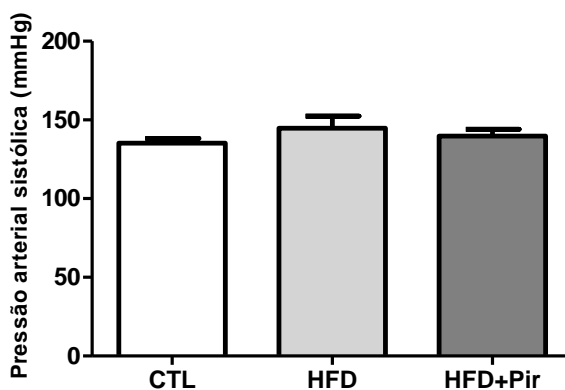


Figura 4.7. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a pressão arterial sistólica em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos

alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas.

Avaliando o estresse oxidativo no tecido hepático através de TBARS, observamos um aumento significativo de MDA nos animais com dieta hipercalórica quando comparados com animais com ração padrão e o tratamento com a piridoxamina foi capaz de reduzir parcialmente esse aumento (Figura 4.8).

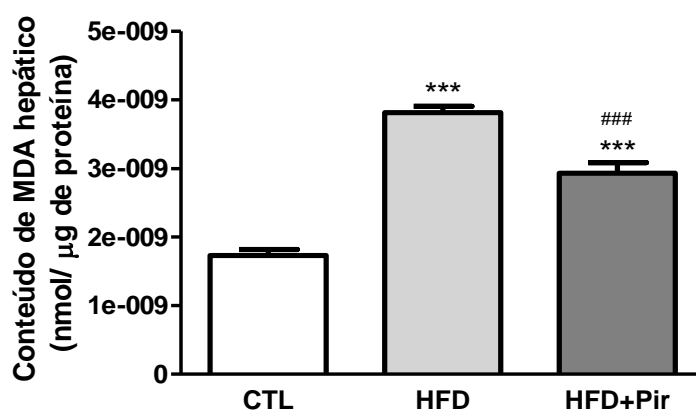


Figura 4.8. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+Pir: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. *** $P < 0,001$ vs. CTL. ### $P < 0,001$ vs. HFD. MDA – *Malondialdeído*.

Não observamos alterações significativas em relação aos marcadores bioquímicos séricos quando analisados por espectrofotometria (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Parâmetros bioquímicos séricos em ratos alimentados com dieta controle (CTL), com dieta hiperlipídica (HFD) e com dieta hiperlipídica tratado com piridoxamina (HFD + Pir) por 28 semanas.

Parâmetros	CTL	HFD	HFD+Pir
AST (U/L)	67,0 ± 19,01	50,4 ± 6,38	73,2 ± 16,45
ALT (U/L)	277,6 ± 101,38	214,5 ± 47,41	335,1 ± 92,72
Triglicerídeos (mg/dL)	82,4 ± 28,22	91,2 ± 21,74	109,8 ± 38,18
Colesterol total (mg/dL)	73,74 ± 18,92	65,14 ± 6,37	63,16 ± 2,50
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,03

AST - Aspartato aminotransferase e ALT - Alanina aminotransferase

As análises histológicas do fígado mostraram a presença de esteatose em ratos Wistar alimentados com uma dieta hiperlipídica, dos quais 14% apresentaram grau leve, 43% grau moderado e 43% grau grave de esteatose. Não foi observada a presença de infiltrado inflamatório e fibrose nos grupos estudados. Os ratos tratados com a piridoxamina apresentaram 60% grau leve e 40% não apresentaram esteatose (Figura 4.9).

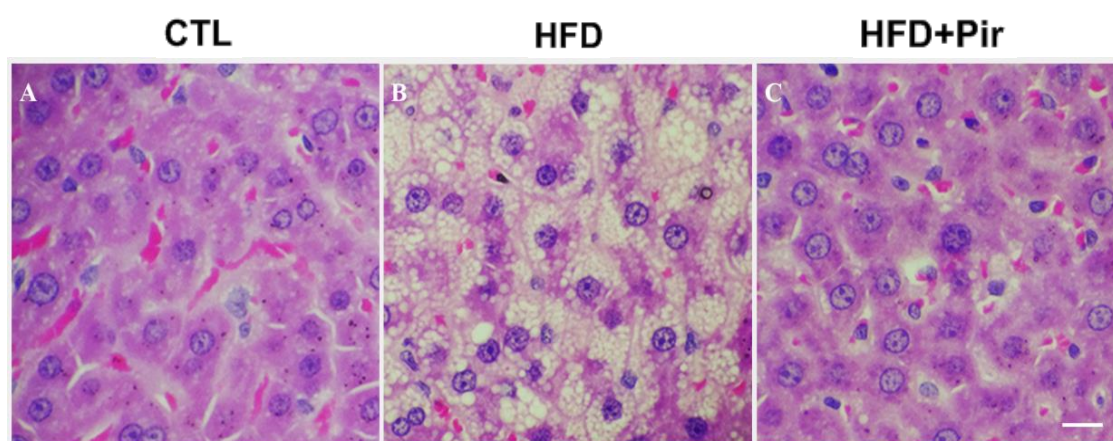


Figura 4.9. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre a avaliação da esteatose no fígado de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+PIR: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas. Barra de tamanho = 25µm. A ampliação é de 40×.

A microscopia intravital foi utilizada para avaliar o rolamento e a adesão de leucócitos nos sinusóides e nas vênulas pós-sinusoidais. LSCI foi usado para analisar o fluxo sanguíneo hepático microvascular basal. Os ratos submetidos a dieta HFD, apresentaram um aumento de cinco vezes no rolamento e oito vezes na adesão de leucócitos quando comparado ao grupo CTL. O tratamento com a piridoxamina foi capaz de reverter esse aumento (Figura 4.10D e E). Em relação as análises de LSCI, observamos uma diminuição de 21% no fluxo sanguíneo hepático microvascular em ratos alimentados com HFD em comparação com ratos alimentados com uma dieta CTL, e essa redução foi revertida pelo tratamento com a Pir (Figura 4.10F).

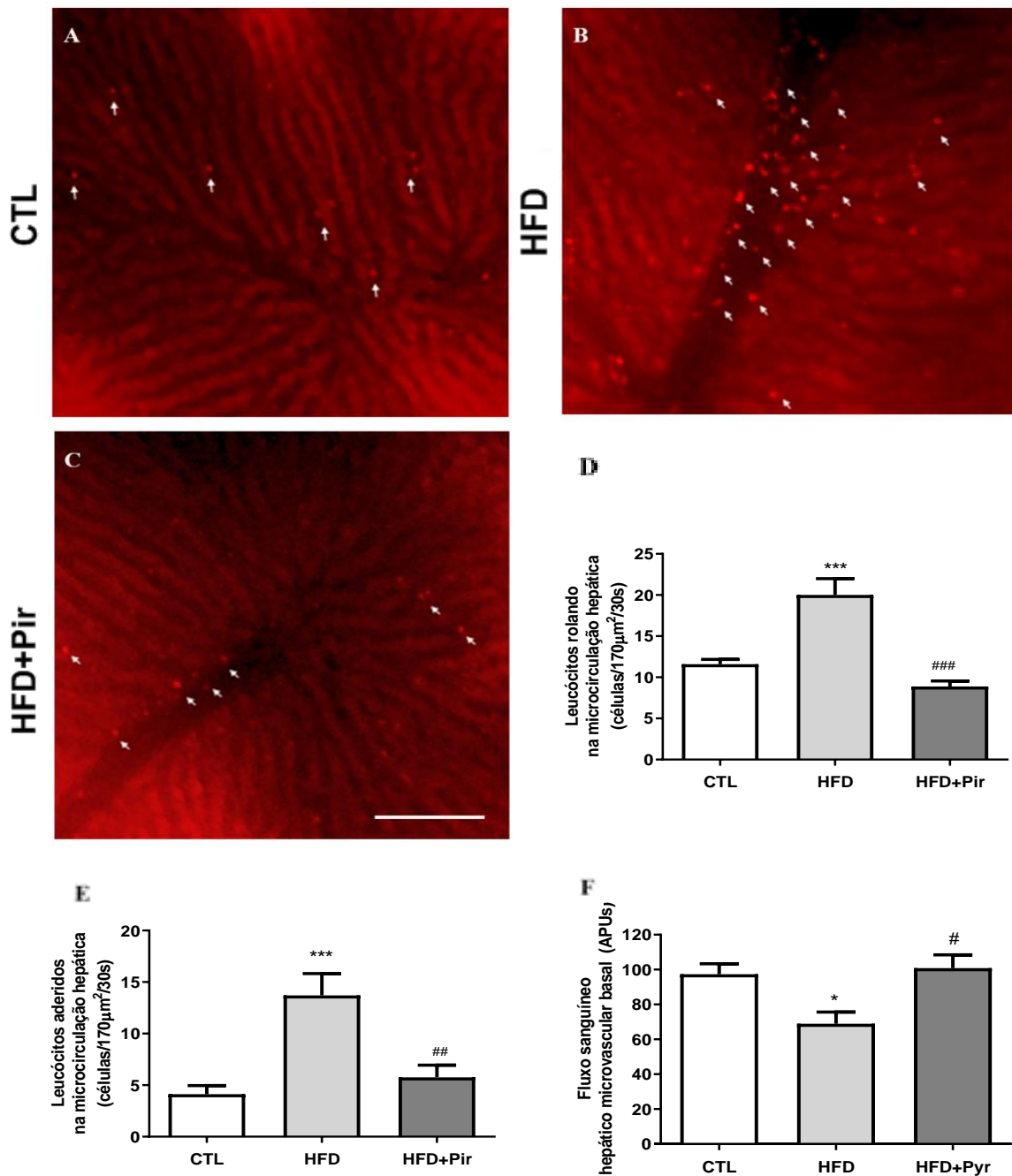


Figura 4.10. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre as alterações da microcirculação hepáticas em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. Imagem representativa da microcirculação hepática em ratos CTL (A), alimentados com HFD (B) e ratos alimentados com HFD e tratamento com piridoxamina (C), avaliados por microscopia intravital; quantificação off-line de rolagem (D) e adesão (E) de leucócitos nos sinusóides e nas vênulas pós-sinusóides. O fluxo sanguíneo microvascular hepático avaliado pelo contraste a laser speckle (LSCI) é representado em F. * P <0,05 vs. CTL, *** P <0,001 vs. CTL, #P <0,05 vs. HFD, ## P <0,01 vs. HFD e ### P <.001 vs. HFD. As setas indicam leucócitos rolantes/aderentes em sinusóides e nas vênulas pós-sinusóides.

O número de células estreladas hepáticas positivas para vitamina A na microcirculação hepática, foi avaliada também através de microscopia intravital. Os ratos alimentados com uma dieta hipercalórica mostraram uma redução de 49% no número de HSCs positivos para vitamina A na microcirculação hepática em comparação com os controles, que foi prevenida pelo tratamento com Pir. (Figura 4.11)

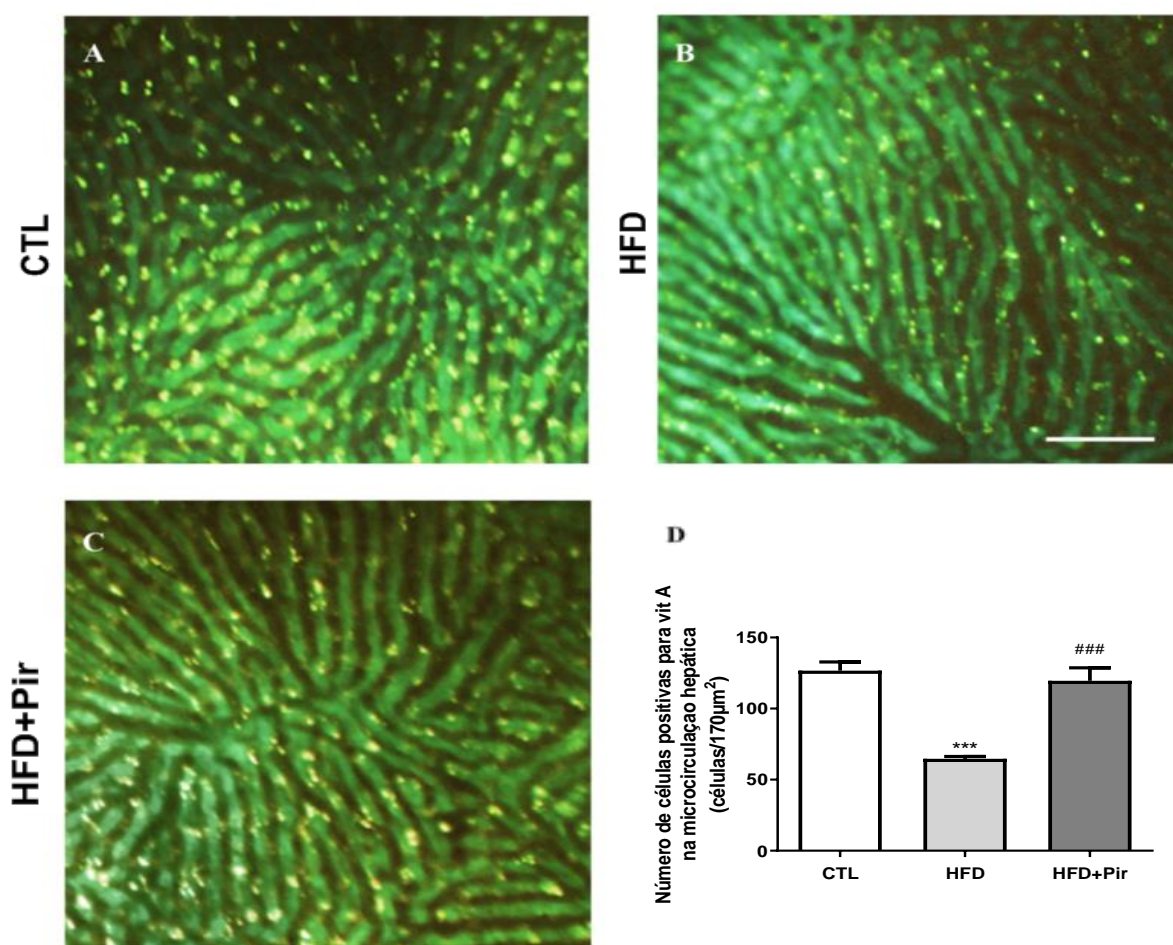


Figura 4.11. Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre o armazenamento de vitamina A (retinóide) em gotículas citoplásmicas de células estreladas hepáticas em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. A autofluorescência de vitamina A (verde pseudocolorido) indica gotículas de óleo rico em vitamina A. (A-C) imagens de gotículas de óleo com autofluorescência de vitamina A. A quantificação de células positivas para vitamina A é mostrada na letra D. *** P <0,001 vs. CTL e ### P <0,001 vs. HFD.

E por fim, não observamos diferenças na expressão gênica dos marcadores de inflamação e de estresse oxidativo avaliadas pelos genes: IL-1beta, catalase e eNOS entre os grupos estudados, por RT-PCR (Figura 4.12).

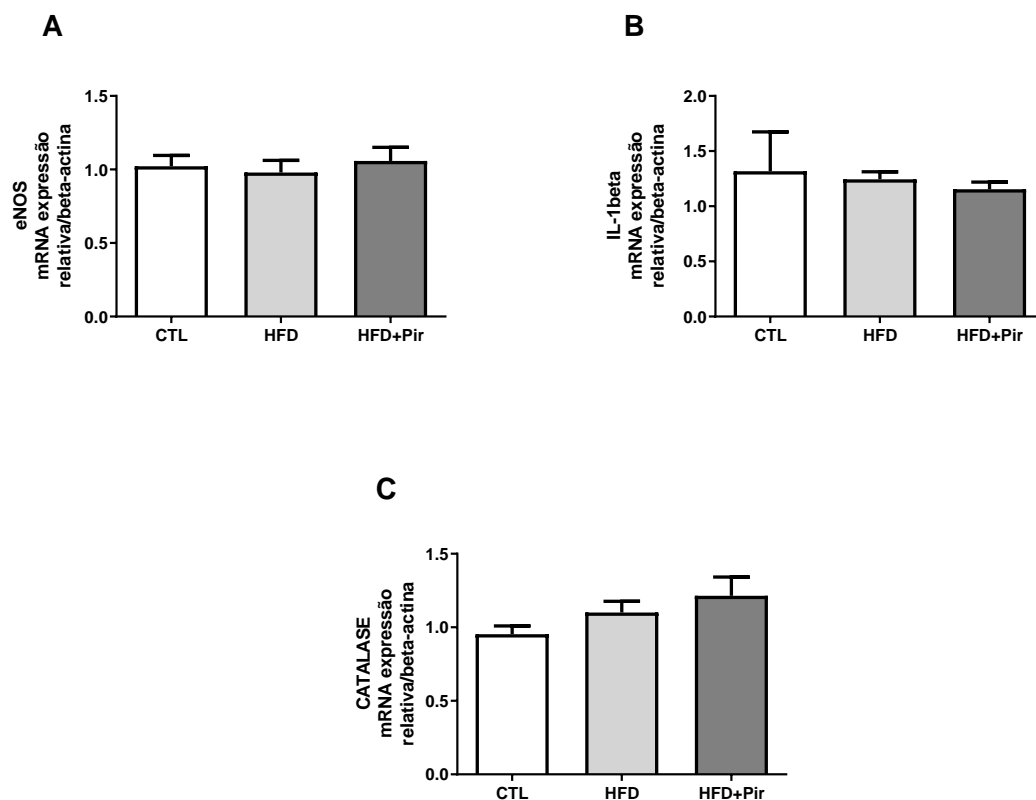


Figura 4.12: Efeito do tratamento com piridoxamina por 8 semanas sobre os parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo através das análises de PCR em tempo real dos níveis de transcritos de mRNA dos genes que codificam eNOS, IL-1beta e catalase no fígado de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. CTL: controle, HFD: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas, e HFD+PIR: ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 28 semanas e tratados com piridoxamina nas últimas 8 semanas.

5. Discussão:

No presente estudo, investigamos as alterações hepáticas induzidas pela alimentação hipercalórica e o efeito da piridoxamina sobre essas alterações. Como já foi mostrado por nosso grupo recentemente, o fígado de animais que receberam uma dieta hiperlipídica por 20 semanas tem características da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) com a presença de esteatose moderada a grave, sendo proposto como um modelo animal para estudar a fisiopatologia da doença (102). Esses animais submetidos a uma dieta HFD apresentam um conjunto de alterações hepáticas com ativação do estresse oxidativo, inflamação e aumento da área do fígado (102). Além de apresentarem um aumento na deposição de AGE e distúrbios na microcirculação, o que pode desempenhar um papel importante na progressão da DHGNA (102). Há um comprometimento na sinalização da insulina e diminuição da ativação de AMPK, que reduz lipogênese e estimula a oxidação da gordura, contribuindo para a patogênese da DHGNA (102). Como o acúmulo de AGEs devido à exposição crônica a dietas hiperlipídica contribui significativamente para a progressão de doenças metabólicas e degenerativas (201-208), no presente trabalho testamos a hipótese de que a inibição de AGEs usando piridoxamina pode desempenhar um papel nos distúrbios metabólicos e microcirculatórios desencadeados pela alimentação com uma dieta hiperlipídica. Para isso, após o estabelecimento do modelo DHGNA induzido pela alimentação com HFD durante 20 semanas (102), os animais foram tratados por 2 meses com 60 mg/kg/dia de piridoxamina e, posteriormente, realizadas avaliações funcionais *in vivo* da microcirculação, juntamente com análises metabólicas e moleculares.

Demonstramos que a administração da piridoxamina por via oral por 8 semanas foi capaz de reduzir significativamente as alterações metabólicas, melhorando a glicemia de jejum, o peso corporal, a deposição de gordura visceral e o perfil lipídico hepático. Esses efeitos benéficos podem ser explicados pela função da piridoxamina como cofator essencial para as enzimas envolvidas nas atividades biológicas e metabólicas, que incluem o metabolismo de aminoácidos, gorduras e glicose (209, 210). Maessen *et al* mostraram que o tratamento prolongado com piridoxamina por 18 semanas,

está associada à melhora de vários aspectos da obesidade que incluem a disfunção metabólica, resistência à insulina e a inflamação no tecido (211). Sabe-se que a obesidade está associada a uma expressão desregulada das adipocitocinas, já foi visto que a incubação de pré-adipócitos e adipócitos com o AGE CML aumentou a expressão de marcadores inflamatórios, RAGE, PAI-1 e interleucina-6, enquanto a expressão de adiponectina foi diminuída na presença de CML (212). CML é considerada um AGEs tradicional formado pela glicose, porém um número crescente de relatos enfatizou que a CML é formada principalmente por reações de peroxidação lipídica e pode, portanto, ser considerada um produto final de lipoxidação avançada. (213, 214). Um estudo de Maessen *et al*, sugere que a redução da massa do tecido adiposo pela piridoxamina é devida à inibição da adipogênese, como demonstrado *in vitro* pela redução da coloração de óleo Red O e do conteúdo de triglicerídeos na cultura e diferenciação de pré-adipócitos (211). Além disso, esses autores demonstraram que a Pir limitou a indução de importantes genes de diferenciação adipogênica, tais como receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARgama), proteína alfa de ligação a potenciação/CCAAT (C/EBPalfa), SREBP-1C, ácido graxo sintase (FASN), lipase lipoprotéica (LPL) e CD36. O SREBP-1C é um fator de transcrição conhecido por promover a síntese lipídica, pela expressão de genes adipogênicos como a LPL, o FASN e o PPARgama (215-217). PPARgama é conhecida por aumentar ainda mais a expressão gênica adipogênica (215, 216). Como tanto a expressão de SREBP-1C e PPARgama e a expressão de seus genes-alvo estão diminuídas, isso sugere um efeito inibitório da Pir na adipogênese, possivelmente através da inibição do SREBP-1C. (199). Além disso, Kim *et al* avaliaram o potencial hipoglicemiante do piridoxal e seus derivados usando ratos Sprague-Dawley e os resultados indicam uma diminuição do nível de glicose no sangue dos ratos tratados e os autores correlacionam essa descoberta a inibição de hidrólise de carboidratos e enzimas ligadas à absorção de glicose, como as sacarase, maltase e glicoamilase (218). De acordo com esses achados o tratamento com a Pir pode ser um importante candidato a terapia farmacológica da disfunção metabólica e complicações associadas à obesidade. (212).

A DHGNA está frequentemente associada a outras condições metabólicas como a obesidade, DMT2, SMet e aumenta o risco de DCV (219). Na diabetes mellitus, a hiperglicemia crônica favorece o desenvolvimento de condições metabólicas e hemodinâmicas incluindo aumento de síntese dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (220). Os AGEs estão elevados também em pacientes e em modelos experimentais de doença hepática, apontando então seu possível envolvimento na fisiopatologia da DHGNA (150, 170, 221), além de desempenhar um papel importante na formação de EROs e aumentar a peroxidação lipídica. (213). Paul *et al* provaram que a Pir é um potente inibidor da formação de AGEs em experimentos *in vitro* (182) e segundo Nagai *et al* esse efeito da Pir é devido à múltiplos mecanismos de ação como o bloqueio da oxidação do intermediário Amadori, a captura de compostos carbonilo e dicarbonilo reativos derivados do composto de Amadori, a quelação de catalisadores de íons metálicos de oxidação (222), além da eliminação de EROs (190). Nosso grupo demonstrou anteriormente um aumento significativo dos níveis de AGE nos fígados de ratos com DHGNA alimentados com uma dieta hipercalórica por 20 semanas (102). No presente estudo, demonstramos que houve uma diminuição nos níveis de AGEs nos fígados de ratos com DHGNA induzida por uma dieta hipercalórica por 28 semanas e tratado com Pir. Os AGEs podem ser reconhecido por diversos receptores e um dos principais é o RAGE, um membro da superfamília de imunoglobulinas (153). Os AGEs se ligam a RAGE na superfície da célula endotelial e desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que estimula a NADPH oxidase aumentando as espécies reativas de oxigênio (7) (223). Segundo Takeuchi *et al*, a produção de EROs desempenha um papel fundamental no agravamento da patologia hepática observada na esteatohepatite. (220). Comprovando o papel central do estresse oxidativo no dano tecidual, verificamos um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) no fígado de ratos submetidos à HFD e o tratamento com a piridoxamina foi capaz de reverter esse aumento. De acordo com isso, uma diminuição sistêmica nos parâmetros de estresse oxidativo foi previamente demonstrada em camundongos obesos C57BL6/J alimentados com uma dieta HFD tratados com Pir (224). Kohei e at mostraram que a Pir em cultura de hepatócitos humanos reduziu significativamente os níveis de proteínas celulares carboniladas e

proteínas agregadas, além de melhorar a taxa de sobrevivência celular sugerindo então que a Pir pode ter eficácia potencial na melhora da disfunção celular mediada por EROs (225). Estudos anteriores mostraram que a Pir pode inibir a produção de radical hidroxila do peróxido de hidrogênio, assim como eliminar os radicais hidroxila. O mecanismo de eliminação desses radicais está relacionado a doação de hidrogênio fenólico ou pela hidroxilação do anel piridínico (188, 191, 223). Portanto, o efeito hepatoprotetor da piridoxamina poderia ser, pelo menos em parte, devido a uma redução significativa na peroxidação lipídica local/estresse oxidativo causado pela redução do acúmulo de AGEs.

Histopatologicamente, a DHGNA varia de esteatose isolada, que é caracterizada por mais de 5% de acúmulo de triglicerídeos hepáticos; até a EHNA na qual já tem presença da inflamação além do acúmulo de gordura no fígado (226). O desenvolvimento da esteatose hepática envolve vários mecanismos e sabe-se que a entrega de ácidos graxos livres no fígado é responsável por quase dois terços do acúmulo lipídico (227). Em nossos achados histológicos, notamos a presença de esteatose em todos os ratos alimentados com uma dieta hipercalórica, porém nenhuma lesão necroinflamatória ou fibrose. Além disso, o metabolismo lipídico hepático foi alterado, apresentando aumento nos conteúdos de triglicerídeos e colesterol hepáticos. O tratamento com a Pir foi capaz de proteger 40% dos ratos e 60% apresentaram o grau leve de esteatose, além de reverter o aumento do triglicerídeo hepático. Gaens *et al.* usando um modelo *in vitro*, evidenciaram que a esteatose hepática está associada ao acúmulo de CML e relacionaram ao aumento da formação endógena de lipídeos via peroxidação lipídica e da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. (153). A Pir, em um modelo de rato diabético induzida por estreptozotocina, foi eficaz tanto na redução da hipercolesterolemia quanto na hipertrigliceridemia e os autores associaram essa melhora ao aumento do metabolismo oxidativo dos lipídeos promovido pela Pir (228).

A DHGNA está ligada a alterações patológicas na estrutura do fígado correlacionando acúmulo de gordura com a extensão das alterações microcirculatórias, como disfunção endotelial sinusoidal, prejuízo da perfusão

tecidual e aumento do recrutamento leucocitário (127, 128, 229). Recentemente, mostramos que o fígado de ratos Wistar com DHGNA induzido por 20 semanas com uma alimentação HFD apresentavam distúrbios microcirculatórios e aumento nos níveis de AGEs sérico e hepático (102). Schleicher *et al.* desenvolveram um modelo matemático da dinâmica lipídica em hepatócitos, dependendo do espaço sinusoidal e do suprimento de oxigênio e mostraram que a progressão da esteatose é acompanhado por inchaço dos hepatócitos, o que reduz o espaço sinusoidal e, assim, prejudica a microcirculação hepática (132). Da mesma forma, Sun *et al* avaliaram por microscopia de fluorescência intravital o potencial de membrana mitocondrial, núcleos de hepatócitos e leucócitos no fígado de ratos Zucker após isquemia e reperfusão e notaram que o fígado do rato Zucker obeso é esteatótico e apresenta uma microcirculação anormal manifestada por uma reduzida densidade sinusoidal dada a diminuição de número de sinusóides funcionais e maior aderência leucocitária (131). As alterações microcirculatórias hepáticas mostradas no presente estudo incluem diminuição substancial no fluxo sanguíneo através dos sinusóides hepáticos e aumento do rolamento e ativação de aderência sinusoidal nas vênulas sinusoidais e pós sinusoidais. Os AGEs junto com a hiperglicemia já foram implicados na patogênese da doença macrovascular e microvascular observadas nas doenças metabólicas (149, 230-232). O tratamento com aminoguanidina; um composto hidralazina que inibe a formação de AGE, através de um ataque nucleofílico para intermediários de carbonila (233); por 18 meses em ratos Sprague-Dawley e Fischer não diabéticos preveniu o aumentos no conteúdo de AGEs nos tecidos analisados, inibiu a albuminúria e proteinúria, hipertrofia cardíaca e a função vascular dependente do endotélio e independente do endotélio (234). Em relação a Pir, poucos estudos foram associados aos parâmetros vasculares. Foi descrito recentemente que o tratamento Pir em camundongos C57BL/6J, melhorou o vasorelaxamento aórtico (211). Além disso, em ratos idosos, o tratamento com a Pir por cinco meses preveniu o enrijecimento aórtico relacionado à idade e resistência vascular em associação com a glicação do colágeno reduzida (235). Curiosamente, demonstramos nesse trabalho que o tratamento com a Pir foi capaz de aumentar o fluxo sanguíneo e diminuir o recrutamento de leucócitos na microcirculação hepática. Além disso,

observamos uma diminuição no número de células positivas para vitamina A na microcirculação hepática no grupo com a dieta HFD. Já foi descrito que no fígado normal, as células estreladas hepáticas (HSCs) têm um fenótipo não proliferativo e quiescente, participando no armazenamento vitamina A (retinóide), vasorregulação por meio de interações das células endoteliais, homeostase da matriz extracelular, desintoxicação de drogas, imunotolerância e a preservação da massa de hepatócitos através da secreção de mitógenos (236). A vitamina A é absorvida na dieta, armazenada no fígado e as HSCs são o depósito celular primário (237). Após lesão hepática, ocorre a ativação das que se transdiferenciam de célula armazenadora de vitamina A quiescente em miofibroblastos. Os miofibroblastos são células proliferativas, contráteis, inflamatórias e quimiotáticas e tem como característica a produção exacerbada de MEC, considerada um fator importante na fibrose hepática. (238). O processo de ativação das HSCs foi descrito em duas fases. Na primeira fase - a fase de iniciação - os estímulos para a ativação de HSCs derivam de hepatócitos lesados, células endoteliais, células de Kupffer vizinhas e mudança na composição da MEC que promovem uma diferenciação celular semelhante a miofibroblastos que envolve a perda de gotículas lipídicas que contêm retinóides, e se tornam mais responsivas às citocinas proliferativas e fibrogênicas pela regulação positiva dos receptores de membrana. Já na segunda fase, a “fase de perpetuação”, envolve mudanças fenotípicas fundamentais pelo aumento da expressão de receptores de membrana celular e conseqüentemente o aumento dos efeitos das citocinas, remodelamento da MEC com aumento da fibrogênese e a proliferação celular. E esse fenótipo “ativado” é perpetuado por uma liberação continuada de mediadores de tecido cronicamente inflamado e lesionado (237-239). Entretanto, como não houve evidência de fibrose no fígado de ratos alimentados com uma dieta hipercalórica, as alterações na perfusão sinusoidal aqui observadas poderiam ser devidas à ativação de HSC e liberação de substâncias vasoativas, como endotelina-1 e monóxido de carbono, e / ou regulação direta de fluxo sanguíneo sinusoidal devido às propriedades contráteis adquiridas de HSCs ativadas (240, 241). Além disso, o acúmulo de lipídios nas células parenquimatosas pode diminuir o lúmen dos sinusóides; sendo agravado pelo aumento de leucócitos, que estão aprisionados ou aderidos aos sinusóides

estreitados, como resultado da ativação da resposta inflamatória microvascular hepática. A ativação de células de Kupffer e outros macrófagos hepáticos e o aumento de radicais livres poderiam contribuir para a resposta inflamatória, estimular as células estreladas e exacerbar o estresse oxidativo (111). Mostramos aqui, que o tratamento com a pirioxamina por 8 semanas foi capaz de aumentar o número de células positivas para vitamina A. Os AGEs já foram implicados as HSCs e de acordo com isso; recentemente He *et al*, observaram que os AGEs estimulam a proliferação de HSCs em cultura de células primárias de ratos, o qual induziu expressão gênica e proteica alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) e cadeia alfa de procolágeno tipo 1 (proCOL1A1alfa) (242). Além disso, revelaram que o bloqueio da sinalização da via AGE-RAGE por sRAGE atenuou a ativação das HSCs. (242). Um relato de caso recente mostrou que uma criança com deficiência da piridoxamina 5-fosfato oxidase, que é responsável por um fenótipo clínico de prematuridade, encefalopatia, convulsões responsivas à piridoxina, apresentou cirrose hepática na primeira infância e a deficiência dessa forma ativa da piridoxamina leva a ativação das HSCs (243). Em vista disto, a diminuição na ativação de HSCs exercida pelo tratamento com Pir pode ser devido à diminuição dos níveis de AGE hepático, que por sua vez é um conhecido ligante de RAGE e ativador de HSC. (242).

6. Conclusão:

Em conclusão, o tratamento com a piridoxamina foi capaz de reduzir o recrutamento de leucócitos e a ativação de HSC, além de recuperar a perfusão normal no fígado associada à diminuição da peroxidação lipídica, podem explicar, pelo menos em parte, os efeitos protetores contra distúrbios microcirculatórios hepáticos. Nossos resultados indicam, assim, que a piridoxamina pode ser um potencial tratamento para a disfunção microcirculatória e complicações metabólicas associadas à DHGNA. Caracterização abrangente de modelos animais e novos alvos terapêuticos podem elucidar novas estratégias para tratamentos de pacientes com DHGNA.

7. Referências:

1. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001;104(13):1464-70.
2. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015;16(1):1-12.
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, Group IDFETFC. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
4. Eckel RH, Cornier MA. Update on the NCEP ATP-III emerging cardiometabolic risk factors. *BMC medicine*. 2014;12:115.
5. 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;112(17):2735-52.
6. International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
7. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
8. 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;112(17):2735-52.
9. Kahn R. Metabolic syndrome--what is the clinical usefulness? *Lancet*. 2008;371(9628):1892-3.
10. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):231-7.
11. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15(7):539-53.
12. Vykoukal D, Davies MG. Biology of metabolic syndrome in a vascular patient. *Vascular*. 2012;20(3):156-65.
13. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(6):295-300.
14. Moreira GC, Cipullo JP, Ciorlia LA, Cesarino CB, Vilela-Martin JF. Prevalence of metabolic syndrome: association with risk factors and cardiovascular complications in an urban population. *PloS one*. 2014;9(9):e105056.
15. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Mikhailidis DP. The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am J Med Sci*. 2007;333(6):362-71.
16. Gorter PM, Olijhoek JK, van der Graaf Y, Algra A, Rabelink TJ, Visseren FL. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):363-9.
17. Brevetti G, Schiano V, Sirico G, Giugliano G, Laurenzano E, Chiariello M. Metabolic syndrome in peripheral arterial disease: relationship with severity of peripheral circulatory insufficiency, inflammatory status, and cardiovascular comorbidity. *J Vasc Surg*. 2006;44(1):101-7; discussion 7.
18. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(9):3490-7.
19. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.

20. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347-55.
21. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(5):H2031-41.
22. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004;92(3):347-55.
23. Ghadge AA, Khaire AA. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine.* 2019;121:154735.
24. Rehman K, Akash MSH, Alina Z. Leptin: A new therapeutic target for treatment of diabetes mellitus. *J Cell Biochem.* 2018;119(7):5016-27.
25. Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond).* 2010;34 Suppl 2:S59-66.
26. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research.* 2005;96(9):939-49.
27. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res.* 2000;8(4):337-41.
28. MEJ HTL. *Metabolic Syndrome.* 2015.
29. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med.* 2006;119(5 Suppl 1):S10-6.
30. Gill H, Mugo M, Whaley-Connell A, Stump C, Sowers JR. The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005;330(6):290-4.
31. Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1813-22.
32. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009;42(13-14):1331-46.
33. Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care.* 1996;19(4):390-3.
34. Prieur X, Roszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):327-37.
35. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(3):E568-77.
36. Kraemer-Aguilar LG, Laflor CM, Bouskela E. Skin microcirculatory dysfunction is already present in normoglycemic subjects with metabolic syndrome. *Metabolism: clinical and experimental.* 2008;57(12):1740-6.
37. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2153-7.
38. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
39. Grandl G, Wolfrum C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. *Seminars in immunopathology.* 2018;40(2):215-24.
40. Chiang SH, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, et al. The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice. *Cell.* 2009;138(5):961-75.
41. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research.* 2007;100(11):1589-96.
42. Ferrannini E, Natali A. Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *Am Heart J.* 1991;121(4 Pt 2):1274-82.
43. Malhotra A, Kang BP, Cheung S, Opawumi D, Meggs LG. Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes.* 2001;50(8):1918-26.

44. Morse SA, Zhang R, Thakur V, Reisin E. Hypertension and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005;330(6):303-10.
45. Anand SS, Yi Q, Gerstein H, Lonn E, Jacobs R, Vuksan V, et al. Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;108(4):420-5.
46. Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci.* 2007;12:2957-66.
47. Faber DR, de Groot PG, Visseren FL. Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Obes Rev.* 2009;10(5):554-63.
48. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24(8):1476-85.
49. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987;69(2):381-7.
50. Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2014;43(1):1-23.
51. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(1):27-38.
52. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2003;37(4):917-23.
53. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:145-71.
54. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-31.
55. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World J Gastroenterol.* 2018;24(27):2974-83.
56. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-85.
57. Lanuza F, Sapunar J, Hofmann E. [Management of non-alcoholic fatty liver disease]. *Rev Med Chil.* 2018;146(8):894-901.
58. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2012;55(6):2005-23.
59. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2003;37(4):909-16.
60. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, et al. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol.* 2007;47(5):711-7.
61. Weiss J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Deutsches Arzteblatt international.* 2014;111(26):447-52.
62. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129(1):113-21.
63. Sayiner M, Otgonsuren M, Cable R, Younossi I, Afendy M, Golabi P, et al. Variables Associated With Inpatient and Outpatient Resource Utilization Among Medicare Beneficiaries With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With or Without Cirrhosis. *Journal of clinical gastroenterology.* 2017;51(3):254-60.
64. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2016;64(1):73-84.

65. Trust for America's Health; Robert Wood Johnson Foundation. Adult obesity in the United States. .
66. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(5):700-13.
67. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. *Middle East journal of digestive diseases.* 2016;8(2):131-7.
68. Park KS, Lee YS, Park HW, Seo SH, Jang BG, Hwang JY, et al. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *The Korean journal of internal medicine.* 2004;19(1):19-26.
69. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2006;26(7):856-63.
70. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol.* 2008;48 Suppl 1:S104-12.
71. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama.* 2015;313(22):2263-73.
72. Akyuz F, Demir K, Ozdil S, Aksoy N, Poturoglu S, Ibrism D, et al. The effects of rosiglitazone, metformin, and diet with exercise in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2007;52(9):2359-67.
73. Balkestein EJ, van Aggel-Leijssen DP, van Baak MA, Struijker-Boudier HA, Van Bortel LM. The effect of weight loss with or without exercise training on large artery compliance in healthy obese men. *J Hypertens.* 1999;17(12 Pt 2):1831-5.
74. Hannah WN, Jr., Harrison SA. Lifestyle and Dietary Interventions in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1365-74.
75. Harrison SA, Day CP. Benefits of lifestyle modification in NAFLD. *Gut.* 2007;56(12):1760-9.
76. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008;48(6):993-9.
77. Tilg H, Moschen A. Weight loss: cornerstone in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2010;56(2):159-67.
78. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology.* 2006;130(1):207-10.
79. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
80. El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol.* 2007;47(5):718-25.
81. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, Thompson CH, Smith K, Ruell PA, et al. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2008;47(5):1513-23.
82. Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes.* 2008;57(8):2037-45.
83. de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem.* 2008;54(6):945-55.
84. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107(5):450-5.
85. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2005;42(5):987-1000.

86. Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004;8(3):575-94, ix.
87. Maximos M, Bril F, Portillo Sanchez P, Lomonaco R, Orsak B, Biernacki D, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2015;61(1):153-60.
88. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental.* 2016;65(8):1038-48.
89. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease.* 2008;28(4):370-9.
90. Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *The Journal of cell biology.* 2009;185(4):641-55.
91. Berne RM LM KB. FISILOGIA2009.
92. GUYTON AC H JE. TRATADO DE FISILOGIA MÉDICA2017.
93. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension.* 1992;19(2 Suppl):li1-9.
94. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension.* 1986;8(3):181-3.
95. Frisbee JC. Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *Microcirculation.* 2005;12(5):383-92.
96. Czernichow S, Greenfield JR, Galan P, Jellouli F, Safar ME, Blacher J, et al. Macrovascular and microvascular dysfunction in the metabolic syndrome. *Hypertens Res.* 2010;33(4):293-7.
97. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2006;19(5):477-83.
98. Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, Serne EH, Schaper NC, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda).* 2007;22:252-60.
99. Estado V, Nascimento A, Antunes B, Gomes F, Coelho L, Rangel R, et al. Cerebral Microvascular Dysfunction and Inflammation Are Improved by Centrally Acting Antihypertensive Drugs in Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2017;15(1):26-35.
100. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, et al. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(10):2046-54.
101. Obadia N, Lessa MA, Daliry A, Silveiras RR, Gomes F, Tibirica E, et al. Cerebral microvascular dysfunction in metabolic syndrome is exacerbated by ischemia-reperfusion injury. *BMC Neurosci.* 2017;18(1):67.
102. Pereira E, Silveiras RR, Flores EEI, Rodrigues KL, Ramos IP, da Silva IJ, et al. Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS one.* 2017;12(6):e0179654.
103. Silveiras RR, Pereira EN, Flores EE, Estado V, Reis PA, Silva IJ, et al. Combined therapy with metformin and insulin attenuates systemic and hepatic alterations in a model of high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes. *Int J Exp Pathol.* 2016;97(3):266-77.
104. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269-339.
105. Piergiovanni M, Bianchi E, Capitani G, Li Piani I, Ganzer L, Guidotti LG, et al. Microcirculation in the murine liver: a computational fluid dynamic model based on 3D reconstruction from in vivo microscopy. *J Biomech.* 2017;63:125-34.
106. Fawcett DW BW, Raviola E. The textbook of histology. 1994;12th Ed.:964.
107. Rappaport AM. Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol.* 1980;21:1-63.

108. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, et al. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg*. 1992;75(3):421-30.
109. Lauth WW. Control of hepatic arterial blood flow: independence from liver metabolic activity. *Am J Physiol*. 1980;239(4):H559-h64.
110. R. B-o. The vascularity of the liver. ii. the influence of the portal blood-flow upon the flow in the hepatic artery. *quarterly journal of experimental physiology*. 1911.
111. Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2008;291(6):684-92.
112. Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res*. 1970;31(1):125-50.
113. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, et al. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*. 1994;35(11):1509-16.
114. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *Faseb j*. 1991;5(3):271-7.
115. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Seminars in liver disease*. 2001;21(3):337-49.
116. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol*. 1994;20(2):301-4.
117. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1986;6(4):718-22.
118. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme*. 1992;46(1-3):155-68.
119. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J Hepatol*. 2016;65(3):608-17.
120. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2007;47(2):220-7.
121. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008;47(4):1248-56.
122. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013;14(10):996-1006.
123. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. *Microcirculation*. 2003;10(6):447-56.
124. Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Non-alcoholic fatty liver disease, to struggle with the strangle: Oxygen availability in fatty livers. *Redox Biol*. 2017;13:386-92.
125. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvascular research*. 2005;70(3):129-36.
126. McCuskey RS, Ito Y, Robertson GR, McCuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2004;40(2):386-93.
127. Pasarin M, La Mura V, Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Pagan JC, et al. Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD. *PloS one*. 2012;7(4):e32785.
128. Rosenstengel S, Stoeppler S, Bahde R, Spiegel HU, Palmes D. Type of steatosis influences microcirculation and fibrogenesis in different rat strains. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2011;24(6):273-82.

129. Shigefuku R, Takahashi H, Kobayashi M, Ikeda H, Matsunaga K, Okuse C, et al. Pathophysiological analysis of nonalcoholic fatty liver disease by evaluation of fatty liver changes and blood flow using xenon computed tomography: can early-stage nonalcoholic steatohepatitis be distinguished from simple steatosis? *Journal of gastroenterology*. 2012;47(11):1238-47.
130. Van Beers BE. Science to Practice: can we diagnose nonalcoholic steatohepatitis with intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging? *Radiology*. 2014;270(1):1-2.
131. Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation*. 2001;72(10):1625-31.
132. Schleicher J, Guthke R, Dahmen U, Dirsch O, Holzhuetter HG, Schuster S. A theoretical study of lipid accumulation in the liver-implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(1):62-9.
133. Qu A, Taylor M, Xue X, Matsubara T, Metzger D, Chambon P, et al. Hypoxia-inducible transcription factor 2alpha promotes steatohepatitis through augmenting lipid accumulation, inflammation, and fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;54(2):472-83.
134. Rankin EB, Rha J, Selak MA, Unger TL, Keith B, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(16):4527-38.
135. Selivanov VA, Votyakova TV, Zeak JA, Trucco M, Roca J, Cascante M. Bistability of mitochondrial respiration underlies paradoxical reactive oxygen species generation induced by anoxia. *PLoS computational biology*. 2009;5(12):e1000619.
136. Ban LA, Shackel NA, McLennan SV. Extracellular Vesicles: A New Frontier in Biomarker Discovery for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):376.
137. Burnley-Hall N, Willis G, Davis J, Rees DA, James PE. Nitrite-derived nitric oxide reduces hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated extracellular vesicle production by endothelial cells. *Nitric Oxide*. 2017;63:1-12.
138. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008;48(2):670-8.
139. Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol*. 2007;46(5):927-34.
140. Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, et al. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):447-59.
141. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:15.
142. Nanji AA, Griniuviene B, Yacoub LK, Fogt F, Tahan SR. Intercellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver disease: relationship to endotoxemia and TNF alpha messenger RNA. *Exp Mol Pathol*. 1995;62(1):42-51.
143. Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, et al. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(4):2336-42.
144. De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(6):4308-15.
145. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of leukocyte biology*. 1993;54(4):283-8.
146. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:949157.

147. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(3):173-82.
148. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(5):698-704.
149. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
150. Kimura Y, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Ishitobi T, Nabeshima Y, et al. Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation endproducts (AGEs) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients with dyslipidemia: clinical usefulness of AGEs as a biomarker for the attenuation of NASH. *Journal of gastroenterology*. 2010;45(7):750-7.
151. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, et al. Olmesartan blocks inflammatory reactions in endothelial cells evoked by advanced glycation end products by suppressing generation of reactive oxygen species. *Ophthalmic Res*. 2008;40(1):10-5.
152. Busch M, Franke S, Ruster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(8):742-55.
153. Gaens KH, Niessen PM, Rensen SS, Buurman WA, Greve JW, Driessen A, et al. Endogenous formation of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine is increased in fatty livers and induces inflammatory markers in an in vitro model of hepatic steatosis. *J Hepatol*. 2012;56(3):647-55.
154. M.A A. Effect of heated hyperlipid diet and regular hyperlipid diet in the formation of glycation products and reactiveoxygen species in wistar rats. 2009.
155. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002;251(2):87-101.
156. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, et al. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metab*. 2018;28(3):337-52.
157. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Auge N, Pamplona R, Portero-Otin M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(12):3071-109.
158. Piarulli F, Sartore G, Lapolla A. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. *Acta Diabetol*. 2013;50(2):101-10.
159. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29.
160. Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):11047-52.
161. Goh KC, Lim YP, Ong SH, Siak CB, Cao X, Tan YH, et al. Identification of p90, a prominent tyrosine-phosphorylated protein in fibroblast growth factor-stimulated cells, as 80K-H. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5832-8.
162. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, et al. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*. 1995;1(6):634-46.
163. Santos JC, Valentim IB, de Araujo OR, Ataide Tda R, Goulart MO. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19846-66.
164. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest*. 1992;90(2):439-46.

165. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*. 1988;240(4858):1546-8.
166. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
167. Corman B, Duriez M, Poitevin P, Heudes D, Bruneval P, Tedgui A, et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1301-6.
168. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem*. 1992;267(18):12404-7.
169. Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol*. 1988;203(2):495-505.
170. Patel R, Baker SS, Liu W, Desai S, Alkhoury R, Kozielski R, et al. Effect of dietary advanced glycation end products on mouse liver. *PloS one*. 2012;7(4):e35143.
171. Yilmaz Y, Ulukaya E, Gul OO, Arabul M, Gul CB, Atug O, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem*. 2009;42(9):802-7.
172. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*. 2006;13(17):1971-8.
173. Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble levels of receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):879-82.
174. Dakshinamurti K. Vitamins and their derivatives in the prevention and treatment of metabolic syndrome diseases (diabetes). *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93(5):355-62.
175. Arai M, Miyashita M, Kobori A, Toriumi K, Horiuchi Y, Itokawa M. Carbonyl stress and schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014;68(9):655-65.
176. Chetyrkin SV, Kim D, Belmont JM, Scheinman JI, Hudson BG, Voziyan PA. Pyridoxamine lowers kidney crystals in experimental hyperoxaluria: a potential therapy for primary hyperoxaluria. *Kidney Int*. 2005;67(1):53-60.
177. Chiazza F, Cento AS, Collotta D, Nigro D, Rosa G, Baratta F, et al. Protective Effects of Pyridoxamine Supplementation in the Early Stages of Diet-Induced Kidney Dysfunction. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2682861.
178. Dwyer JP, Greco BA, Umanath K, Packham D, Fox JW, Peterson R, et al. Pyridoxamine dihydrochloride in diabetic nephropathy (PIONEER-CSG-17): lessons learned from a pilot study. *Nephron*. 2015;129(1):22-8.
179. Itokawa M, Miyashita M, Arai M, Dan T, Takahashi K, Tokunaga T, et al. Pyridoxamine: A novel treatment for schizophrenia with enhanced carbonyl stress. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018;72(1):35-44.
180. Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21177-84.
181. Adrover M, Vilanova B, Frau J, Munoz F, Donoso J. The pyridoxamine action on Amadori compounds: A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(10):5557-69.
182. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *J Biol Chem*. 2003;278(47):46616-24.

183. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;257(2):251-8.
184. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48967-72.
185. Ueland PM, McCann A, Midttun O, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Molecular aspects of medicine*. 2017;53:10-27.
186. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003;22(37):5734-54.
187. Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(6):789-94.
188. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onogi H, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: biochemical mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2478-87.
189. Daumer KM, Khan AU, Steinbeck MJ. Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34681-92.
190. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:807-16.
191. Chetyrkin SV, Mathis ME, Ham AJ, Hachey DL, Hudson BG, Voziyan PA. Propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(7):1276-85.
192. Menon M, Koul H. Clinical review 32: Calcium oxalate nephrolithiasis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;74(4):703-7.
193. Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol*. 1998;160(5):1617-24.
194. Muellenbach EA, Diehl CJ, Teachey MK, Lindborg KA, Archuleta TL, Harrell NB, et al. Interactions of the advanced glycation end product inhibitor pyridoxamine and the antioxidant alpha-lipoic acid on insulin resistance in the obese Zucker rat. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(10):1465-72.
195. Nakayama H, Mitsuhashi T, Kuwajima S, Aoki S, Kuroda Y, Itoh T, et al. Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1993;42(2):345-50.
196. Marques PE, Oliveira AG, Chang L, Paula-Neto HA, Menezes GB. Understanding liver immunology using intravital microscopy. *J Hepatol*. 2015;63(3):733-42.
197. McDonald B, McAvoy EF, Lam F, Gill V, de la Motte C, Savani RC, et al. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med*. 2008;205(4):915-27.
198. Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, et al. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvascular research*. 1993;46(1):28-42.
199. Li CH, Ge XL, Pan K, Wang PF, Su YN, Zhang AQ. Laser speckle contrast imaging and Oxygen to See for assessing microcirculatory liver blood flow changes following different volumes of hepatectomy. *Microvascular research*. 2017;110:14-23.
200. Wu Y, Ren J, Zhou B, Ding C, Chen J, Wang G, et al. Laser speckle contrast imaging for measurement of hepatic microcirculation during the sepsis: a novel tool for early detection of microcirculation dysfunction. *Microvascular research*. 2015;97:137-46.

201. Daroux M, Prevost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab.* 2010;36(1):1-10.
202. El-Bassossy HM, Dsokey N, Fahmy A. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. *Toxicol Mech Methods.* 2014;24(8):536-43.
203. Lee TW, Kao YH, Lee TI, Chang CJ, Lien GS, Chen YJ. Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. *Int J Cardiol.* 2014;173(2):236-41.
204. Mastrocola R, Collino M, Nigro D, Chiazza F, D'Antona G, Aragno M, et al. Accumulation of advanced glycation end-products and activation of the SCAP/SREBP Lipogenic pathway occur in diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PloS one.* 2015;10(3):e0119587.
205. Mastrocola R, Nigro D, Cento AS, Chiazza F, Collino M, Aragno M. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.* 2016;89:65-75.
206. Mastrocola R, Nigro D, Chiazza F, Medana C, Dal Bello F, Boccuzzi G, et al. Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016;91:224-35.
207. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997;99(3):457-68.
208. Yang DH, Chiang TI, Chang IC, Lin FH, Wei CC, Cheng YW. Increased levels of circulating advanced glycation end-products in menopausal women with osteoporosis. *Int J Med Sci.* 2014;11(5):453-60.
209. Liu Z, Li P, Zhao ZH, Zhang Y, Ma ZM, Wang SX. Vitamin B6 Prevents Endothelial Dysfunction, Insulin Resistance, and Hepatic Lipid Accumulation in Apoe (-/-) Mice Fed with High-Fat Diet. *J Diabetes Res.* 2016;2016:1748065.
210. Metz TO, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):41-9.
211. Maessen DE, Brouwers O, Gaens KH, Wouters K, Cleutjens JP, Janssen BJ, et al. Delayed Intervention With Pyridoxamine Improves Metabolic Function and Prevents Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes.* 2016;65(4):956-66.
212. Gaens KH, Goossens GH, Niessen PM, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Niessen HW, et al. Nepsilon-(carboxymethyl)lysine-receptor for advanced glycation end product axis is a key modulator of obesity-induced dysregulation of adipokine expression and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(6):1199-208.
213. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem.* 1996;271(17):9982-6.
214. Gaens KH, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(1):4-11.
215. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and cellular biology.* 1999;19(8):5495-503.
216. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996;10(9):1096-107.
217. Zhang X, Yang W, Wang J, Meng Y, Guan Y, Yang J. FAM3 gene family: A promising therapeutic target for NAFLD and type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental.* 2018;81:71-82.

218. Kim HH, Kang YR, Lee JY, Chang HB, Lee KW, Apostolidis E, et al. The Postprandial Anti-Hyperglycemic Effect of Pyridoxine and Its Derivatives Using In Vitro and In Vivo Animal Models. *Nutrients*. 2018;10(3).
219. Souza MR, Diniz Mde F, Medeiros-Filho JE, Araujo MS. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*. 2012;49(1):89-96.
220. Takeuchi M, Takino J, Sakasai-Sakai A, Takata T, Ueda T, Tsutsumi M, et al. Involvement of the TAGE-RAGE system in non-alcoholic steatohepatitis: Novel treatment strategies. *World J Hepatol*. 2014;6(12):880-93.
221. Sebekova K, Kupcova V, Schinzel R, Heidland A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis - amelioration by liver transplantation. *J Hepatol*. 2002;36(1):66-71.
222. Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes*. 2012;61(3):549-59.
223. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(15):1671-81.
224. Hagiwara S, Gohda T, Tanimoto M, Ito T, Murakoshi M, Ohara I, et al. Effects of pyridoxamine (K-163) on glucose intolerance and obesity in high-fat diet C57BL/6J mice. *Metabolism: clinical and experimental*. 2009;58(7):934-45.
225. Dainin K, Ide R, Maeda A, Suyama K, Akagawa M. Pyridoxamine scavenges protein carbonyls and inhibits protein aggregation in oxidative stress-induced human HepG2 hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;486(3):845-51.
226. Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J Gastroenterol*. 2010;16(38):4773-83.
227. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
228. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int*. 2002;61(3):939-50.
229. Seifalian AM, Piasecki C, Agarwal A, Davidson BR. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. *Transplantation*. 1999;68(6):780-4.
230. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH, et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes Care*. 2011;34(2):442-7.
231. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascul Pharmacol*. 2012;57(5-6):160-7.
232. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(6):1055-9.
233. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*. 1986;232(4758):1629-32.
234. Li YM, Steffes M, Donnelly T, Liu C, Fuh H, Basgen J, et al. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):3902-7.
235. Wu ET, Liang JT, Wu MS, Chang KC. Pyridoxamine prevents age-related aortic stiffening and vascular resistance in association with reduced collagen glycation. *Exp Gerontol*. 2011;46(6):482-8.
236. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3(4):1473-92.

237. Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat.* 1971;132(4):429-62.
238. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(7):397-411.
239. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247-50.
240. Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology.* 2003;125(1):117-25.
241. Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Seminars in liver disease.* 1999;19(4):397-410.
242. He Y, Zhu J, Huang Y, Gao H, Zhao Y. Advanced glycation end product (AGE)-induced hepatic stellate cell activation via autophagy contributes to hepatitis C-related fibrosis. *Acta Diabetol.* 2015;52(5):959-69.
243. Coman D, Lewindon P, Clayton P, Riney K. PNPO Deficiency and Cirrhosis: Expanding the Clinical Phenotype? *JIMD Rep.* 2016;25:71-5.