



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

**DESEQUILÍBRIO REDOX DEVIDO À PERDA DA
TRANSIDROGENASE - NAD(P) MITOCONDRIAL AGRAVA
DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA INDUZIDA POR DIETA
HIPERLIPÍDICA EM CAMUNDONGOS**

***REDOX IMBALANCE DUE TO THE LOSS OF MITOCHONDRIAL
NAD(P)-TRANSHYDROGENASE AGGRAVATES HIGH FAT DIET-
INDUCED FATTY LIVER DISEASE IN MICE***

CAMPINAS

2017

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

**Desequilíbrio Redox Devido à Perda da Transidrogenase - NAD(P)
Mitochondrial Agrava Doença Hepática Gordurosa Induzida por Dieta
Hiperlipídica em Camundongos**

*Redox Imbalance Due to the Loss of Mitochondrial NAD(P) –
Transhydrogenase Aggravates High Fat Diet-Induced Fatty Liver
Disease in Mice*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Doctorate thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the Ph.D. in Science.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI
COORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA CLAUDIA DANIELE
CARVALHO NAVARRO, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ANIBAL EUGÊNIO
VERCESI.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, PROEX0092045; FAPESP, 11/50400-0

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

N228d Navarro, Cláudia Daniele Carvalho, 1987-
Desequilíbrio redox devido à perda da transidrogenase-NAD(P) mitocondrial agrava doença hepática gordurosa induzida por dieta hiperlipídica em camundongos / Cláudia Daniele Carvalho Navarro. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Anibal Eugênio Vercesi.
Coorientador: Roger Frigério Castilho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fígado gorduroso. 2. Camundongos endogâmicos C57BL. I. Vercesi, Anibal Eugênio, 1946-. II. Castilho, Roger Frigério. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice

Palavras-chave em inglês:

Fatty liver

Mice, Inbred C57BL

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Anibal Eugênio Vercesi [Orientador]

Andrei Carvalho Sposito

Marcelo Alves da Silva Mori

Antonio Galina Filho

Fernanda Marques da Cunha

Data de defesa: 30-10-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

COORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

MEMBROS:

1. PROF. DR. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI

2. PROF. DR. ANTONIO GALINA FILHO

3. PROF. DRA. FERNANDA MARQUES DA CUNHA

4. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

5. PROF. DR. MARCELO ALVES DA SILVA MORI

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 30/10/2017

Dedicatória

Ao meu marido, aos meus pais e família.

Nem todos os livros, pela sua natureza, são próprios para serem oferecidos. Este é, certamente, um daqueles que não se oferece, mas dedicando a vocês só tive em vista compensá-los ao menos um pouco a confiança e o apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Anibal Eugênio Vercesi, meu profundo respeito por me conceder a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, pelas discussões científicas, valiosos aprendizados e contribuição no meu desenvolvimento pessoal e científico.

Ao professor Dr. Roger Frigério Castilho, pela orientação, pela paciência, pelos ensinamentos científicos e didáticos sempre pautados pelo profissionalismo e dedicação à pesquisa de alta qualidade.

À professora Dra. Cecília A. F. Escanhoela, pela colaboração, pela amizade e ensinamentos essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Helena C. F. Oliveira, pelas discussões científicas sempre pertinentes e proveitosas.

Ao meu marido, Eduardo G. de Castro, que sempre está ao meu lado, me motivando e apoiando nos momentos de dificuldade e vibrando por mim nos momentos de conquistas. Sou sempre grata à sua dedicação e cuidado comigo. Você me incentiva a ser uma pessoa melhor. Amo você!

Aos meus pais e irmãs, que mesmo apesar da distância, vibram a cada conquista minha e me incentivam a ir além.

Aos amigos do laboratório Marcia Fagian, Roberto Stahl, Edilene Santos, Genoefa Dal'Bo, Juliana Ruas, Annelise Francisco, Kézia de Moura, Estela Busanello, Érika Rodrigues, Ana Carolina Marques, Tiago Figueira, Raffaella Ignarro, Gustavo Facchini, Evellyne Figueiroa, Guilherme Michelini, Juliana Ronchi, Paolo La Guardia (*in memoriam*), Hanan Chweih, Mayara Bertolini, Noelia Lander, Miguel Chiurillo e Marina Sartori, cuja companhia e amizade de vocês tornaram meus dias mais alegres. Pelas palavras de apoio nos momentos cruciais e pelas conquistas compartilhadas com cada um de vocês. Em especial ao Tiago Figueira, que muito contribuiu na execução desse trabalho desde o delineamento experimental até no auxílio da análise dos mesmos, sempre com proveitosas discussões científicas.

Aos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

de Nível Superior (CAPES – bolsa Projeto PROEX0092045 – UNICAMP – Fisiopatologia Médica), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 11/50400-0 e 13/07607-8) e Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa e Extensão da UNICAMP (FAEPEX).

E ainda que eu tivesse o dom da profecia e
conhecesse todos os mistérios e toda a ciência
e tivesse toda a fé e não tivesse amor, nada seria...

(I Coríntios 13:2)

RESUMO

Os mecanismos pelos quais a dieta hiperlipídica (HFD) promove a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) parecem envolver disfunções mitocondriais hepáticas e desequilíbrio redox. Nós trabalhamos com a hipótese de que a HFD aumentaria a dependência mitocondrial da transidrogenase NAD(P) como fonte de NADPH para sistemas antioxidantes, os quais neutralizam o desenvolvimento da DHGNA. Desta forma, estudamos as disfunções mitocondriais hepáticas induzidas por HFD e DHGNA em camundongos congênicos (C57Unib.B6) na presença ($Nnt^{+/+}$) e ausência ($Nnt^{-/-}$) da atividade da NNT; o alelo mutado espontaneamente ($Nnt^{-/-}$) foi adquirido a partir da linhagem de camundongos C57BL/6J. Após 20 semanas de HFD, camundongos $Nnt^{-/-}$ exibiram maior prevalência de esteatohepatite e conteúdo de triglicérides hepático comparado aos camundongos $Nnt^{+/+}$ mantidos na mesma dieta. Sob HFD, o fenótipo de DHGNA agravado em camundongos $Nnt^{-/-}$ foi acompanhado por uma taxa de liberação de H_2O_2 mitocondrial aumentada, diminuição da atividade da aconitase (enzima mitocondrial redox-sensível) e maior susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} . Além disto, HFD levou a fosforilação (inibição) da piruvato desidrogenase (PDH) e fortemente reduziu a capacidade de mitocôndrias hepáticas removerem peróxido em camundongos $Nnt^{-/-}$. A reativação da PDH na presença do ADP ou do dicloroacetato (ativação farmacológica) reestabeleceu a capacidade de remoção de peróxido das mitocôndrias dos camundongos $Nnt^{-/-}$ sob HFD. Notoriamente, em comparação com camundongos alimentados com dieta padrão, a HFD não prejudicou a remoção de peróxido, nem provocou desequilíbrio redox nas mitocôndrias de camundongos $Nnt^{+/+}$. Sendo assim, a HFD interagiu com a mutação em *Nnt* para gerar inibição de PDH e também supressão da remoção de peróxido. Concluímos que a NNT desempenha papel crítico na neutralização do desequilíbrio redox mitocondrial, inibição de PDH e progressão da DHGNA em camundongos sob HFD. O presente estudo fornece evidência experimental de que o desequilíbrio redox em mitocôndrias hepáticas potencializa a progressão da esteatose para esteatohepatite sob HFD.

Palavras chave: esteatose hepática, esteatohepatite, piruvato desidrogenase, camundongos C57BL/6J.

ABSTRACT

The mechanisms by which a high fat diet (HFD) promotes nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) appear to involve liver mitochondrial dysfunctions and redox imbalance. We hypothesized that a HFD would increase mitochondrial reliance on NAD(P)-transhydrogenase (NNT) as the source of NADPH for antioxidant systems that counteract NAFLD development. Therefore, we studied HFD-induced liver mitochondrial dysfunctions and NAFLD in C57Unib.B6 congenic mice with (*Nnt*^{+/+}) or without (*Nnt*^{-/-}) NNT activity; the spontaneously mutated allele (*Nnt*^{-/-}) was inherited from the C57BL/6J mouse substrain. After 20 weeks on a HFD, *Nnt*^{-/-} mice exhibited a higher prevalence of steatohepatitis and content of liver triglycerides compared to *Nnt*^{+/+} mice on an identical diet. Under a HFD, the aggravated NAFLD phenotype in the *Nnt*^{-/-} mice was accompanied by an increased H₂O₂ release rate from mitochondria, decreased aconitase activity (a redox-sensitive mitochondrial enzyme) and higher susceptibility to Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. In addition, HFD led to the phosphorylation (inhibition) of pyruvate dehydrogenase (PDH) and markedly reduced the ability of liver mitochondria to remove peroxide in *Nnt*^{-/-} mice. Reactivation of PDH in the presence of ADP or dichloroacetate (pharmacological activation) restored the peroxide removal capability of mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD. Noteworthy, compared to mice that were chow-fed, the HFD did not impair peroxide removal nor elicit redox imbalance in mitochondria from *Nnt*^{+/+} mice. Therefore, HFD interacted with *Nnt* mutation to generate PDH inhibition and further suppression of peroxide removal. We conclude that NNT plays a critical role in counteracting mitochondrial redox imbalance, PDH inhibition and advancement of NAFLD in mice fed a HFD. The present study provide seminal experimental evidence that redox imbalance in liver mitochondria potentiates the progression from simple steatosis to steatohepatitis following a HFD.

Keywords: liver steatosis, steatohepatitis, pyruvate dehydrogenase, C57BL/6J mouse.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

ADP - Adenosina difosfato

CuZnSOD - Superóxido dismutase dependente de cobre-zinco

DFG - Deficiência familiar de glicocorticóide

DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica

DMC - Dieta deficiente em metionina e colina

EHNA - Esteatohepatite não alcoólica

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GDH - Glutamato desidrogenase

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG - Glutathione oxidada

HFD - dieta hiperlipídica

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IDH2 - Isocitrato desidrogenase 2

MMI - Membrana mitocondrial interna

MnSOD - Superóxido dismutase dependente de manganês

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADP-ME - Enzima málica dependente de NADP

NNT - Transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida

Nnt - Gene que codifica para a enzima NNT

O₂^{•-} - Radical ânion superóxido

PDH - Piruvato desidrogenase

Prx - Peroxiredoxina

PTP - Poro de transição de permeabilidade

t-BOOH – Tert-butil hidroperóxido

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	14
1.2 – Patogênese da DHGNA.....	17
1.3 – Camundongos como modelos para avaliação de DHGNA.....	19
1.4 – Fontes e metabolismo mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	25
1.5 – Transidrogenase de Nucleotídeos de Nicotinamida (NNT).....	30
1.6 – Camundongos C57BL/6J e NNT.....	34
2 – OBJETIVOS	36
3 – RESULTADOS	37
3.1 – Artigo: “Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice.....	38
3.2 – Material suplementar.....	51
4 – DISCUSSÃO / CONCLUSÕES	57
5 – REFERÊNCIAS	67
6 – ANEXO I: Parecer de aprovação do Comitê de Ética	83
ANEXO II: Autorização do “Copyright”	84

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A partir da década de 1980, alterações morfológicas hepáticas relacionadas à esteatose, porém com etiologias diversas, excetuando o consumo de álcool foram englobadas sob a denominação de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A doença hepática gordurosa não alcoólica, termo clínico-patológico, é atualmente uma das causas mais comuns de disfunção hepática (Rinella, 2015). A terminologia “não-alcoólica” deve-se ao fato de que as alterações observadas não estão associadas ao consumo de álcool, no entanto, é importante ressaltar que é pouco distinguível, morfológicamente, daquelas induzidas pelo álcool (Sakhuja, 2014), sendo a avaliação das diferentes origens baseada principalmente em argumentos clínicos e bioquímicos.

A prevalência da DHGNA aproxima de 20%, considerando-se a população geral. Entre pacientes portadores de diabetes *mellitus* II, a prevalência pode atingir até 70% (Cornier et al., 2008) e ao se analisar somente pacientes obesos, este índice pode exceder 90% (Haentjens et al., 2009; Vernon et al., 2011). A associação entre DHGNA, obesidade e diabetes *mellitus* II ou resistência à insulina ainda se apresenta como objeto de amplo estudo. Já é evidente que a prevalência da DHGNA esteja diretamente relacionada à prevalência da obesidade e que ambos os processos estejam intimamente ligados à resistência à insulina (Tiniakos et al., 2010). Baseado nestes dados, e também em estudos recentemente publicados, pode-se sugerir que o desenvolvimento da DHGNA esteja diretamente relacionado a múltiplos fatores de risco, tais como: obesidade (Wong e Ahmed, 2014), resistência à insulina ou diabetes *mellitus* II (Portillo-Sanchez et al., 2015; Ande et al., 2016) dislipidemia (Chalasanani et al., 2012) e doenças cardiovasculares (Pacífico et al., 2010; Kozakova et al., 2012). Estes dados favorecem a hipótese que a DHGNA esteja intimamente ligada à síndrome metabólica, caracterizada por obesidade, triglicérides elevados, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e hipertensão arterial (Ratziu et al., 2010; Lonardo et al., 2015).

Histologicamente, a DHGNA engloba amplo espectro de alterações morfológicas. As alterações observadas na DHGNA variam desde esteatose simples (Chalasanani et al., 2012), até formas mais graves de hepatopatias, tais como: esteatohepatite, fibrose e cirrose, podendo culminar com o carcinoma hepatocelular.

A esteatose simples é a doença hepática mais comum no mundo (Vetelainen et al., 2007) e pode ser definida como o acúmulo anormal de triglicérides nos hepatócitos. Morfológicamente, a esteatose hepática se manifesta através da deposição de gotículas intracitoplasmáticas de lipídeos nas células hepáticas. A deposição pode ser caracterizada de duas formas distintas. A esteatose macrovesicular é caracterizada pela distensão do hepatócito por um único e volumoso vacúolo acompanhado de deslocamento nuclear perifericamente, já na esteatose microvesicular podem ser visualizados numerosos vacúolos, os quais se apresentam menos volumosos e a localização do núcleo se mantém central (Day e James, 1998; Reddy e Rao, 2006; Takahashi et al., 2012). A presença de esteatose macrovesicular é um dos achados mais característicos da doença esteatótica hepática (Takahashi et al., 2012) e traduz alterações no metabolismo de lipídios, relacionado com maior aporte a partir de depósitos periféricos, síntese aumentada e dificuldade na exportação e/ou oxidação do ácido graxo. Já a ocorrência de esteatose microvesicular é relacionada com alterações no processo de β -oxidação mitocondrial, com consequente acúmulo de ácidos graxos na forma de triglicérides e formação de pequenas gotículas no citosol dos hepatócitos (Natarajan e Eapen, 2006). Devido à reduzida capacidade regenerativa e consequentemente sua alta capacidade de progressão, a esteatose microvesicular apresenta danos mais severos e está diretamente relacionada a um pior prognóstico (Reddy e Rao, 2006; Ong e Younossi, 2007).

A esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que representa uma complicação e um estágio evolutivo da DHGNA, é definida pela associação da esteatose com outras injúrias hepatocelulares, tais como balonização e inflamação lobular (Chalasanani et al., 2012). Assim como em outras formas de doenças hepáticas crônicas, a fibrose não é necessariamente requerida para o diagnóstico de EHNA. Já a balonização, condição fundamental para o diagnóstico de esteatohepatite (Caldwell e Argo, 2010), reflete alteração da permeabilidade da membrana dos hepatócitos e é diretamente relacionada ao risco de progressão, resultando em fibrose. Hepatócitos balonizados são amplos, com citoplasma claro; estão predominantemente localizados na zona 3 acinar e são frequentemente associados com fibrose perissinusoidal. Alterações na organização do citoesqueleto podem também estar presentes, formando os chamados corpúsculos de *Mallory* (Tiniakos et al., 2010). A inflamação lobular, normalmente moderada, consiste em pequenos focos de infiltração inflamatória, sendo geralmente mista, ou seja, contém linfócitos, macrófagos e neutrófilos: os neutrófilos tendem a infiltrar áreas acometidas por esteatose e/ou ao redor dos corpúsculos de *Mallory*; a inflamação portal é frequentemente

leve, no entanto, pode se caracterizar relativamente intensa em situações de inflamação crônica (Takahashi et al., 2012). A intensidade da infiltração inflamatória varia conforme a gravidade da esteatohepatite.

A fibrose hepática é considerada processo secundário a uma resposta de cicatrização de lesão crônica do fígado (Jiao et al., 2009). Trata-se de processo dinâmico e contínuo de remodelagem de matriz extracelular num quadro de injúria hepática, e seu desenvolvimento está diretamente associado com estresse oxidativo, aumento de TGF- β 1 (fator de transformação de crescimento- β 1), morte de hepatócitos e inflamação crônica (Brenner, 2009). A morte de hepatócitos devido a lesões hepáticas mobiliza linfócitos, plaquetas e macrófagos, incluindo células de Kupffer, formando um infiltrado inflamatório que produz TGF- β 1 e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), os quais estão diretamente relacionados à ativação das células estreladas do fígado (Friedman, 2003). As células estreladas hepáticas situam-se no espaço de Disse e quando ativadas são convertidas de uma forma quiescente estocadora de vitamina A para uma forma proliferativa, inflamatória e produtora de matriz extracelular: miofibroblasto (Friedman, 2003). Este evento é um ponto chave do processo, pois é o acúmulo de matriz extracelular que caracteriza fibrose hepática (Forbes e Parola, 2011). Quando a lesão é aguda, as mudanças na arquitetura hepática são transitórias e sua composição normal é restaurada (Lee e Friedman, 2011). Porém, nos casos das doenças crônicas hepáticas, o dano contínuo acarreta em estímulo constante ao processo de regeneração hepatocelular, acúmulo persistente da matriz extracelular e a progressiva substituição do parênquima hepático, o que resulta em cirrose (Friedman, 2008). Ao final, o grande componente complicador da evolução da doença hepática é a fibrose, a qual frequentemente possui sua origem na região perissinusoidal da zona 3 (fibrose perissinusoidal) e pode também estar presente na região periportal (Ibrahim et al., 2016). A sua presença prevê tanto progressão, quanto desenvolvimento de complicações relacionadas, tais como hipertensão portal, insuficiência hepática e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Dowman et al., 2010).

Na prática clínica, o diagnóstico de DHGNA é geralmente sugerido pela presença de enzimas hepáticas, principalmente alanina transaminase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT) elevadas. O exame da ALT é um teste disponível e barato para a triagem, o qual, em pacientes com DHGNA, pode apresentar valores superiores ao limite normal (1,5 a 2 vezes). No entanto, um ponto questionável na utilização destes marcadores para a detecção de doenças hepáticas é o fato de que frequentemente são observados pacientes com DHGNA e EHNA com níveis normais destas enzimas (Della Corte et al.,

2012; Berardis et al., 2014). Mediante tal fato, tem sido sugerida a realização de biópsia hepática como padrão ouro para o diagnóstico definitivo, sendo este o único exame capaz de avaliar a gravidade da DHGNA e o grau de fibrose.

1.2 – Patogênese da DHGNA

Inicialmente, Day e James (1998) propuseram a hipótese “*two-hit*” para a patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica. De acordo com esta teoria, o surgimento da esteatose representaria o primeiro “*hit*”, que aumentaria a vulnerabilidade do fígado para diferentes segundos “*hits*”, tais como citocinas inflamatórias, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, os quais conduziriam, por sua vez, à inflamação, danos hepáticos, fibrose e morte celular, características da EHNA (Day e James, 1998; Day, 2006). Baseado nesta teoria, o acúmulo de triglicérides se faz necessário para o desenvolvimento de EHNA. No entanto, alguns dados na literatura apontam que este acúmulo pode representar um papel protetor contra a lipotoxicidade, a qual é induzida por ácidos graxos livres e metabólitos derivados tais como diacilgliceróis, acilcarnitinas ou ceramidas, através do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também pela ativação de vias inflamatórias (Feldstein et al., 2004). Além disso, ainda não está claro se o desenvolvimento da EHNA ocorre sequencialmente mediante ao acúmulo de gordura hepática ou se o mesmo se dá em resposta à condição de lipotoxicidade.

Recentemente foi proposta a hipótese multiparalela (Tilg e Moschen, 2010). Esta teoria sugere que a EHNA resultaria de numerosas condições que atuariam em paralelo, incluindo predisposição genética, metabolismo lipídico anormal, estresse oxidativo, lipotoxicidade, disfunção mitocondrial, produção alterada de citocinas, disbiose intestinal e estresse de retículo endoplasmático. De acordo com esta hipótese, a inflamação hepática em EHNA poderia até preceder a esteatose.

À medida que mais fatores contribuintes são identificados continuamente, surge uma imagem mais complexa da patogênese de EHNA. E embora a patogênese de DHGNA/EHNA ainda não seja compreendida, vários estudos têm implicado a disfunção mitocondrial na etiologia das alterações metabólicas e morfológicas que ocorrem no fígado em resposta à dieta hiperlipídica (Kakimoto et al., 2014; Ribas et al., 2014; Satapati et al., 2015; Schroder et al., 2016).

A relação causa-consequência entre disfunção mitocondrial e DHGNA/EHNA ainda não se apresenta completamente compreendida (Begrache et al., 2013; Kakimoto et

al., 2014; Satapati et al., 2015). No entanto, estudos sugerem que o desequilíbrio no balanço redox é um importante evento envolvido na progressão da esteatose para esteatohepatite não alcoólica (Begriche et al., 2013; Spahis et al., 2016). Este desequilíbrio redox está diretamente relacionado à maior produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Eccleston et al., 2011). A ação das EROs sobre as duplas ligações de lipídios poli-insaturados (PUFAs) resulta em peroxidação lipídica. A subsequente formação de componentes de aldeído extremamente reativos, nomeadamente 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA), causam danos intracelulares. O aumento no conteúdo de biomarcadores circulantes de peroxidação lipídica foi observado em pacientes com DHGNA/EHNA (Nobili et al., 2010; Irie et al., 2012; Pirgon et al., 2013) e suas altas concentrações estão associadas à intensidade da doença hepática (Liu et al., 2011). Concomitantemente, observou-se declínio de componentes antioxidantes, tais como catalase, glutathiona (GSH), Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) e coenzima Q (CoQ) (Videla et al., 2004; Erhardt et al., 2011). Além dos danos lipídicos, também foi observada a intensificação dos níveis hepáticos de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), um marcador de dano ao DNA de origem oxidativa, em pacientes com DHGNA/EHNA (Fujita et al., 2009).

Mediante ampla literatura que aponta o estresse oxidativo como mecanismo central na progressão da DHGNA, pesquisadores têm investido em tratamentos com antioxidantes como possível atenuador dos efeitos maléficos das EROs no desenvolvimento da EHNA. Em estudo clínico com 10 indivíduos com DHGNA e 10 indivíduos com EHNA, Hasegawa e colaboradores (2001) observaram que após um ano de tratamento com α -tocoferol (vitamina E), numa dose de 300 UI/dia, somente os pacientes com esteatohepatite apresentaram significativa melhora nas transaminases séricas (aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT)), acompanhada de menor grau histológico de inflamação e fibrose hepática. Em outro estudo foram avaliados 247 adultos com EHNA, os quais receberam tratamento com placebo, pioglitazona (30mg/dia) ou vitamina E (de 800 UI/dia) por um período 96 semanas. Analisando os resultados e comparando a terapia com vitamina E com tratamento placebo, foi observada melhora nas características histológicas (43% - inflamação lobular) e resolução significativa da EHNA (47%). Neste estudo também foi observada redução nos níveis séricos das transaminases AST e ALT (Sanyal et al., 2010). Em estudo mais recente (TONIC estudo), os efeitos da vitamina E, metformina e placebo foram avaliados em 173 crianças com DHGNA. Após um período de 96

semanas, o tratamento com vitamina E também resultou em melhora histológica e resolução da EHNA (Corey et al., 2015). No geral, as descobertas de ensaios clínicos em humanos têm demonstrado papel importante da utilização de antioxidantes na involução da EHNA, no entanto, deve ser dada atenção às concentrações prejudiciais de vitamina E relatadas em vários estudos (Miller et al., 2005; Albanes et al., 2014). Diante de tal fato, a opção terapêutica da vitamina E na esteatose hepática deve ser investigada com maior rigor.

1.3 – Camundongos como modelos para avaliação de DHGNA

Estudos de DHGNA/EHNA utilizando biópsias hepáticas de humanos possuem limitações, pois sua ocorrência e progressão requerem longo período de várias décadas, além das implicações éticas relacionadas à administração de drogas a pacientes ou coleta de tecido hepático dos mesmos. Diante de tal fato, modelos animais de DHGNA/EHNA são métodos cruciais não somente para a elucidação da patogênese da DHGNA/EHNA, mas também para a avaliação de possíveis alvos terapêuticos. Estes modelos animais precisam refletir corretamente tanto a histopatologia quanto a patofisiologia da doença hepática gordurosa não alcoólica em humanos. Adequadamente, o fígado deste modelo animal de EHNA deve apresentar esteatose (macrovesicular e/ou microvesicular), inflamação intralobular, balonização hepatocelular e, idealmente, fibrose perissinusoidal na zona 3 e susceptibilidade a carcinoma hepático. Além disto, o animal também deve apresentar anormalidades metabólicas tais como obesidade, resistência à insulina e dislipidemia. Modelos animais de DHGNA/EHNA são classificados quanto ao perfil genético, nutricional e à combinação dos fatores genéticos e nutricionais.

Grande variedade de camundongos geneticamente modificados tem sido desenvolvida para uma melhor compreensão da EHNA. Atualmente, maior parte destes animais possuem alterações genéticas, das quais resultam em acúmulo significativo de lipídios hepáticos, sem apresentarem inflamação e fibrose. Para tanto, se faz necessário um estímulo adicional, como a dieta modificada, frequentemente requerida para induzir características histopatológicas de EHNA.

Camundongos ob/ob não possuem leptina funcional devido a uma mutação pontual espontânea no gene da leptina. A leptina é um hormônio peptídico o qual é secretado predominantemente pelo tecido adiposo branco e seu papel está relacionado à

regulação negativa da ingestão alimentar e aumento de gasto energético. Camundongos *ob/ob* são hiperfágicos, inativos e desenvolvem obesidade severa, hiperlipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina (Bray, 1979). Camundongos *ob/ob* desenvolvem espontaneamente esteatose hepática (Diehl, 2005), no entanto, raramente desenvolvem danos hepáticos severos ou EHNA espontaneamente. Para a indução de EHNA, é necessário um estímulo adicional, sendo este representado pela administração de pequenas doses de lipopolissacarídeo (endotoxina), dieta rica em gordura, ou dieta deficiente em metionina e colina (DMC) (Yang et al., 1997; Brix et al., 2002). Outra característica destes camundongos é que estes são protegidos no que se refere ao desenvolvimento da fibrose, sendo a mesma induzida através da suplementação exógena de leptina nestes animais (Leclercq et al., 2002). Este fenômeno sugere a caracterização da leptina como um mediador fibrogênico hepático (Ikejima et al., 2001; Leclercq et al., 2002). A utilização destes animais para a avaliação de EHNA traz controvérsias, pois a mutação do gene *ob* não é prevalente em pessoas obesas ou pacientes com EHNA, e os níveis de leptina são muito pouco correlacionados com o desenvolvimento de EHNA.

Camundongos *db/db* possuem mutação espontânea para o gene do receptor de leptina (*Ob-Rb*), e, embora, apresentem níveis normais ou elevados de leptina, a mutação no receptor confere resistência aos seus efeitos. Como previsto, o fenótipo destes animais é similar aos camundongos *ob/ob*, ou seja, são hiperfágicos e desenvolvem obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e esteatose hepática (Hummel et al., 1966). Assim como nos camundongos *ob/ob*, para a progressão da esteatose para EHNA nos animais *db/db*, se faz necessário um estímulo secundário, como por exemplo, a dieta DMC (Wortham et al., 2008). Em contraste com os camundongos *ob/ob*, camundongos *db/db* sob dieta DMC desenvolvem fibrose (Sahai et al., 2004).

A proteína de ligação a um elemento regulador de estero1 (SREB-1c), é uma das duas variáveis de transcrição codificadas pelo SREBP-1. SREB-1c é um fator de transcrição sensível à insulina que promove a regulação dos genes necessários para o metabolismo da glicose e a produção de ácidos graxos e lipídios. Camundongos transgênicos SREB-1c, que superexpressam SREB-1c seletivamente no tecido adiposo, possuem diferenciação adiposa prejudicada desenvolvendo resistência à insulina e também esteatose hepática (Shimomura et al., 1998). Além da esteatose, estes animais também desenvolvem espontaneamente inflamação lobular, fibrose pericelular e balonização hepatocelular (Nakayama et al., 2007). Embora histologicamente o fígado deste animal reproduza muitas características da EHNA em humanos, este modelo de camundongo

apresenta redução da massa de tecido adiposo, o que este fortemente em contraste com a condição humana.

A mutação heterozigótica do gene *agouti* (*KK-Ay/a*) resulta em perda de melanocortina e um fenótipo obeso devido à hiperfagia mediante ao prejuízo da supressão hipotalâmica da ingesta alimentar (Schattenberg e Galle, 2010). Camundongos *KK-A^y* desenvolvem esteatose hepática associada com obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina (Okumura et al., 2006). O fígado esteaótico destes camundongos não progride espontaneamente para EHNA, no entanto pode ser induzido através de estímulo adicional, como dieta DMC (Okumura et al., 2006).

Fosfatase homóloga à tensina (PTEN) é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfatase lipídica cujo principal substrato é o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). PTEN regula negativamente uma variedade de vias de sinalização incluindo a fosfatidilinositol 3-quinase e a proteína quinase serina/treonina (Akt) (Stiles et al., 2004). Estas vias estão relacionadas à regulação da apoptose, proliferação celular e formação tumoral (Stiles et al., 2004). Camundongos deficientes para *Pten*, especificamente no tecido hepático, apresentam extensiva hepatomegalia acompanhada de esteatose (Sato et al., 2006), a qual em grande parte dos camundongos evolui a um quadro de esteatohepatite caracterizada pela balonização hepatocelular, presença de corpúsculo de *Mallory*, inflamação lobular e leve fibrose pericelular. É também importante citar que camundongos deficientes para *Pten* eventualmente desenvolvem carcinoma hepatocelular (Horie et al., 2004) e que também apresentam um quadro de hipersensibilidade à insulina. As vantagens deste modelo é que o fenótipo histológico se assemelha ao da EHNA em humanos.

Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (*PPAR α*) são fatores de transcrição de uma família de receptores nucleares envolvidos na oxidação mitocondrial e peroxissomal dos ácidos graxos. Dados da literatura apontam que sob dieta hiperlipídica os receptores *PPAR α* se apresentam significativamente diminuídos (Svegliati-Baroni et al., 2006). Camundongos deficientes para o receptor *PPAR α* , no estado alimentado, não acumulam excesso de ácidos graxos hepáticos, porém quando sujeitos ao jejum (24 horas) ou à dieta hiperlipídica, estes animais desenvolvem severa esteatose (Kersten et al., 1999, Leone et al., 1999). A literatura relaciona o desenvolvimento da esteatose com a inibição da oxidação de ácidos graxos observada neste modelo animal sob jejum ou dieta hiperlipídica (Kersten et al., 1999, Leone et al., 1999). O aumento do influxo de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado, induzido pela privação alimentar ou dieta hiperlipídica, promove superegulação da oxidação de ácidos graxos, porém devido à

deficiência dos receptores PPAR α neste modelo animal esta regulação não é observada. É importante também notar que apesar de desenvolverem severa esteatose, animais deficientes PPAR α não desenvolvem EHNA.

Acil-CoA oxidase (AOX) é uma enzima que catalisa os primeiros passos e os passos determinantes da beta-oxidação peroxissômica dos ácidos graxos. Desta forma, o fígado de camundongos deficientes para AOX exibem diminuída oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, e o acúmulo destes nos hepatócitos. Este conjunto acarreta em esteatose microvesicular, a qual possui característica de transitoriedade na evolução para EHNA sem fibrose (Cook et al., 2001, Fan et al., 1998, Fan et al., 1996). Este quadro transitório (camundongos com 6-7 meses de idade) está relacionado a uma resposta compensatória da oxidação de ácidos graxos, a qual se apresenta aumentada, e mediante a isto, a esteatose hepática é completamente revertida através da regeneração do hepatócito, que exhibe proliferação de peroxissoma espontânea e alta expressão de genes alvo PPAR (London e George, 2007, Fan et al., 1996). Porém a ativação sustentada da PPAR α em camundongos deficientes para AOX (camundongos com 15 meses de idade) é relacionada ao desenvolvimento de adenoma e carcinoma hepatocelular (London e George, 2007, Fan et al., 1998).

A metionina adenosil transferase (MAT1A) é uma enzima fígado-específica que catalisa a conversão da metionina para S-adenosil metionina, principal doador biológico de metilo. Camundongos deficientes para MAT1A apresentam menor conteúdo hepático de S-adenosil metionina e glutatona, e maior expressão de genes envolvidos no processo de peroxidação lipídica (Martinez-Chantar et al., 2002). Estes animais desenvolvem espontaneamente EHNA, a qual é caracterizada por esteatose macrovesicular e infiltração de células inflamatórias principalmente na área periportal, no entanto não possuem características de síndrome metabólica como, por exemplo, obesidade e hiperinsulinemia (Martinez-Chantar et al., 2002, Lu et al 2001). Dieta deficiente em colina promove severa esteatose macrovesicular em camundongos deficientes para MAT1A. A deleção de MAT1A também é associada ao aumento da proliferação de hepatócitos resultando, eventualmente, em carcinoma hepatocelular (Martinez-Chantar et al., 2002).

Conforme descrito nos parágrafos anteriores, pode ser observado um grande número de modelos animais utilizados para o estudo da esteatose hepática e esteatohepatite não alcoólica. Essa ampla variedade de modelos traz diferentes graus de fidelidade do perfil metabólico e também das características histológicas padronizadas em humanos. Recentemente, modelos baseados em diferentes tipos de dieta têm demonstrado substancial

similaridade metabólica ao paciente com DHGNA e EHNA, e, aliado a isso, grande reprodutibilidade às características histológicas da EHNA. Nos próximos parágrafos serão citadas as principais dietas utilizadas para avaliação de síndrome metabólica e desenvolvimento/progressão da DHGNA/EHNA. É importante citar que a severidade da EHNA induzida por diferentes dietas pode ser dependente da espécie (ratos parecem ser mais sensíveis que camundongos) (Lieber et al., 2004), gênero (machos parecem ser mais sensíveis que fêmeas) (Hewitt et al., 2004) e linhagem do animal (camundongos C57BL/6J são mais susceptíveis a doenças metabólicas e EHNA) (Newberry et al., 2015, Vitali et al., 2012, Poussin et al., 2011, Nicholson et al., 2010).

Camundongos da linhagem C57BL/6J constituem um dos modelos animais mais utilizados mundialmente em pesquisa de obesidade induzida por dieta, resistência à insulina e DHGNA (Buettner et al., 2007; Poussin et al., 2011; Kakimoto e Kowaltowski, 2016), sendo este o *background* do animal utilizado no presente trabalho, os resultados discutidos nos próximos parágrafos terão como principal foco os camundongos da linhagem C57BL/6J.

A dieta deficiente em metionina e colina (DMC) é amplamente empregada em estudos de EHNA induzida por dieta em animais. A dieta DMC possui alto conteúdo de sacarose e gordura (40% e 10%, respectivamente), e é deficiente em metionina e colina, que são essenciais para a β -oxidação hepática e produção de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) (Anstee e Goldin, 2006). Além disso, a deficiência em colina prejudica a secreção hepática de VLDL (Yao e Vance, 1990), resultando em maior acúmulo de gordura no fígado e menor síntese de VLDL. Por outro lado, estresse oxidativo (Leclercq et al., 2000) e alterações nas citocinas e adipocinas (Larter et al., 2008) ocorrem neste modelo de dieta, culminando à injúria hepática. A principal vantagem da dieta DMC é sua ampla reprodutibilidade ao fenótipo histológico de EHNA observada em humanos, dentro de um período relativamente pequeno, quando comparada a outros modelos de dieta. Estudos utilizando camundongos com o *background* da linhagem C57/BL6J demonstram que as evidências histológicas de EHNA podem ser observadas após o 10º dia de dieta (Dela Pena et al., 2005), enquanto que a fibrose perissinusoidal é observada a partir da 8 - 10ª semana de dieta DMC (Leclercq et al., 2000; IpE et al., 2004). Apesar deste modelo de dieta reproduzir características histológicas da EHNA e fibrose observadas em humanos com EHNA, no contexto metabólico, estas características diferem daquelas observadas em pacientes. Animais sob dieta DMC possuem perda de peso (mais de 40% em 10 semanas), baixo teor de açúcar sanguíneo, sensibilidade periférica à insulina

e baixos níveis de insulina e leptina circulantes (Rinella e Green, 2004; Larter et al., 2008). Também pode ser observada diminuição de triglicérides e colesterol circulantes, criando um perfil metabólico contrário ao que é observado em humanos. Portanto, a dieta DMC está longe de ser ideal para examinar os parâmetros metabólicos da EHNA.

A composição da dieta aterogênica consiste em 1.25% de colesterol e 0.5% de colato. Estudos na linhagem C57BL/6J mostram que o componente colesterol da dieta é um importante fator de risco para a progressão da inflamação hepática e o colato está diretamente relacionado ao processo de fibrogênese (Vergnes et al., 2003). Nesta linhagem de camundongos, a dieta aterogênica induz progressiva esteatose, inflamação e fibrose tempo-dependente em um período de 6 – 24 semanas (Matsuzawa et al., 2007). A balonização hepatocelular, característica humana de EHNA, também pode ser observada após 24 semanas de dieta. A adição de 60% de gordura (proveniente da manteiga de cacau) à dieta acelerou o desenvolvimento das características histopatológicas da EHNA, as quais puderam ser observadas após 12 semanas de dieta aterogênica. Além disto, a dieta aterogênica induz estresse oxidativo, dislipidemia, peroxidação lipídica e ativação de células estreladas no fígado. No entanto, camundongos sob esta dieta são sensíveis à insulina, mesmo apresentando resistência hepática à insulina. É também importante citar que estes camundongos sob dieta aterogênica apresentam perda significativa de peso corporal e menor massa do tecido adiposo epididimal (Matsuzawa et al., 2007). Embora, a dieta aterogênica replique a patologia da doença humana, algumas alterações metabólicas diferem daquelas observadas na EHNA humana.

A primeira descrição da dieta hiperlipídica como modelo nutricional para indução de DHGNA foi proposta por Lieber e colaboradores (2004). Este estudo utilizou uma dieta líquida onde 71% da energia derivou de gordura (óleo de milho), 11% de carboidrato e 18% de proteína e após 3 semanas de dieta, ratos (Sprague-Dawley), apresentaram esteatose macrovesicular e o conteúdo hepático de lipídios era aproximadamente o dobro quando comparado aos ratos alimentados com dieta padrão (dieta Lieber-DeCarli, 35% gordura, 47% carboidrato e 18% proteína). Porém, diante destes resultados, Buettner e colaboradores (2007) acreditam que mais de 60% da caloria adquirida na dieta ser proveniente de gordura traz resultados duvidosos quando comparados à dieta humana. Baseando nestes argumentos, paralelamente Ito e colaboradores (2007) utilizaram dieta hiperlipídica (60% gordura (*lard*), 20% carboidrato e 20% proteína) e puderam observar que camundongos machos da linhagem C57BL/6J apresentavam um quadro de esteatose hepática após um período de 10 semanas de dieta.

Apesar da presença da esteatose, a inflamação hepática não foi observada antes de 19 semanas de dieta hiperlipídica. Existe uma ampla variedade de estudos utilizando a dieta hiperlipídica no desenvolvimento de esteatose/esteatohepatite em modelos animais. No entanto, uma importante crítica ao tratamento com dieta hiperlipídica é a dificuldade de comparar estudos devido à grande variabilidade do conteúdo lipídico da dieta, fonte de gordura (óleo de coco, peixe, milho, soja e etc), tipo de gordura (ômega 3 e 6, ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e polinsaturados) e tempo de tratamento (Kakimoto et al., 2016).

O excesso no consumo de xarope de milho de alta frutose, por exemplo, refrigerantes, é uma característica típica da dieta de pacientes com EHNA (Abdelmalek et al., 2010). A adição de um componente de alta frutose à dieta rica em gordura saturada tem sido frequentemente empregada para reproduzir todas as características da EHNA em modelos animais. No estudo de Tetri e colaboradores (2008), camundongos da linhagem C57BL/6J foram submetidos por um período de 16 semanas à dieta hiperlipídica (45%) aliada ao consumo de alta frutose (55%) em água. Após o período de 16 semanas, observou-se nestes animais um quadro de obesidade aliado à resistência a insulina e severa esteatose hepática associada ao desenvolvimento de alterações necroinflamatórias. É importante citar que apesar destes animais apresentarem alguns marcadores moleculares de fibrogênese (mRNA de pró-colágeno α_1), a fibrose ainda não pode ser histologicamente diagnosticada. Charlton e colaboradores (2011), com intuito de melhor representar a dieta observada em pacientes com EHNA, ofereceu a camundongos C57BL/6J um modelo de dieta de “*fast food*”, ou seja, com alto índice de gordura (40%), colesterol (0,2%) e frutose (42g/L). Após período de 6 meses, o qual é justificado pelo desenvolvimento gradual e em longo período da fibrose, estes animais apresentaram características de síndrome metabólica tais como, obesidade, resistência à insulina, esteatohepatite com balonização hepatocelular e progressiva fibrose. Assim sendo, a adição de frutose à dieta hiperlipídica favorece o desenvolvimento de fibrose, balonização hepatocelular em camundongos C57BL/6J.

1.4 – Fontes e metabolismo mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O metabolismo energético mitocondrial é considerado como a principal fonte celular de espécies reativas de oxigênio em células eucariontes (Turrens, 2003; Kowaltowski et al., 2009). Diante de tal fato, inicialmente, as espécies reativas de oxigênio

(EROs) foram vistas como subprodutos tóxicos do metabolismo e relacionados à causa de uma miríade de patologias humanas (Halliwell e Gutteridge, 1990; Halliwell, 1991; Toyokuni, 1999). No entanto, esta visão tem sido modificada por estudos mais recentes que indicam as EROs como intermediários críticos de vias de sinalização celular. Em condições fisiológicas, evidências experimentais sugerem a produção mitocondrial de EROs como um processo controlado, o qual exerce papel fundamental na regulação de diversos processos celulares, tais como, ciclo celular e metabolismo energético (Hamanaka e Chandel, 2010; Dikalov 2011). Mediante ao eficiente ajuste das taxas de produção de EROs, Hamanaka e Chandel (2010) demonstraram que diferentes níveis de produção de EROs exercem papéis distintos no metabolismo celular, i.e. baixos níveis estão relacionados a processos celulares, tais como proliferação e diferenciação celular; níveis moderados estão relacionados a respostas adaptativas e níveis altos à senescência e morte celular (Hamanaka e Chandel, 2010).

Baseado nestes estudos, acredita-se que a produção mitocondrial de EROs (especificamente as espécies $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) é um processo fisiológico e contínuo, sendo este, resultado do processo de redução monoelétrica da molécula de O_2 pela atividade de diversas óxido-redutases, tais como a NAD:coenzima Q e a coenzima Q:citocromo c, localizadas nos complexos I e III da cadeia respiratória, respectivamente (Turrens, 2003; Murphy et al., 2009). Os complexos I e III são convencionalmente reconhecidos como as principais fontes de produção de EROs mitocondrial (Kowaltowski et al., 2009). Além destes, estudos recentes têm relatado outros sítios mitocondriais com significativa contribuição na produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ mitocondrial (Treberg et al., 2011; Gonçalves et al., 2016; Wong et al., 2017).

Como ilustrado na **Figura 1**, até o presente momento, foram identificados 11 sítios de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ mitocondrial, os quais foram detalhadamente discutidos na revisão de literatura de Wong e colaboradores (2017). Sete destes 11 sítios localizam-se na membrana mitocondrial interna, os quais são: sítios I_F e I_Q no complexo respiratório I, sítio II_F no complexo II, sítio III_{Q_0} no complexo III (Quilan et al., 2013); além destes quatro sítios presentes nos complexos respiratórios, outras três óxido-redutases de membrana mitocondrial interna (as atividades são de transferência de elétrons entre seus substratos específicos e a coenzima Q) também podem contribuir significativamente para a produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$, são elas: a desidrogenase de glicerol-3-fosfato, a desidrogenase de diidroorotato, e a ETF:Q oxido-redutase, com sítios de produção denominados, respectivamente, G_Q , D_Q e E_F . Além destes sítios localizados na membrana mitocondrial

interna, a matriz mitocondrial apresenta desidrogenases que são consideradas fontes importantes de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ mitocondrial, as desidrogenases de α -cetoglutarato (α -KGDH), de piruvato (PDH), de α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKDH) e a mais recentemente caracterizada, a desidrogenase de α -cetoadipato (OADH) (Gonçalves et al., 2016).

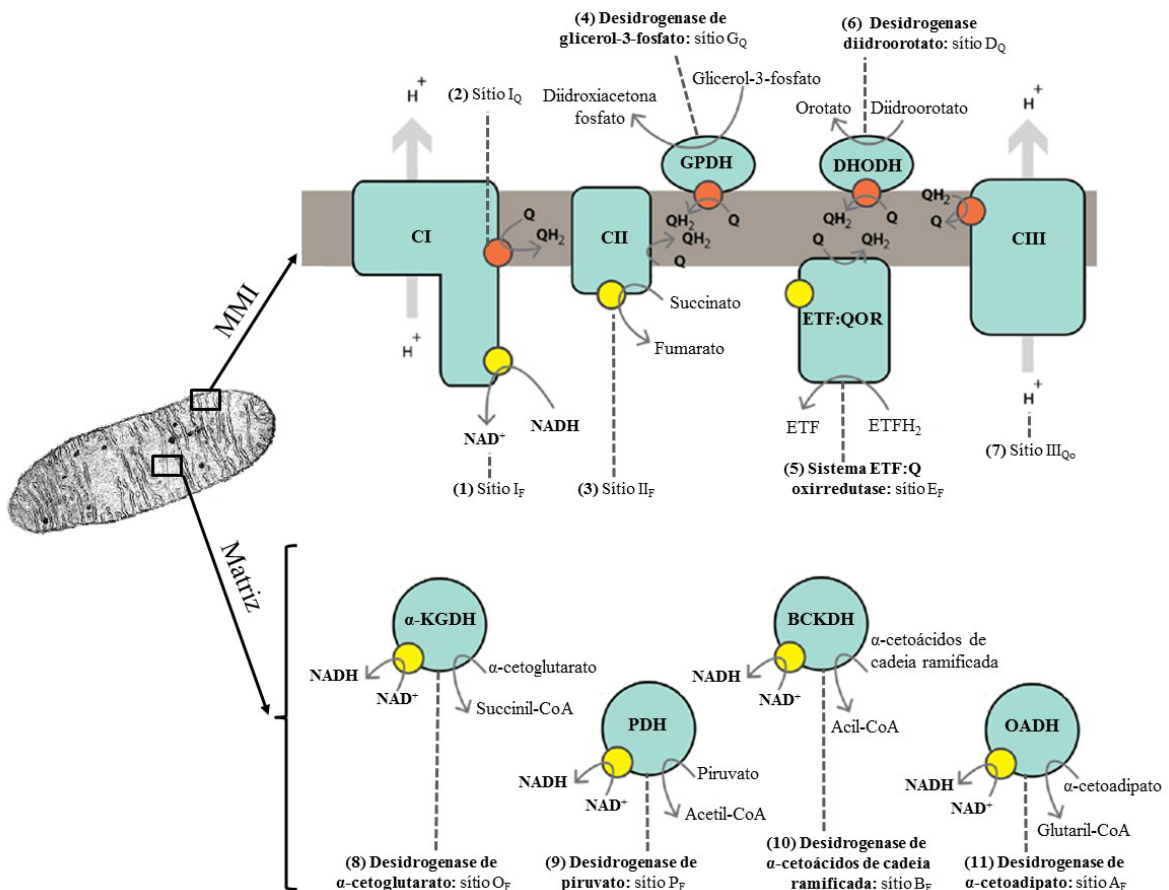


Figura 1 – Localização dos 11 sítios mitocondriais de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$. Nove destes sítios liberam $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ no compartimento da matriz mitocondrial enquanto que dois deles liberam essas espécies reativas para a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. A figura representa a mitocôndria, em destaque na parte superior é representada a membrana mitocondrial interna (MMI) e na parte inferior a matriz mitocondrial. Os círculos amarelos e laranjas indicam grupos flavinas e sítios ligados à coenzima Q dos complexos respiratórios/enzimas, respectivamente. Na membrana mitocondrial interna encontram-se os complexos respiratórios I (CI), II (CII) e III (CIII) os quais apresentam os sítios de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$: I_F e I_Q (no CI), II_F (no CII) e III_{Qo} (no CIII). Na figura também são representados outros sítios de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ presentes na membrana mitocondrial interna, a desidrogenase de glicerol-3-fosfato (GPDH), a desidrogenase de diidroorotato (DHODH), e a ETF:Q oxido-redutase (ETF:QOR), com os sítios G_Q, D_Q e E_F, respectivamente. Na matriz mitocondrial as desidrogenases de α -cetoglutarato (α -KGDH), de

piruvato (PDH), de α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKDH) e a de cetoadipato (OADH) correspondem aos sítios de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$: O_F , P_F , B_F e A_F , respectivamente (Adaptado de Wong et al., 2017).

A contribuição de cada uma destas fontes na produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ depende do substrato fornecido para a mitocôndria (Wong et al., 2017)). Quilan e colaboradores (2013) avaliaram a contribuição dos diferentes sítios mitocondriais na produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ durante a oxidação de substratos requerendo as atividades do complexo I (malato e glutamato), do complexo II (succinato), da ETF:Q oxido-redutase (palmitoil carnitina) e da desidrogenase de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-fosfato). Estes autores observaram que a oxidação do succinato acarretou em maior produção de EROs, sendo esta associada principalmente à produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ pelo complexo I (sítio I_Q – 83%). Nestas condições experimentais, a maior produção de EROs pelo sítio I_Q foi atribuída ao fluxo reverso de elétrons na cadeia respiratória. Quando fornecido substratos para complexo I, malato e glutamato, a taxa total de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ foi consideravelmente menor (apenas 20-25% em relação ao substrato succinato), já quando avaliada a produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ na presença de palmitoilcarnitina, os valores observados se apresentaram ainda menores do que aqueles constatados na presença de substratos para complexo I. Na presença de palmitoil carnitina, os principais sítios responsáveis pela produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ sob a condição de respiração basal, ou seja, sem ADP, foram os sítios I_F , II_F e III_{Q_0} . Este conjunto de resultados demonstram a importância que os diferentes substratos exercem na determinação das taxas e das diferentes fontes de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ mitocondrial.

O $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ produzido pelos diferentes sítios localizados na mitocôndria são direcionados para o espaço intermembranas e/ou matriz mitocondrial. O direcionamento destas EROs está intimamente relacionado à localização do sítio de produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$, assim como a topologia dos mesmos. Foi demonstrado que o complexo respiratório III (sítio III_{Q_0}) e a desidrogenase de glicerol-3-fosfato (GPDH – sítio D_Q) geram $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ para o espaço intermembranas mitocondrial e também para a matriz mitocondrial. Os outros 9 sítios geram $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ exclusivamente para a matriz mitocondrial (Brand, 2010). Os sítios com contribuições significativas na produção de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ para a matriz mitocondrial são os sítios I_F e III_{Q_0} presentes nos complexos respiratórios I e III, respectivamente e também as desidrogenases de matriz ilustradas na Figura 1 (Gonçalves et al 2016).

A efetiva liberação mitocondrial de superóxido e peróxido de hidrogênio depende tanto da taxa e topologia da produção destas espécies, as quais são influenciadas pelo substrato energético, quanto da atividade dos sistemas antioxidantes presentes na mitocôndria. Na matriz e no espaço intermembranas mitocondrial, o $O_2^{\cdot-}$ é convertido à H_2O_2 através da atividade catalítica da enzima superóxido dismutase [a isoforma dependente de manganês (Mn-SOD) na matriz e a isoforma dependente de cobre/zinco (Cu,Zn-SOD) no espaço intermembranas] (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001). O H_2O_2 é uma espécie química permeável através de membranas e mais estável que outros EROs, podendo ser reduzido a água por diferentes enzimas do sistema antioxidante, como a catalase, glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (Prx). A catalase é uma enzima que cataliza a reação de dismutação de $2H_2O_2$ formando $2H_2O$ e O_2 . Embora alguns estudos já observaram a atividade desta enzima em mitocôndrias isoladas de coração (Radi et al., 1991) e fígado (Salvi et al., 2007) de ratos, sabe-se que a catalase é encontrada principalmente nos peroxissomos (Schrader et al., 2006).

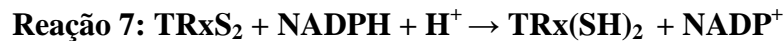
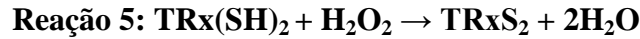
A GPx converte a glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina, à glutatona oxidada (GSSG) durante o processo de redução do H_2O_2 à H_2O (Reação 1), assim como de hidroperóxidos lipídicos ($R-OOH$) para alcoóis estáveis correspondentes (Reação 2). A atividade da GPx é acoplada a reação da glutatona redutase (GR) que promove a manutenção dos níveis de GSH utilizando o NADPH como fonte doadora de elétrons neste sistema antioxidante enzimático (Reação 3).

A reação global (Reação 4) representa o funcionamento deste sistema da glutatona que reduz peróxidos ($R-OOH$) inorgânico e orgânicos, às custas da oxidação de NADPH.



A remoção mitocondrial de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos também pode ser conduzida pela enzima peroxirredoxina (Prx) (Salvi et al., 2007). A Prx remove o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos utilizando a tioredoxina em seu estado reduzido (TRxSH) como fonte doadora de elétrons (Reações 5 e 6, respectivamente). A tioredoxina

oxidada (TRxS-S) é por sua vez reduzida pela atividade da enzima tioredoxina redutase (TRxR), que utiliza o NADPH como substrato redutor (Reação 7). A TRxR apresenta alta similaridade estrutural e mecanismo semelhante a enzima glutationa redutase (GR).



A reação global (Reação 8) deste sistema detoxificador de peróxidos (*R*-OOH) dependente de tioredoxina e de suas oxido-redutases específicas é igual àquela do sistema da glutationa (Reação 4). Ambos sistemas antioxidantes, um dependente de glutationa e o outro de tioredoxina, utilizam o NADPH como substrato redutor final; este fato demonstra a fundamental importância da manutenção do NADPH na detoxificação de H₂O₂ e de peróxidos orgânicos (e.g. tert-butil-hidroperóxido). O fornecimento de NADPH mitocondrial está diretamente relacionado à atividade das enzimas isocitrato desidrogenase NADP-dependente (IDH2) e a transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT) (Kaufman e Kaplan, 1961; Jo et al., 2001; Rydström, 2006; Drechsel e Patel, 2010). Há também pelo menos outras duas enzimas mitocondriais que reduzem NADP⁺, a enzima málica (NADP-ME) e a glutamato desidrogenase (GDH) (Ronchi et al., 2016). A contribuição de cada uma destas enzimas no fornecimento de NADPH mitocondrial será discutida em mais detalhes nesta Introdução.

1.5 – Transidrogenase de Nucleotídeos de Nicotinamida (NNT)

A enzima transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT, E.C.1.6.1.1) está localizada na membrana mitocondrial interna da maioria dos procariotos e eucariotos (Freeman et al., 2006). Como descrito na **Figura 2**, a NNT exerce papel fundamental na catalização da redução reversível do NADP⁺ pelo NADH.

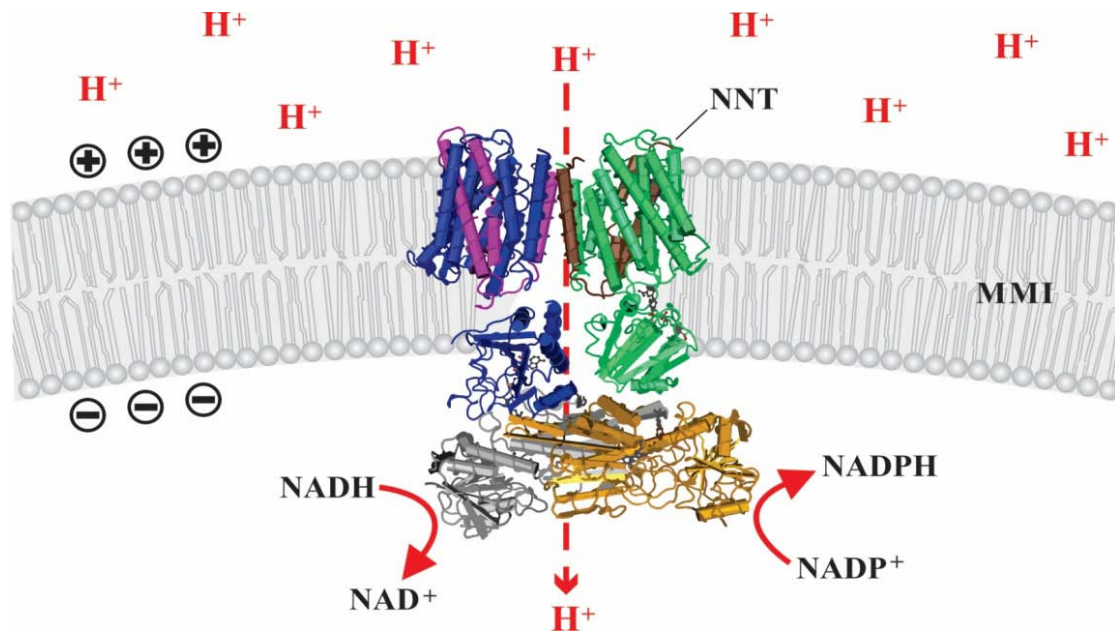
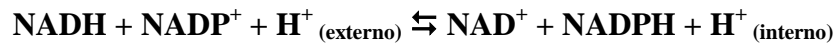


Figura 2 – Representação esquemática da transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida (NNT). A enzima NNT está inserida na membrana mitocondrial interna (MMI) e catalisa a reação de redução de NADP^+ pelo NADH , com formação de NADPH e NAD^+ . Esta reação está acoplada à entrada de um próton proveniente do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, a favor do gradiente eletroquímico transmembranar. Estrutura quaternária da NNT de *Thermus thermophilus* (Leung et al., 2015).

Nota-se também que a reação é dependente da translocação de prótons entre as membranas mitocondriais e a matriz mitocondrial. É importante ressaltar que por mais que se trate de uma reação reversível, em condições fisiológicas, a reação tende a ficar deslocada no sentido da redução do NADP^+ pelo NADH acoplada à entrada de próton na matriz mitocondrial. Essa condição resulta na formação de NADPH , o qual nestas circunstâncias, normalmente, se apresenta em sua forma reduzida em um percentual de aproximadamente 95% (Rydström, 2006).

A atividade da enzima NNT foi descrita pela primeira vez por Colowick e colaboradores (1952). Neste estudo foi observada a formação de NADPH aliada à oxidação do NADH em bactérias *Pseudomonas fluorescens*. Posteriormente, Kaplan e colaboradores (1953) reportaram a atividade da NNT em homogenatos de mitocôndrias provenientes de diversos tecidos de coelho como fígado, rim, coração, cérebro e baço sendo que no tecido cardíaco esta atividade se mostrou aumentada (Humphrey, 1957).

Estudos posteriores relacionaram o potencial de prótons formado durante a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória e o funcionamento da enzima NNT. Mediante a esta observação, Rydström (1979) associou o funcionamento da NNT à teoria quimiosmótica proposta por Mitchel (1961) a partir do qual concluiu-se que a NNT possui um mecanismo de acoplamento quimiosmótico, onde a energia na forma de força protomotiva é utilizada para induzir mudança conformacional na enzima e assim reduzir o NADP^+ . Em 1985, Clarke e Bragg demonstraram que a inibição da translocação de prótons pela NNT de *Escherichia coli* resultou em inibição da transidrogenação. Este estudo trouxe a comprovação do acoplamento entre translocação de prótons e a atividade catalítica da NNT (Clarke e Bragg, 1985).

No que se refere à estrutura primária da proteína NNT, Yamaguchi e colaboradores (1988) observaram que, em bovinos, a NNT possui uma sequência de 1043 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 109 kDa. Neste mesmo ano também foi observado que a NNT é um homodímero (Hoek e Rydström, 1988) e cada subunidade dessa proteína é formada por três domínios, os quais se apresentam preservados em diferentes organismos (Arkblad et al., 2002; Arkblad et al., 1996). A região central da proteína, ou domínio II, é fortemente hidrofóbica e corresponde à região transmembrana, por onde passam os prótons. As regiões N-terminal, ou domínio I, e C-terminal, ou domínio III, caracterizam-se por serem hidrofílicas e contêm os sítios de ligação de NAD(H) e NADP(H), respectivamente (Rydström et al., 1998; Yamaguchi et al., 1988; Leung et al., 2015).

Em estudo publicado por Rydström (2006) utilizando a bactéria *Escherichia coli* como modelo experimental, pesquisadores sugeriram que a NNT seria responsável por aproximadamente 50% do estoque de NADPH. O restante seria proveniente de outras 3 reações enzimáticas oxidativas vinculadas à produção de NADPH: isocitrato desidrogenase-dependente de NADP (IDH2), enzima málica (NADP-ME) e ainda glutamato desidrogenase (GDH) (Yin et al., 2012). Porém em estudo mais recente, Ronchi e colaboradores (2016) observaram que a contribuição da enzima NNT no metabolismo de peróxido pode variar de aproximadamente zero a 100%, dependendo do substrato e estado respiratório. Pesquisadores observaram que no estado de respiração basal, a NNT contribuiu com aproximadamente 60% e 100% para o metabolismo de peróxido na presença dos substratos piruvato/malato e glutamato/malato, respectivamente. No entanto, durante o estado de fosforilação oxidativa, a NNT apresentou contribuição praticamente nula e de 63% na presença dos substratos

piruvato/malato e glutamato/malato, respectivamente. Os autores concluem que a participação relativa da NNT no metabolismo de peróxido dependente de NADPH é minimizada no estado de fosforilação oxidativa por haver uma menor disponibilidade de NADH nesta condição e um menor potencial elétrico de membrana. Além disso, o maior fluxo de substratos pelo ciclo do ácido cítrico durante a fosforilação oxidativa promove maior disponibilidade de substrato para a IDH2, permitindo a regeneração de NADPH por esta via (Ronchi et al., 2016).

É evidente a importância que a NNT exerce na ligação entre a produção de NADH e redução de NADP, envolvendo a atividade do ciclo do ácido cítrico e respiração. Uma vez em seu estado reduzido, o NADP alimenta os sistemas antioxidantes da glutatona redutase/peroxidase e tioredoxina redutase/peroxiredoxina. Visto isto, o NADPH exerce papel crucial na manutenção do estado redox e defesa mitocondrial contra o estresse oxidativo (Vogel et al., 1999; Kowaltowski et al., 2009; Yin et al., 2012). Além disso, é possível pressupor que a diminuição na expressão ou na atividade da NNT pudesse acarretar em desequilíbrio redox mitocondrial. Neste contexto, as primeiras evidências da importância da NNT na regeneração do NADPH e a consequente capacidade de neutralização de EROs são reveladas no estudo de Arkblad e colaboradores (2005). Estes pesquisadores observaram que nematódeos *Caenorhabditis elegans* deficientes de NNT, por meio de mutações ou silenciamento de RNA de interferência (RNAi), apresentavam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e prejudicada relação celular GSH/GSSG. Além disso, Huang e colaboradores (2006) demonstraram que a ausência de NNT funcional aliada à deficiência de superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD) torna a sobrevivência de camundongos inviável. Neste estudo pesquisadores puderam observar que camundongos congênicos com *background* C57BL/6J (sem NNT funcional) vinham a óbito aos 15 dias de gestação, enquanto camundongos com *background* genético DBA/2J (com NNT intacta) tinham uma vida útil média de 8 dias. Posteriormente Yin e colaboradores (2012) demonstraram que a ausência de NNT pode modular o balanço redox. Neste estudo, o silenciamento da NNT em células PC12 por RNAi resultou na redução dos níveis de NADPH celular, alteração no estado redox demonstrada pela redução na razão GSH/GSSG e aumento nos níveis de H₂O₂ (Yin et al., 2012).

Recentemente, Ronchi e colaboradores (2013) mostraram que a deleção da NNT na linhagem de camundongos C57BL/6J resulta em anormalidades no estado redox mitocondrial. Os dados indicaram que, apesar da respiração mitocondrial de

repouso e no estado de fosforilação oxidativa serem similares nas mitocôndrias na presença/ausência da NNT funcional, a capacidade antioxidante das mitocôndrias mutantes está significativamente comprometida apresentando maior liberação de H₂O₂, maior susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) induzida por Ca²⁺ e maior razão da glutatona oxidada/reduzida quando comparados com animais com a enzima intacta (C57BL/6/JUnib) (Ronchi et al., 2013).

A literatura ainda se apresenta escassa no que se refere aos efeitos da mutação de *Nnt* em humanos. Recentemente, estudos têm apontado correlação entre a deficiência familiar de glicocorticoides (DFG) e mutações no gene que codifica a proteína NNT (Meimaridou et al, 2012; Novoselova et al., 2015). Estes estudos demonstraram que ao menos 10% dos pacientes com DFG possuem mutações no gene que codifica a proteína NNT (Meimaridou et al, 2012; Novoselova et al., 2015). A DFG é um distúrbio raro, autossômico e recessivo, o qual se caracteriza por deficiência isolada de glicocorticóides. Os achados bioquímicos são ACTH plasmático elevado e baixos níveis de cortisol. Embora ainda não seja clara a relação entre deficiência de glicocorticóides e NNT, supõe-se que esta enzima seja importante no fornecimento de NADPH para o sistema da adrenodoxina oxirredutase mitocondrial, mecanismo envolvido na via de síntese de glicocorticoides (Fujisawa et al., 2015). Outro efeito sugerido à ausência de NNT na DFG é o desbalanço redox induzido pela ausência de NNT e suas consequências nas regiões do córtex da glândula suprarrenal (Meimaridou et al., 2012).

1.6 – Camundongos C57BL/6J e NNT

É bem descrito na literatura que a linhagem de camundongos C57BL/6J difere de outras linhagens C57BL/6 por apresentarem mutações no gene que codifica para a NNT. A mutação é caracterizada pela troca de uma metionina por uma treonina na sequência líder mitocondrial acoplada a uma deleção de 5 exons (referentes aos exons 7-11). A deleção resulta na remoção de 4 hélices dos domínios transmembrana da proteína resultando na tradução de uma proteína truncada e inativa em camundongos C57BL/6J (Toye et al., 2005). Segundo esclarecimentos do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA), esta mutação teria ocorrido espontaneamente por volta de 1980, porém só foi identificada em 2005 (Toye et al., 2005).

No estudo de Toye e colaboradores (2005), os autores mostraram que camundongos da linhagem C57BL/6J, oriundos do *The Jackson Laboratory* em Bar Harbor, apresentavam diferenças de outras linhagens C57BL/6 por possuírem mutações no gene que codifica para a NNT. Neste estudo foi demonstrado que a mutação acarretou em níveis extremamente baixos da expressão da NNT no fígado e pâncreas. Os autores propuseram que a deficiência da NNT foi responsável ao prejuízo observado na homeostase glicêmica destes animais (Toye et al., 2005). Em estudo mais recente, Nicholson e colaboradores (2010) compararam a adiposidade de duas sublinhagens C57BL/6, uma com a NNT intacta (C57BL6/NJ) e a outra mutada (C57BL/6J). Estes autores puderam observar que camundongos deficientes de NNT submetidos à dieta hiperlipídica (60%) apresentaram maior adiposidade.

Os camundongos da linhagem C57BL/6J constituem um dos modelos animais mais amplamente utilizados em pesquisa de metabolismo energético, inclusive servindo de *background* genético para vários modelos de camundongos geneticamente modificados. Estes animais são considerados bons modelos para estudo de obesidade (Nicholson et al., 2010), esteatose/esteatohepatite não alcoólica (Mantena et al., 2009; Sundanesam et al., 2009; Thounaojam et al., 2012; Afrin et al., 2017) e diabetes (Afrin et al., 2017) induzida por dieta hiperlipídica. O tratamento de camundongos C57BL/6J com dieta hiperlipídica resulta em vários aspectos que caracterizam a síndrome metabólica. No entanto, o uso generalizado desta linhagem de camundongos como modelo experimental pode ser questionável se a ausência da NNT não for corretamente considerada. Estudos com o objetivo de avaliar a fisiopatologia de progressão e prevenção de doenças relacionadas à condição de estresse oxidativo devem evitar a utilização destes animais como modelo experimental.

2 – OBJETIVOS

Neste trabalho de Tese de Doutorado objetivamos:

- Estudar a importância da NNT na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por HFD, utilizando camundongos expressando uma mutação espontânea em *Nnt* (C57BL/6J) e camundongos congênicos *Nnt*^{+/+} e *Nnt*^{-/-}.
- Caracterizar mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos congênicos *Nnt*^{+/+} e *Nnt*^{-/-} submetidos à HFD, quanto à bioenergética mitocondrial e ao estado redox.
- Investigar alterações que poderiam explicar a associação entre o desequilíbrio redox mitocondrial e a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por HFD na ausência de atividade de NNT.

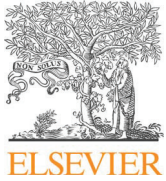
3 – RESULTADOS

Navarro CDC, Figueira TR, Francisco A, Dal’Bó GA, Ronchi JA, Rovani JC, Escanhoela CAF, Oliveira HC, Castilho RF, Vercesi AE.

“Redox Imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-Transhydrogenase Markedly Aggravates High Fat Diet-Induced Fatty Liver Disease in Mice”.

Free Radical Biology and Medicine, v. 113, p. 190-202, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.026>



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original article

Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice



Claudia D.C. Navarro^a, Tiago R. Figueira^a, Annelise Francisco^a, Genoefa A. Dal'Bó^a, Juliana A. Ronchi^a, Juliana C. Rovani^b, Cecilia A.F. Escanhoela^c, Helena C.F. Oliveira^b, Roger F. Castilho^{a,*}, Anibal E. Vercesi^{a,*}

^a Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-887 Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-865 Campinas, SP, Brazil

^c Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-887 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Liver steatosis
Steatohepatitis
Pyruvate dehydrogenase
Nnt mutation
C57BL/6J mouse

ABSTRACT

The mechanisms by which a high fat diet (HFD) promotes non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) appear to involve liver mitochondrial dysfunctions and redox imbalance. We hypothesized that a HFD would increase mitochondrial reliance on NAD(P)-transhydrogenase (NNT) as the source of NADPH for antioxidant systems that counteract NAFLD development. Therefore, we studied HFD-induced liver mitochondrial dysfunctions and NAFLD in C57Unib.B6 congenic mice with (*Nnt*^{+/+}) or without (*Nnt*^{-/-}) NNT activity; the spontaneously mutated allele (*Nnt*^{-/-}) was inherited from the C57BL/6J mouse substrain. After 20 weeks on a HFD, *Nnt*^{-/-} mice exhibited a higher prevalence of steatohepatitis and content of liver triglycerides compared to *Nnt*^{+/+} mice on an identical diet. Under a HFD, the aggravated NAFLD phenotype in the *Nnt*^{-/-} mice was accompanied by an increased H₂O₂ release rate from mitochondria, decreased aconitase activity (a redox-sensitive mitochondrial enzyme) and higher susceptibility to Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. In addition, HFD led to the phosphorylation (inhibition) of pyruvate dehydrogenase (PDH) and markedly reduced the ability of liver mitochondria to remove peroxide in *Nnt*^{-/-} mice. Bypass or pharmacological reactivation of PDH by dichloroacetate restored the peroxide removal capability of mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD. Noteworthy, compared to mice that were chow-fed, the HFD did not impair peroxide removal nor elicit redox imbalance in mitochondria from *Nnt*^{+/+} mice. Therefore, HFD interacted with *Nnt* mutation to generate PDH inhibition and further suppression of peroxide removal. We conclude that NNT plays a critical role in counteracting mitochondrial redox imbalance, PDH inhibition and advancement of NAFLD in mice fed a HFD. The present study provide seminal experimental evidence that redox imbalance in liver mitochondria potentiates the progression from simple steatosis to steatohepatitis following a HFD.

1. Introduction

The increased consumption of fat-rich and energy-dense foods is a nutritional behavior that is associated with a myriad of metabolic, cardiovascular and hepatic diseases of rising worldwide prevalence [1]. Prominent hepatic abnormalities, such as insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and increased rates of gluconeogenesis and glucose output can result from a high fat diet (HFD), and their pathophysiological mechanisms have been extensively studied in experimental rodent models [2–5]. Several studies have implicated mitochondrial dysfunctions in the etiology of metabolic and morphological alterations that occur in the liver in response to a HFD [5–8], but a causal relationship is not always clear [5,7,9]. Higher mitochondrial

production of reactive species and impaired redox balance have been indicated as events that are involved in the progression from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [9,10]. Recently, studies have demonstrated the importance of the inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) in the context of NAFLD by showing that pharmacological or genetic activation of PDH ameliorated the increased hepatic glucose output and the steatosis induced by HFD in mice [3,11,12]. Pyruvate oxidation is relevant in liver mitochondria [3,4], and its decrease seems to cause pyruvate to be channeled into the gluconeogenesis pathway, impairing glucose homeostasis in mice on a HFD [3]. However, a plausible interplay between impaired redox balance and pyruvate oxidation may occur in liver mitochondria following a HFD; the rationale for this hypothesis is presented below.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: roger@fcm.unicamp.br (R.F. Castilho), anibal@unicamp.br (A.E. Vercesi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.026>

Received 6 June 2017; Received in revised form 30 August 2017; Accepted 26 September 2017

Available online 28 September 2017

0891-5849/ © 2017 Published by Elsevier Inc.

Knowing that reduced NADP is the driving energy source for peroxide removal via the glutathione- and thioredoxin-dependent antioxidant systems [8,13,14] and that its oxidation is associated with the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) [15,16], we hypothesized that another consequence of HFD-induced PDH inhibition is redox imbalance and aggravation of NAFLD when the supply of mitochondrial NADPH is not adequately shifted towards sources that are independent of pyruvate oxidation and Krebs cycle flux, such as the enzyme NAD(P)-transhydrogenase (NNT). Previous findings collectively demonstrated that pyruvate oxidation via PDH and downstream Krebs cycle reactions is important for NADPH-dependent peroxide removal because the generated isocitrate sustains NADPH production by NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH2) [17,18]. IDH2 is a main source of NADPH, along with NNT in liver mitochondria [17,19,20]. Thus, if pyruvate flux is impaired, concurrent sources of mitochondrial NADPH, particularly NNT, will need to increase their relative contributions to maintain redox balance. NNT is located in the inner mitochondrial membrane and reduces NADP^+ at the expense of NADH oxidation and H^+ translocation down the proton-motive force across the inner mitochondrial membrane, thus maintaining NADP in a highly reduced state [13,16]. Interestingly, C57BL/6J mice have a spontaneous mutation of the NNT gene (*Nnt*) [18,21], are apparently more susceptible to HFD-induced metabolic diseases than other substrains [22–24], and are widely used as models of HFD-induced obesity, insulin resistance and NAFLD [2,7,22]. Nonetheless, in addition to *Nnt* mutation, other genetic modifiers could play a role in phenotypic differences between mice substrains [25–31]. As a result of this *Nnt* mutation, liver mitochondria that are devoid of NNT function display a lower peroxide removal capacity as well as other redox abnormalities [17,18]. Therefore, the role of NNT in counteracting HFD-induced redox imbalance linked to PDH inhibition seems a sound and unexplored hypothesis.

We have recently generated congenic C57Unib.B6 mice bearing wild type (*Nnt*^{+/+}) or the mutated (*Nnt*^{-/-}) *Nnt* allele from the C57BL/6J substrain [17]. In the current study, we maintained these congenic mice (C57Unib.B6-*Nnt*^{+/+}, C57Unib.B6-*Nnt*^{-/-}) on a chow diet or a HFD to investigate the role of NNT-dependent mitochondrial redox balance in HFD-induced NAFLD. For comparative purposes, the liver histology of C57BL/6J mice on a HFD was also evaluated because innumerable studies have employed this substrain.

2. Material and methods

2.1. Reagents

The fluorescent probes Calcium Green™-5N and Amplex Red® were purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA) and dissolved in deionized water and dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. The primary antibodies against PDH-E1 α (code # 110330) and serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α (code # 177461) were ordered from Abcam (Cambridge, MA, USA). Secondary antibodies conjugated with HRP were purchased from BD Bioscience (rabbit anti-mouse, code # 554002; San Jose, CA, USA) and Cell Signaling (goat anti-rabbit, code # 7074, Beverly, MA, USA). Malic acid, sodium pyruvate, succinic acid, oxaloacetic acid, sodium α -ketoglutarate, glutamic acid, sodium isocitrate, citric acid, palmitoylcarnitine, tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH), rotenone, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine (FCCP), oligomycin, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP^+), reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), adenosine diphosphate (ADP), sodium dichloroacetate, NADP-isocitrate dehydrogenase, peroxidase from horseradish type VIA (HRP), a protease inhibitor cocktail (code P8340) and most other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Stock solutions of respiratory substrates, nucleotides and sodium dichloroacetate were prepared in a 20 mM HEPES solution with the pH adjusted to 7.2 using KOH.

2.2. Animals

C57BL/6J mice were obtained from the Campinas University Multidisciplinary Center for Biological Research in Laboratory Animals (CEMIB/UNICAMP, Campinas, Brazil), which breeds a mouse colony that is confirmed to be homozygous for mutated *Nnt* alleles (a 17,814-bp deletion in the *Nnt* gene, resulting in the absence of exons 7–11) [17,18]. A congenic mouse model carrying wild-type or the *Nnt* mutated alleles from the C57BL/6J substrain was recently generated on the genetic background of C57BL/6/JUnib mouse substrain in our laboratory, as detailed in Ronchi et al. [17]. These congenic mice were bred in our department's animal facility and the N7 (the seventh backcrossed generation) was used in this study. The full designations of these congenic mice are C57Unib.B6-*Nnt*^{+/+} and C57Unib.B6-*Nnt*^{-/-}, which will be referred to by their *Nnt* genotype only (i.e., *Nnt*^{+/+} and *Nnt*^{-/-}). We ordered the “genome scanning service” from The Jackson Laboratory to analyze four independent samples from N7 congenic mice and two independent samples from C57BL/6J mice (purchased from the local provider) using the “C57BL/6 substrain characterization panel” of 150 validated SNPs; the results indicated that C57BL/6J mice from the local provider exhibited all 150 SNPs identical to The Jackson Laboratory reference C57BL/6J substrain; also, the comparison between C57BL/6J and four mice from our congenic model showed a difference of 28% SNPs. Male mice were kept under standard laboratory conditions (at 20–22 °C and a 12 h/12 h light/dark cycle) with free access to tap water and to either a standard diet or a high fat diet (specified below) in the local animal facility, according to Brazilian guidelines and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” from the National Academy of Sciences. Male mice were chosen because they are more susceptible to HFD-induced NAFLD than female (which are protected by estrogens) and develop markers of inflammation like humans with NASH [32,33]. The mice were euthanized by cervical dislocation prior to harvesting the liver for further analysis. The use of mice and the experimental protocols were approved by the local Committee for Ethics in Animal Research (CEUA-UNICAMP, approval number 3914-1). The animal procedures comply with national Brazilian guideline number 13 for “Control in Animal Experiments”, published on September 13th, 2013 (code 00012013092600005, available at <<http://portal.in.gov.br/verificacao-autenticidade>>).

2.3. High fat diet (HFD) treatment

One-month-old congenic and C57BL/6J male mice were randomly assigned to groups fed either the standard diet (Chow, total energy of 3.9 kcal/g, 5% fat, 12% of total calories from fat) from Nuvital (Nuvitalab CR1, Nuvital, Colombo, PR, Brazil) or a HFD from PragSoluções (Hyperlipidic diet, PragSoluções biociências, Jaú, SP, Brazil). The composition of the HFD was as follows: 31% lard fat, 20% casein, 13% dextrinized cornstarch, 12% cornstarch, 10% sucrose, 5% microcrystalline cellulose, 4% soybean oil, 3.5% mineral mix AIN 93 G, 1% vitamin mix AIN 93, 0.3% L-cysteine, 0.25% choline bitartrate, and 0.0028% butylhydroxytoluene (also present as a preservative in the standard chow). The caloric content of this HFD is 5.3 kcal/g, from which ~60% of total energy were derived from fats (90% from lard fat and 10% from vegetable oil). Mice were maintained on a standard diet or HFD for 20 weeks prior to being sacrificed for liver removal and use in histology or mitochondrial isolation.

3. Measurements

3.1. Liver histology

Approximately 3 mm-sided fragments of the two largest liver lobules were cut and placed in 10% formaldehyde for 24 h at room temperature. Then, tissue samples were embedded in paraffin before being sectioned (5 μm thick slices). These liver slices were placed on

glass slides in a 40 °C water bath and then were dried at 60 °C in an incubator for 20 min. Next, the slides were subjected to conventional hematoxylin plus eosin or picosirius red staining protocols. An experienced pathologist performed blind evaluations of stained sections under an optical microscope to grade the following abnormalities: ballooning (a grade of 3 was assigned when associated with Mallory's hyaline), macrovesicular steatosis, acinar inflammation and portal inflammation (on a scale of 0–3), and fibrosis (on a scale of 0–4) (fibrosis grading was based on Picosirius red staining); microvesicular steatosis was marked as absent [0] or present [1]. The sum of these grades provides an overall NAFLD activity score between 0 and 17. As proposed by Kleiner et al. [34], a NAFLD activity score between 0 and 8 is obtained if only the grades of ballooning injury (on a scale of 0–2), steatosis (on a scale of 0–3), and acinar inflammation (on a scale of 0–3) are accounted for human NAFLD diagnosis purposes.

3.2. Content of liver triglycerides

Lipids were extracted from livers by following a modified Folch's method. Briefly, approximately 60 mg of diced wet liver was homogenized in 3 mL of organic solvents (2 mL chloroform plus 1 mL methanol), filtered through fat-free paper and left to dry overnight inside a fume hood at room temperature. Then, half a milliliter of an amphiphilic medium (100 mM KH_2PO_4 , 50 mM NaCl, 5 mM cholic acid, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) was added to each tube containing the dried, extracted lipids. Then, the triglyceride level of this lipid mixture was measured by a commercial enzymatic-colorimetric kit (Roche-Hitachi, Germany) to calculate the total triglyceride content.

3.3. Mitochondrial isolation and incubation conditions

Mitochondria were isolated from mice livers by conventional differential centrifugation, as detailed described previously [35]. Because of the high lipid content in mouse livers following the HFD, livers from all mouse groups were homogenized and processed in mitochondrial isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM HEPES and 0.5 mM EGTA) supplemented with 1 g/L bovine serum albumin until the second centrifugation step. Measurements of respiration, hydrogen peroxide release, Ca^{2+} retention capacity and the redox state of NAD(P) in suspensions of intact mitochondria were performed at 28 °C with continuous magnetic stirring in 2 mL of standard reaction medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES buffer with the pH adjusted to 7.2 with KOH). The addition of various respiratory substrates and the presence of other chemicals are specified in the figure legends. Because of their time consuming characteristics, the *in vitro* protocols with isolated and functional mitochondria were performed with two groups from the same *Nnt* genotype in each experimental run (always comparing chow vs. HFD).

3.4. Enzymes activities

The activities of the enzymes aconitase, NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH2) and citrate synthase were spectrophotometrically assayed in the isolated mitochondrial suspensions according to previously used protocols [18,36] that are described in the [Supplementary material](#).

3.5. Oxygen consumption

Mitochondria were suspended (0.5 mg/mL) in 1.4 mL of standard reaction medium supplemented with 200 μM EGTA and 5 mM each of malate, glutamate, pyruvate, and α -ketoglutarate. Respiration was measured using a Clark-type electrode (YSI Co., Yellow Spring, OH, USA) in a temperature-controlled chamber equipped with a magnetic stirrer. After measuring the resting O_2 consumption, respiration linked to oxidative phosphorylation (also known as state 3) was elicited by the

addition of 150 μM of ADP. Then, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oligomycin was added to cease the phosphorylation by ATP synthase, slowing down oxygen consumption. Finally, 80 nM of FCCP was added to promote maximal uncoupled respiration.

3.6. Mitochondrial hydrogen peroxide (H_2O_2) release

Mitochondria were suspended (0.5 mg/mL) in 2 mL of standard reaction medium supplemented with 300 μM EGTA, 10 μM Amplex Red[®], 1 U/mL horseradish peroxidase with malate (2.5 mM) plus pyruvate (5 mM) as respiratory substrates. In this condition, the H_2O_2 released from mitochondria causes the oxidation of Amplex Red[®] and the formation of its fluorescent product, resorufin, which was monitored over time in a spectrofluorometer (Hitachi F-4500, Tokyo, Japan) operating with slit widths of 2.5 nm and at 563 and 587 nm for the excitation and emission wavelengths, respectively.

3.7. Assessment of Ca^{2+} -induced opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP)

Mitochondria were suspended (0.5 mg/mL) in the standard reaction medium supplemented with 15 μM EGTA, 0.2 μM of a calcium indicator (Calcium Green[™]-5N) and respiratory substrates (2.5 mM malate plus 5 mM pyruvate or 5 mM succinate plus 1 μM rotenone). The fluorescence was continuously monitored in a spectrofluorometer (Hitachi F-4500, Tokyo, Japan) using excitation and emission wavelengths of 506 and 532 nm, respectively, and slit widths of 5 nm. Repeated pulses of CaCl_2 additions (2.5 μM or 15 μM for malate plus pyruvate or succinate plus rotenone conditions, respectively) were performed every 3 min after the addition of mitochondria to the system. The number of CaCl_2 pulses added prior to the start of Ca^{2+} release by mitochondria into the medium was measured as an index of the susceptibility to Ca^{2+} -induced PTP.

3.8. Redox state of mitochondrial nicotinamide nucleotides (NAD(P))

Mitochondria were suspended (0.5 mg/mL) in the standard reaction medium supplemented with 300 μM EGTA and either malate (2.5 mM) plus pyruvate (0.1 or 5 mM) or malate (2.5 mM) plus palmitoylcarnitine (15 μM) as respiratory substrates (specific concentrations and the addition of other reagents are indicated in figure legends). The changes in the redox state of NAD(P) were monitored in a spectrofluorometer (Hitachi F-4500, Tokyo, Japan) using excitation and emission wavelengths of 366 and 450 nm, respectively, and slit widths of 5 nm. Worthnoting, only the reduced form of NAD(P) exhibits a strong endogenous fluorescence signal. The mitochondrial capacity to remove peroxide was assessed by challenging the mitochondrial peroxide-metabolizing system supported by NADPH with exogenous t-BOOH, an organic peroxide that is metabolized via the glutathione and thioredoxin peroxidase/reductase systems (but not by catalase) at the expense of NADPH [37,38]. The mitochondrial contents of reduced NADP (NADPH) were enzymatically determined using a commercially available kit according to manufacturer's instructions (#G9071, Promega, Madison, USA).

3.9. PDH expression and phosphorylation state

The final pellet of isolated mitochondrial fraction was suspended in a medium containing phosphatase and protease inhibitors (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1% Tween 20, 1% protease inhibitor cocktail, and pH 7.4). Then, the samples were diluted in standard Laemmli buffer before being subjected (50 μg of total proteins per lane) to 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The resolved proteins were transferred (120 V for 90 min, on ice) from the gel to a nitrocellulose membrane (0.45 μm , from Bio-Rad, Hercules, CA). Following the blocking of membrane with 5% dried milk, the

membrane was washed and incubated overnight at 4 °C with 1:1000 diluted primary antibodies against PDH-E1 α (a subunit of the PDH complex) or serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α . After washing the membrane free of primary antibodies, it was incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1:10000 diluted) for 1 h at room temperature. Finally, the membrane was washed and incubated with an enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and the luminescence signals were detected in a digital instrument (UVITEC, Cambridge, UK).

4. Statistical analyses

The results are shown as representative and/or as the mean \pm SEM (individual values and medians are reported for non-parametric data). Sample sizes are indicated in figure legends. Two-way ANOVA followed by Bonferroni as a post-hoc was used to test differences between groups for most data, with the exception of data shown in Fig. 4, which were tested with Wilcoxon (when groups were correlated) or Mann-Whitney tests. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

5. Results

In the present study, we initially evaluated HFD-induced hepatic alterations in C57BL/6J and congenic mice bearing the *Nnt*^{+/+} or *Nnt*^{-/-} alleles. Histopathological and biochemical analyses revealed that twenty weeks of a HFD promoted NAFLD in all three groups of mice, i.e., the *Nnt*^{+/+}, *Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mice (Figs. 1 and 2). However, mice groups lacking a functional NNT due to the *Nnt* mutation (*Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mice) exhibited increased frequency of ballooning injury, micro and macrovesicular steatosis of higher grades and elevated contents of liver triglycerides than *Nnt*^{+/+} mice. The sums of the scores presented in panels A to D in Fig. 2 (the median \pm interquartile range values were 3 ± 2 , 7 ± 0 and 8 ± 2 for *Nnt*^{+/+}, *Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mouse groups on a HFD, respectively) were significantly ($P \leq 0.05$, determined by Kruskal-Wallis ANOVA with Dunns as post-hoc) higher in *Nnt*^{-/-} and in C57BL/6J than in *Nnt*^{+/+} mice. The NAFLD activity score, as proposed by Kleiner et al. [34], indicated that most of *Nnt*^{+/+} mice developed simple steatosis following the HFD, while most of *Nnt*^{-/-} exhibited scores indicative of NASH, an aggravated form of NAFLD. Interestingly, compared to *Nnt*^{-/-} mice on the same diet, C57BL/6J mice displayed worsened hepatic alterations when fed HFD, as evidenced by ~50% higher liver triglyceride contents (Fig. 1), as well as increased grades of acinar/portal inflammation and fibrosis (Fig. 2E and F). NNT has been previously shown to play a main role in mitochondrial redox homeostasis by supplying NADPH, which in turn drives reductive processes, such as enzymatic peroxide removal through the glutathione and thioredoxin dependent systems [17]. Therefore, these hepatic phenotypes of *Nnt*^{+/+}, *Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mice fed chow or a HFD provided proof of the concept that mitochondrial redox imbalance aggravates HFD-induced NAFLD. Following this initial observation, experiments were designed to assess mitochondrial redox balance and related biochemical events that delineated the worsening of NAFLD upon the interaction between *Nnt* mutation and a HFD. To this end, isolated liver mitochondria were obtained from *Nnt*^{+/+} and *Nnt*^{-/-} mice that were given either standard chow or a HFD and were studied under suitable conditions.

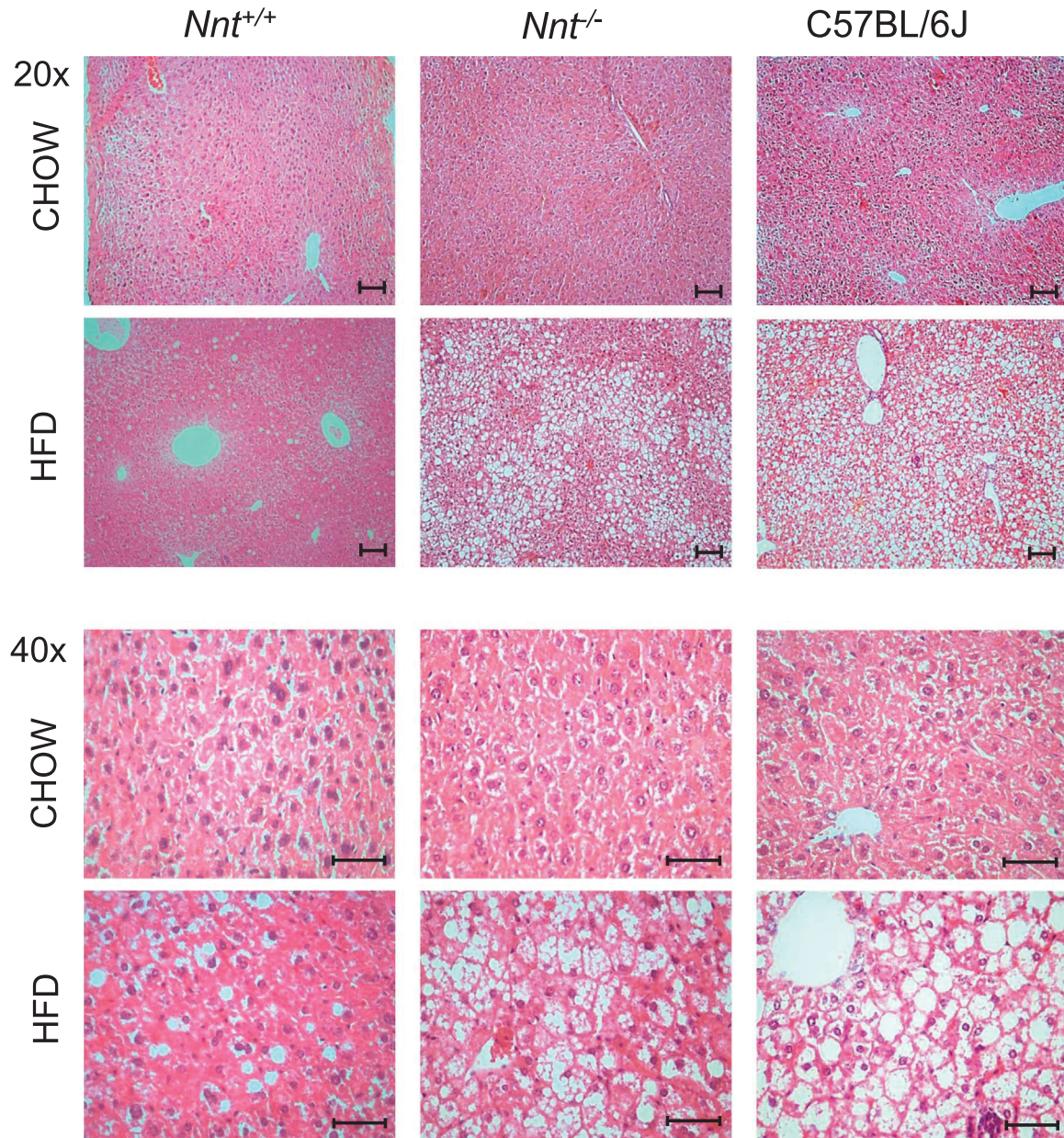
Resting and ADP-stimulated mitochondrial respiration, supported by a cocktail of complex I-linked substrates and in the absence of free Ca²⁺, did not differ among the groups of congenic mice, given either chow or a HFD (Supplementary material).

The rate of H₂O₂ release from mitochondria was increased by the HFD in *Nnt*^{-/-} mice only, indicating that this redox alteration was underpinned by the interaction between HFD and the *Nnt* mutation (Fig. 3A, B). Because the activity of aconitase relies on the redox state of its ferrous group, the activity of this enzyme is a sensitive marker of redox balance in mitochondria [36]. Compared to chow-fed *Nnt*^{+/+},

Nnt^{-/-} mice under chow or a HFD presented with approximately 15% and 50% lower aconitase activities, respectively (Fig. 3C). Notably, the HFD alone did not affect aconitase activity, but the decrease was greater upon the interaction between the HFD and the *Nnt* mutation. IDH2 in the Krebs cycle, as well as NNT, have high activities for reducing NADP⁺ to NADPH in the mitochondrial matrix [17]. Presumably, the relative importance of IDH2 may be augmented in the absence of NNT and/or in response to oxidative stress. Data shown in Fig. 3D indicated that the activity of IDH2 was significantly upregulated only in *Nnt*^{-/-} mice given a HFD; there were non-significant trends of increased IDH2 activity in response to *Nnt* mutation or HFD alone.

The Ca²⁺-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) is a redox-sensitive event that may result in bioenergetic dysfunction, cellular injury and apoptosis [14]. The assessment of Ca²⁺-induced mitochondrial Ca²⁺ release that occurs via PTP pore opening suggested divergent effects between *Nnt* mutation and HFD (Fig. 4). As expected, in mice fed a chow diet [18], the susceptibility to Ca²⁺-induced PTP opening was higher in *Nnt*^{-/-} compared to *Nnt*^{+/+} mice when mitochondria respired on succinate in the presence of rotenone (Fig. 4C, D and F), but not when malate and pyruvate were the respiratory substrates (Fig. 4A, B and E). Surprisingly, HFD decreased the susceptibility to Ca²⁺-induced PTP opening in mitochondria from *Nnt*^{+/+} mice, regardless of the respiratory substrates supplied. The *Nnt* mutation profoundly changed the effect of the HFD on this variable, since mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD exhibited higher susceptibility to Ca²⁺-induced PTP opening than mitochondria from either *Nnt*^{-/-} or *Nnt*^{+/+} mice on a chow diet. The decreased susceptibility to Ca²⁺-induced PTP opening in mitochondria from *Nnt*^{+/+} mice following a HFD seems not to be related to mitochondrial selection during the isolation procedure, since the recovery of mitochondria (citrate synthase activity) from the total liver was similar between diet treatments in *Nnt*^{+/+} mice (chow diet: $47 \pm 3\%$, $N = 4$; HFD: $40 \pm 4\%$, $N = 6$).

The *Nnt* mutation itself was previously shown to reduce the mitochondrial capacity to metabolize peroxide [17,18], and according to our stated hypothesis, such dysfunction could be exacerbated by a HFD. The mitochondrial capacity to remove a peroxide load was first evaluated during the resting respiratory state (i.e., in the absence of exogenous ADP) sustained by malate and pyruvate as substrates (Fig. 5A, B and E). These data clearly demonstrated that HFD decreased the mitochondrial capacity to remove peroxide in *Nnt*^{-/-} mice only, while *Nnt*^{+/+} mice were protected against this deleterious effect caused by the HFD. In the absence of an NADPH supply via NNT, substrate oxidation through the Krebs cycle is the source of NADPH that sustains NADPH-dependent peroxide removal in the mitochondrial matrix [17,18]. Thus, mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD were presumed to exhibit impaired oxidation of the available malate and pyruvate substrates. In the following experiment (Fig. 5C, D and E), a peroxide removal assay was performed in the presence of exogenous ADP (i.e., the phosphorylating state). Exogenous ADP exerts profound effects on mitochondrial metabolism and peroxide removal [17], favoring NADPH supply via substrate oxidation because ADP activates dehydrogenases such as PDH, stimulates oxidative phosphorylation, and increases substrate flux through the Krebs cycle. The peroxide removal rate in the presence of ADP did not differ between *Nnt*^{-/-} and *Nnt*^{+/+} mice given either a chow or a HFD. This indicated that NNT does not contribute to peroxide removal under the respiratory condition of ADP phosphorylation sustained by malate and pyruvate as substrates, corroborating our previous findings from studying mice given a standard chow diet [17]. The time to remove peroxide in the presence of ADP was slightly and significantly increased by the HFD in mitochondria from *Nnt*^{+/+} mice only (Fig. 5E). Curiously, *Nnt*^{-/-} mice did not exhibit this alteration, which seems to be related to the fact that on a HFD, this genotype developed higher IDH2 activity, and thus was perhaps better adapted to handle peroxide removal in an NNT-independent manner. The effects of a HFD, *Nnt* mutation and ADP on peroxide removal are summarized for



		Triglyceride Content (mg/g)		
CHOW		10.7 ± 1.1	9.5 ± 0.5	16.4 ± 0.9
HFD		31.7 ± 3.5 *	56.2 ± 5.4 *#	86.1 ± 15.2 *# \$

Fig. 1. Histological characterization of fatty liver disease and triglycerides contents in livers from *Nnt*^{+/+}, *Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mice following a high fat diet (HFD). Section (5 μm) of liver were stained with hematoxylin and eosin and observed using an optical microscope (20× objective; scale bar = 100 μm; 40× objective; scale bar = 50 μm) for the evaluation of abnormalities characterizing simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis; N = 5–7. The content of liver triglyceride (mg/g of wet liver) was biochemically determined and the means ± SEM (N = 5–14) of each mice genotype on both diets are reported below the corresponding column of images. Control groups were fed with a chow diet. **P* ≤ 0.01 vs. genotype-matched chow-fed mice; #*P* ≤ 0.01 vs. *Nnt*^{+/+} on a HFD; \$*P* ≤ 0.01 vs. *Nnt*^{-/-} on a HFD.

better visualization in an integrated graph shown in Fig. 5F. Overall, these results demonstrated marked effects of exogenous ADP as it nearly abolished the entire extent of the HFD deleterious effects (Fig. 5B and E) on the mitochondrial capacity to remove peroxide in *Nnt*^{-/-} mice (Fig. 5D and E).

Because the HFD effects on the ADP-induced changes in peroxide removal from the resting state were much larger in *Nnt*^{-/-} than in *Nnt*^{+/+}

+ mice (~150% vs. ~15%) (Fig. 5F), we designed new protocols (Fig. 6) to investigate whether PDH was the molecular target responsible for the modulations of peroxide removal by the interaction between HFD and ADP. Interestingly, when pyruvate was replaced by palmitoylcarnitine, thus feeding acetyl-CoA into the Krebs cycle independently of PDH, the peroxide removal by mitochondria from both *Nnt*^{+/+} and *Nnt*^{-/-} mice matched each other and was not affected by a

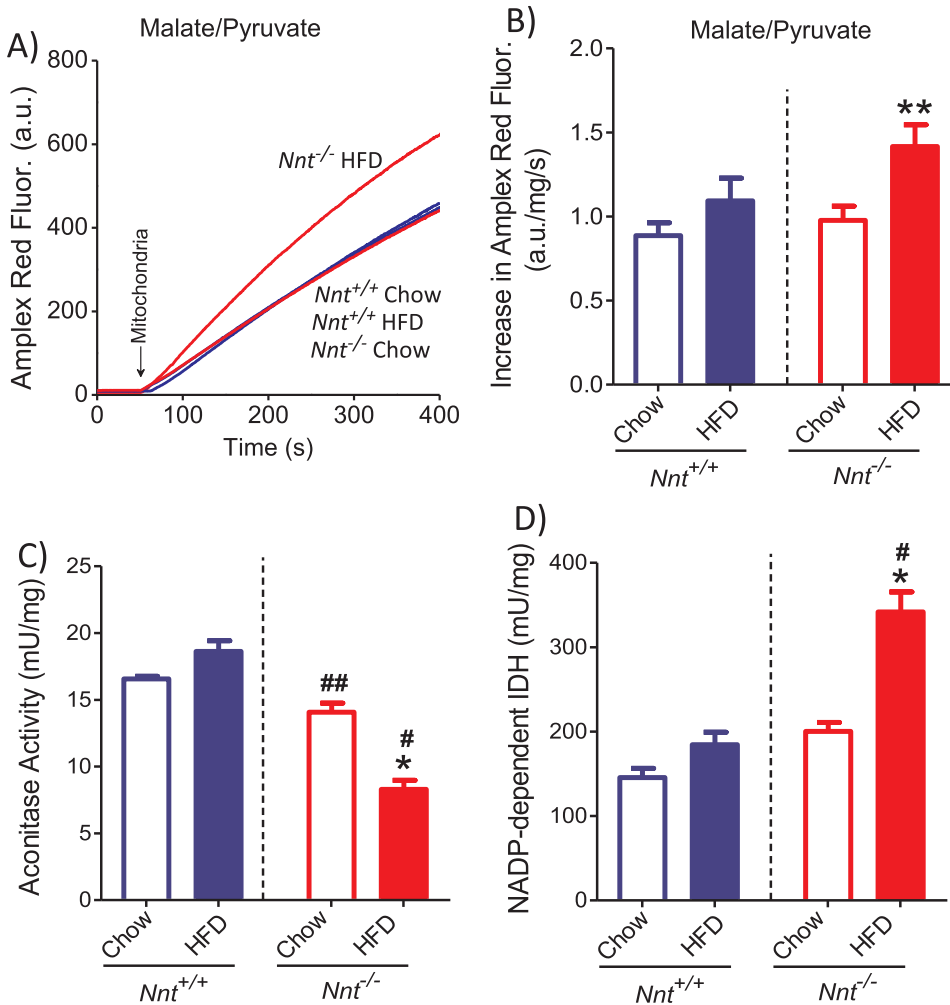


Fig. 3. A high fat diet (HFD) increased the mitochondrial release of H₂O₂ and changed the activities of aconitase and IDH2 in *Nnt*^{-/-} mice only. The release of H₂O₂ from mitochondria was assessed with the fluorescent probe Amplex Red[®] in the presence of 2.5 mM malate and 5 mM pyruvate as substrates, according to representative traces that are shown in panel A (a sample of isolated mitochondria (0.5 mg/mL) was added to the system where indicated by the arrow). The mean (+ SEM) rate of increase in fluorescence due to Amplex Red oxidation into resorufin are shown in panel B (N = 5–8). The maximal activities of aconitase (an enzyme sensitive to the mitochondrial oxidative balance) and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH2, a concurrent NADPH source in the mitochondrial matrix) were determined in stock suspensions of isolated mitochondria, with their mean (+ SEM) values shown in panels C (N = 6–10) and D (N = 10–17). **P ≤ 0.05, *P ≤ 0.01 vs. genotype-matched chow-fed mice; ##P ≤ 0.05, #P ≤ 0.01 vs. *Nnt*^{+/+} mice given the same diet.

supported peroxide removal in liver mitochondria, mitochondrial redox imbalance and the exacerbation of NAFLD activity. The only variable not exhibiting an effect was the “Increase in time to scavenge peroxide in the ADP presence state”; particularly in this experimental condition, PDH can be reactivated and the NNT reaction is thermodynamically disfavored, which results in null contribution of NNT to NADPH-dependent peroxide removal [17], thus, NADPH supply will rely on pyruvate oxidation.

6. Discussion

Mitochondrial redox imbalance has been generally considered to be an important feature of HFD-induced NAFLD and is implicated in the progression of simple liver steatosis to NASH [7,9]. Despite systemic treatments with a variety of antioxidants appear to ameliorate liver steatosis and damage in NAFLD [10,42], the role that oxidative stress in the mitochondrial compartment plays in NAFLD pathophysiology remains incompletely understood. In the current study, using a congenic NNT-null mice model (with genetically suitable controls), we showed that the disruption of NADPH-dependent peroxide removal in mitochondria aggravated the severity of mitochondrial redox imbalance and NAFLD following a HFD, causing the progression from simple steatosis to NASH (Figs. 1 and 2). It is worth noting that the C57BL/6J mice on a HFD exhibited worse hepatic injuries (e.g., fibrosis, acinar and portal inflammation) than *Nnt*^{-/-} congenic mice given the same diet (Figs. 1 and 2), mice which carry the related C57BL/6JUnib genetic background (there are 28% of difference between our congenic mice and the C57BL/6J substrain in a marker panel of 150 single nucleotide

polymorphism, see the Material and Methods section). Thus, C57BL/6J mice likely possess other genetic modifiers [26] in addition to their *Nnt* mutation that may explain their aggravated NAFLD phenotype when on a HFD, but we are not aware of any other known genetic modifier that has been experimentally established between the two studied C57BL/6 mice substrains. Other studies have compared metabolic responses of different substrains of C57BL/6 mice to HFDs [23,28,29]. Despite previous direct comparisons between mice substrains that are wild type and mutant for *Nnt* (e.g. C57BL/6N-*Nnt*^{WT} vs. C57BL/6J-*Nnt*^{MUT}), questions remains as to whether the *Nnt* genotype was indeed the unique determinant of the outcomes that eventually differed between mice substrains. It must be reminded that there are significant genetic differences between C57BL/6 mice substrains that can modify the development of complex phenotypes in living animals [43,44], such as glucose metabolism, obesity and fatty liver disease following a HFD [23,28,29]. Indeed, our results regarding HFD-induced NAFLD in *Nnt*^{-/-} and C57BL/6J mice reinforce the theoretical concern about the need of using genetically suitable control mice. This is the first study that used genetically suitable control mice to investigate the role of NNT in the development of NAFLD following a HFD. Therefore, our data shed light on the critical evaluation of research findings from different mice substrains that carry distinct *Nnt* genotypes.

The oxidation of NADH, isocitrate, malate and glutamate by NNT, IDH2, NADP-dependent malic enzymes and glutamate dehydrogenase, respectively, are the known sources of NADPH that sustains reductive functions such as peroxide and xenobiotic removal in liver mitochondria, with NNT and IDH2 exhibiting the highest activities [17]. Under most respiratory conditions, NNT supported the largest portion of

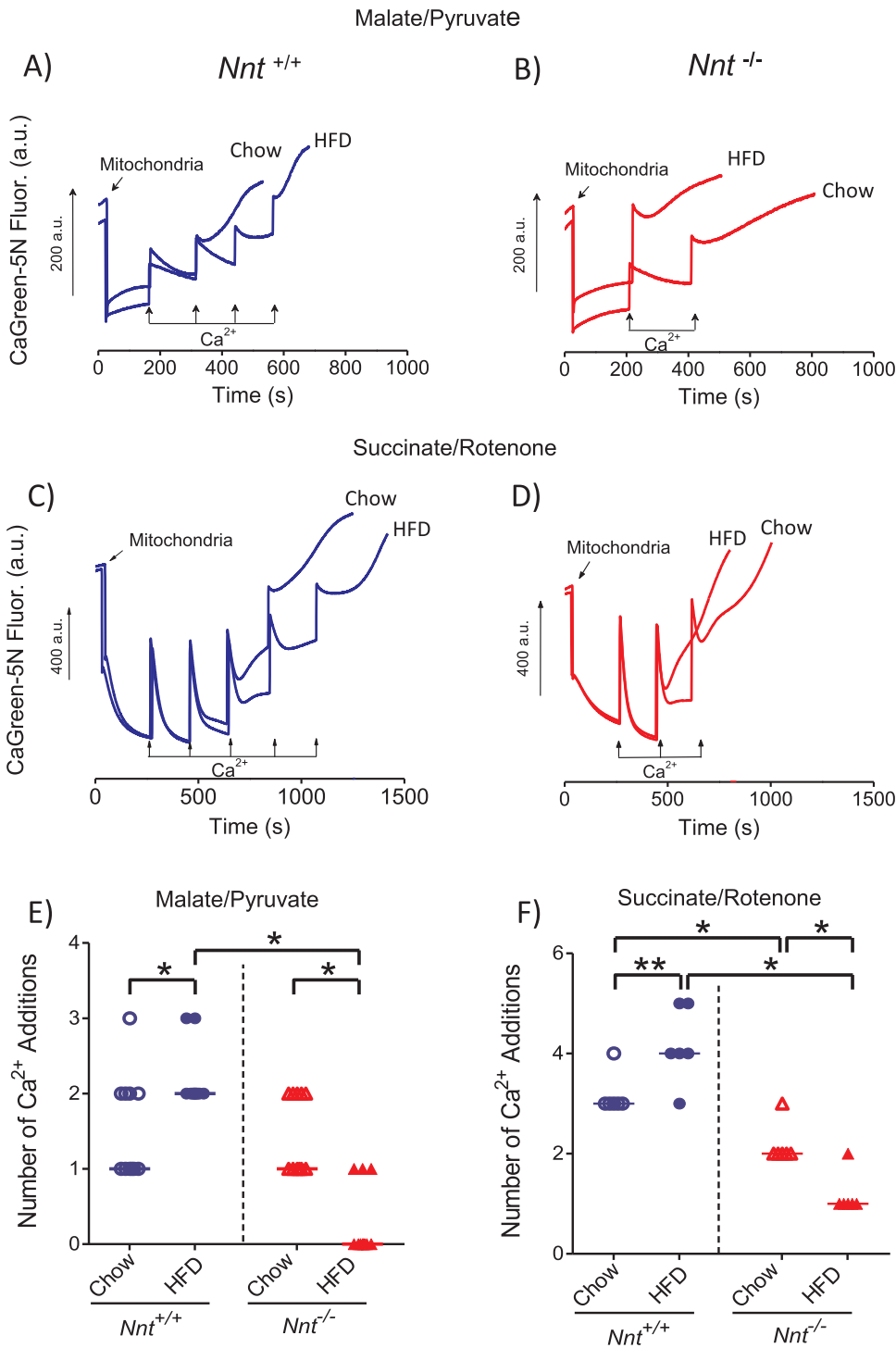
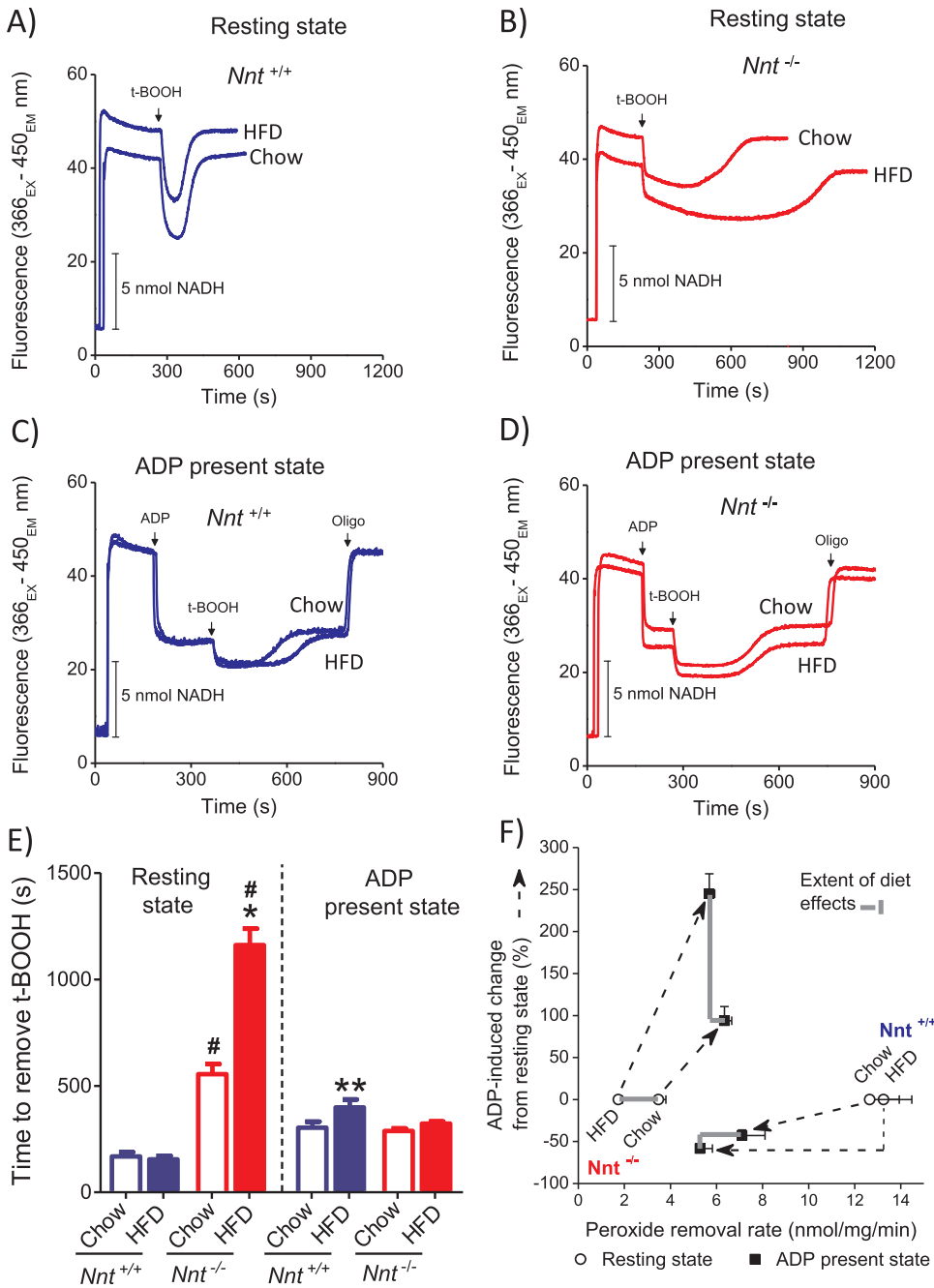


Fig. 4. The *Nnt* genotype modifies the effects of a high fat diet (HFD) on Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening. Mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated in standard reaction medium supplemented with a fluorescent Ca²⁺ probe (0.2 μM Calcium Green™-5N), 15 μM EGTA and respiratory substrates (2.5 mM malate plus 5 mM pyruvate or 5 mM succinate plus 1 μM rotenone). After the addition of mitochondria to the system, Ca²⁺-induced Ca²⁺ release as a consequence of the opening of PTP was assessed by adding consecutive pulses of Ca²⁺ (2.5 μM and 15 μM for malate plus pyruvate or succinate plus rotenone conditions, respectively) until overt Ca²⁺ release from mitochondria was observed, as depicted in representative traces in panels A to D. Panels A-B and C-D are, the malate plus pyruvate or the succinate plus rotenone conditions, respectively. The individual and median numbers of Ca²⁺ pulses added prior the release of Ca²⁺ from mitochondria of each group are shown in panels E (N = 11) and F (N = 5–6). Brackets in panels E and F denote significant differences between groups (*^{*}P ≤ 0.05, ^{**}P ≤ 0.01).

NADPH-dependent peroxide removal in liver mitochondria from chow-fed mice [17]. The mitochondrial supply of NADPH via non-NNT sources relies on the oxidation of carbon substrates and is expected to be thermodynamically disfavored under conditions of low NAD⁺ availability, such as in western diets [45] or respiratory inhibition [13,17]. With this in mind, the present data provides evidence that NNT plays a pivotal role in maintaining redox homeostasis in liver mitochondria challenged by a chronic HFD. Decreased aconitase activity, an endogenous marker of oxidative imbalance, and PDH inhibition primarily arose due to the combination of the *Nnt* mutation and HFD (Figs. 3C and 7F). This inhibition of PDH, as determined by western blot and functional assessment (Fig. 6), caused the impairment of pyruvate-

supported peroxide removal (Fig. 5B). In the absence of NNT, pyruvate oxidation through PDH will be important for mitochondrial peroxide removal because it feeds acetyl-CoA into Krebs cycle, thus, forming isocitrate to support NADP⁺ reduction to NADPH by IDH2. Therefore, in the absence of NNT function, an amplifying cycle between redox imbalance-induced PDH inhibition and PDH inhibition-induced redox imbalance seems to underpin the worsened phenotype of NAFLD induced by the HFD (Figs. 1 and 2).

Despite probing the inhibitory phosphorylation of PDH E1-α subunit at serine²⁹³, which was not identified in *Nnt*^{+/+} mice mitochondria following HFD (Fig. 7F), we obtained an indirect evidence that pyruvate flux through liver PDH was slightly inhibited in this mouse



group (peroxide removal assayed in the presence of ADP) (Fig. 5E), which was in agreement with a study that observed HFD-induced PDH inhibition in *Nnt* wild type rodents [4]. Nevertheless, because of the NNT properties mentioned above and elsewhere [17,18], suppressed pyruvate oxidation via PDH is expected to limit peroxide removal only in mitochondria devoid of NNT or during respiratory states eliciting no net formation of NADPH via NNT, such as during ADP phosphorylation sustained by pyruvate oxidation [17]. Considering the latter condition, it is important to remind that ADP itself can promote PDH reactivation [46], lessening its prior HFD-induced inhibition and deleterious effects on peroxide removal. Molecular mechanisms of PDH inhibition by phosphorylation have been studied in different cell types and support the idea that oxidative stress affects PDH function [47,48]. A possible pathway leading to decreased PDH activity involves an interplay between inflammatory and redox signals that converge on activating kinases such as c-Jun N-terminal kinases (JNK) [48], ultimately resulting

in the phosphorylation of PDH [47], which possess three different serine residues as targets [41]. A more specific mechanism of PDH phosphorylation has been revealed in a mouse model that expectedly also lacks functional *Nnt* [3]; this study showed that pyruvate dehydrogenase kinase 2 expression increases in response to a HFD and, in turn, promotes the phosphorylation and inhibition of PDH [3]. However, the mechanisms through which pyruvate dehydrogenase kinase 2 is upregulated remains unclear. The importance of PDH inhibition in NAFLD pathophysiology has been established by recent studies showing that PDH activation, by means of molecular or pharmacological suppression of PDH phosphorylation, significantly ameliorated metabolic control and hepatic steatosis in mice on HFD [3,11,12]. As these studies reported the use of mice that are expected to carry a *Nnt*-mutated genetic background (i.e., from the C57BL/6J substrain), our current findings suggest that the mechanisms underlying the improvement of metabolic control and NAFLD resulting from PDH activation [3,11,12]

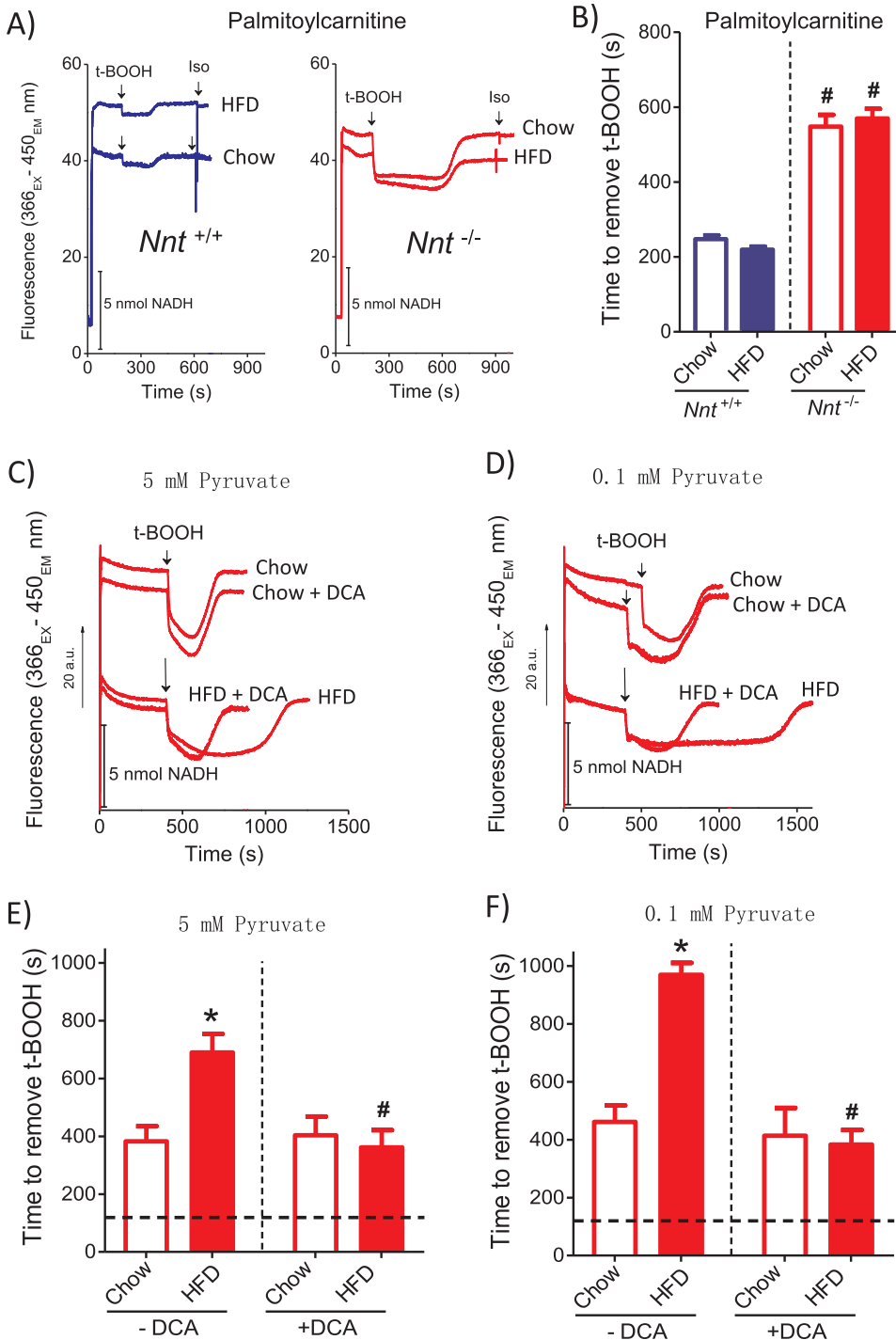


Fig. 6. Bypass or pharmacological reactivation of pyruvate dehydrogenase restored the peroxide removal capability of mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice under a high fat diet (HFD). The endogenous fluorescence NAD(P) in the reduced state was continuously monitored over time in mitochondria incubated in standard reaction medium supplemented with EGTA (300 μ M) and malate (2.5 mM); some traces (HFD groups, Panels C and D) were displaced downwards in the plots to facilitate reading. Palmitoylcarnitine (15 μ M) or pyruvate (0.1 or 5 mM) were the respiratory substrates, as specified in the panels. Palmitoylcarnitine was used to sustain substrate flux through the Krebs cycle independently of pyruvate dehydrogenase (PDH). One millimolar dichloroacetate (DCA, a PDH kinase inhibitor that results in PDH activation) was present (“+DCA”) or absent (Control; “-DCA”) from the beginning of the incubation in the experiments with pyruvate plus malate as substrates. The representative traces in panel A depict the addition of isolated mitochondria (0.5 mg/mL), 15 μ M tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH, an organic peroxide) and 1 mM isocitrate (a NAD(P) reductant) to the system where indicated, with palmitoylcarnitine plus malate as substrates. The time spent to recover the reduced state of NAD (P) following the addition of the t-BOOH load (i.e., the ability of mitochondria to scavenge peroxide) is shown in panel B. Similarly, panels C and D depict traces from the malate plus pyruvate conditions, where 10 μ M t-BOOH was added to the system after a 5 min preincubation of mitochondria (0.5 mg/mL). The time spent to recover the reduced state of NAD (P) following the addition of the t-BOOH load is shown in panels E (N = 5–8) and F (N = 7–13). The horizontal dashed lines represent the values of chow-fed *Nnt*^{+/+} mice mitochondria in the same experimental condition. DCA treatment did not modify t-BOOH removal capacity in mitochondria from *Nnt*^{+/+} regardless of the diet (Supplementary material). ^{*}*P* \leq 0.01 vs. chow-fed mice in the absence of DCA; [#]*P* \leq 0.01 vs. *Nnt*^{-/-} on HFD in the absence DCA.

may include the restoration of redox balance in liver mitochondria and its broad beneficial secondary effects on related cellular processes.

As discussed above, we report here a redox-mediated interaction between the metabolic challenging condition imposed by a HFD and NNT, which results in PDH inhibition. Interestingly, Fisher-Wellman et al. [49] have recently identified another link between the functions of NNT and PDH, which is also redox mediated in skeletal muscle mitochondria from standard chow-fed mice. These authors reported an energy consuming redox circuit operating between PDH and NNT, based on the following rationale: the reductive pressure of pyruvate on PDH stimulates the production of H₂O₂ by this enzyme; the generated H₂O₂ will be detoxified at the expense of NADPH oxidation, which will result in stimulation of NNT activity, increased H⁺ re-entry back to

mitochondrial matrix and higher respiratory rate. Thus, PDH may be considered both a target that is affected by mitochondrial redox imbalance and a source of H₂O₂ contributing to redox imbalance under some conditions.

Along with results from studies on heart biology [30] and disease [50], the data presented here are seminal experimental evidences that the *Nnt* mutation by itself modified the results of an *in vivo* experimental intervention. Therefore, these findings are of pivotal importance, since research communities in various biomedical areas have increasingly become aware that a large contingent of experimental data have been obtained in diverse mouse models that carry the *Nnt* mutation from the C57BL/6J mouse substrain [11,22,25,39,42,45,51]. When the widely used C57BL/6J inbred mice substrain was discovered to bear a

Table 1
Contents of NADPH following t-BOOH-induced NADPH oxidation in liver mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD.

Conditions	15 μ M t-BOOH	NADPH (nmol/mg)
Malate + Pyruvate	no	1.97 \pm 0.18
Malate + Pyruvate	yes	0.39 \pm 0.03*
Malate + Pyruvate + ADP	yes	2.19 \pm 0.33
Malate + Pyruvate + DCA	yes	1.91 \pm 0.14
Malate + Palmitoylcarnitine	no	1.86 \pm 0.17
Malate + Palmitoylcarnitine	yes	1.92 \pm 0.24

Liver mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a HFD (0.5 mg/mL) were incubated in standard reaction medium supplemented with 300 μ M EGTA. Respiratory substrates were either 2.5 mM malate plus 5 mM pyruvate or 2.5 mM malate plus 15 μ M palmitoylcarnitine; also, ADP (1 mM) or DCA (1 mM) were absent or present in order to resemble the experiments depicted in Figs. 5D, 6A and 6C. The mitochondrial suspensions were pre-incubated for 7 min prior the addition of t-BOOH; 10–11 min afterwards, samples were withdrawn and enzymatically analyzed for reduced NADP levels. Data are means \pm standard error (N = 4). * P < 0.01 compared to all other conditions.

spontaneous and homozygous loss-of-function *Nnt* mutation in 2005 [21,31], the basic biochemistry of NNT function had already been characterized, such that the reagents, products and cellular location of the NNT reaction were known [13,52]. The results from the first two studies reporting this *Nnt* mutation suggested that it could be linked to impaired glucose homeostasis [21] and an abnormal phenotype of genetically engineered mice [31]. Ever since, innumerable studies have continued to use mice carrying the C57BL/6J genetic background as models of metabolic diseases, including fatty liver diseases [11,22,39,42,45,51]. Undeniably, there is a scientific conundrum regarding the experimental use of *Nnt*-mutated mice as wild-type, which deserves attention from researchers [25,27,53,54].

In summary, we showed that the decrease in mitochondrial NADPH-dependent peroxide removal in the absence of functional NNT, due to *Nnt* mutation, altered the adaptations of liver mitochondria to a HFD. Notably, the interaction between HFD and the *Nnt* mutation resulted in redox imbalance, higher susceptibility to permeability transition pore opening and an inhibition of pyruvate oxidation via PDH in liver mitochondria, which was accompanied by an aggravation of NAFLD from simple steatosis to NASH. Thus, NNT seems to play a critical role in

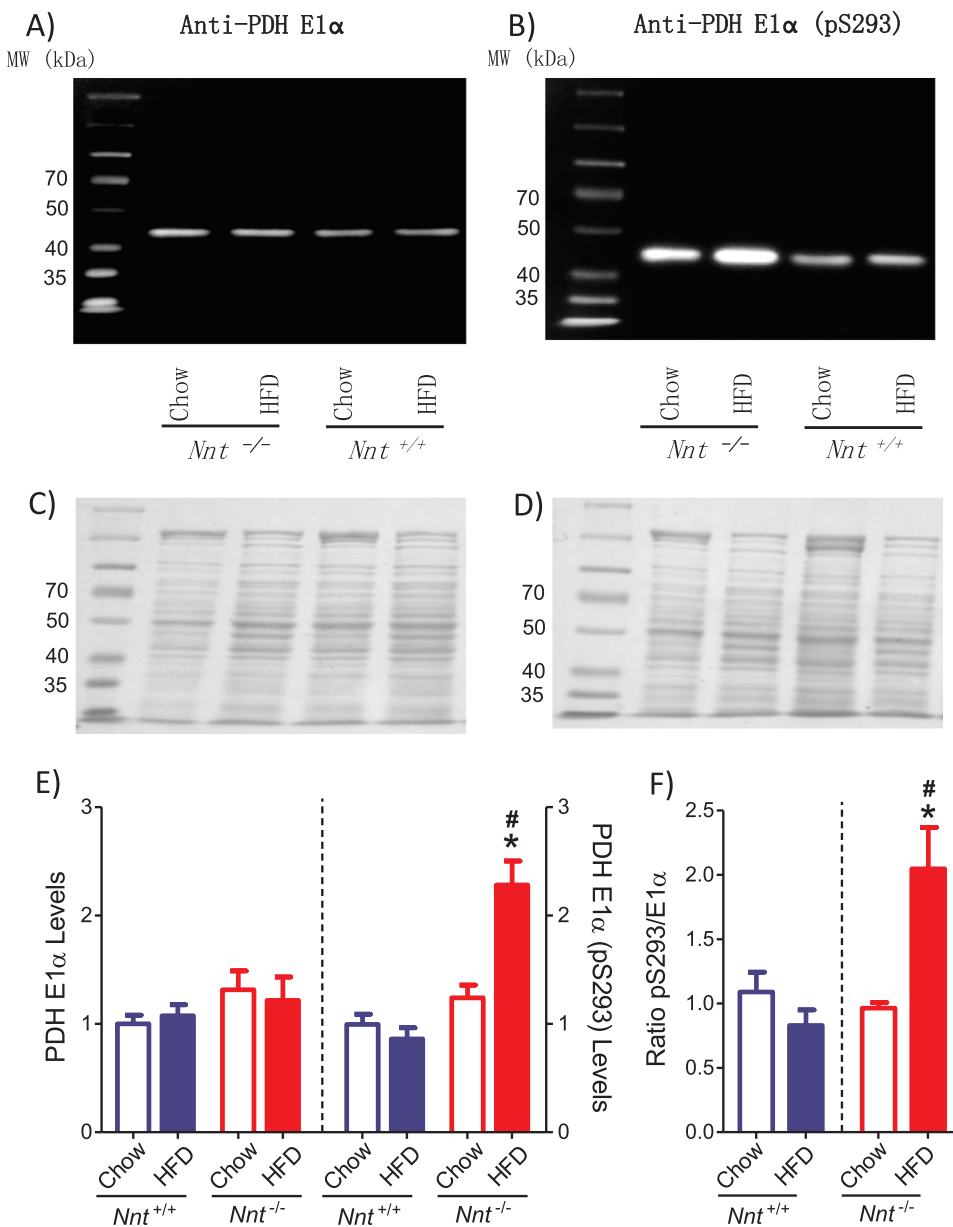


Fig. 7. A high fat diet (HFD) led to the phosphorylation of pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 α subunit only in the liver mitochondria of *Nnt*^{-/-} mice. Isolated mitochondria samples (50 μ g) were probed for the relative levels of PDH-E1 α (a subunit of the PDH complex) and serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α by SDS-PAGE/western blot. Panels A and B show representative bands (~43 kDa, predicted) obtained with the primary antibodies against PDH-E1 α and serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α , respectively; molecular weight markers are on the left lanes. A protein loading control was evaluated by staining the membrane with Ponceau as demonstrated in panels C and D. Panel E shows the mean \pm SEM (N = 5–9) of the relative levels of PDH-E1 α and serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α , calculated as the optical density of the bands normalized by the optical density of their respective loading controls. The ratios between the levels of PDH-E1 α and serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α depict the PDH phosphorylation state in panel F (N = 5–9). *P \leq 0.01 vs. genotype-matched chow-fed mice; #P \leq 0.01 vs. *Nnt*^{+/+} mice given the same diet.

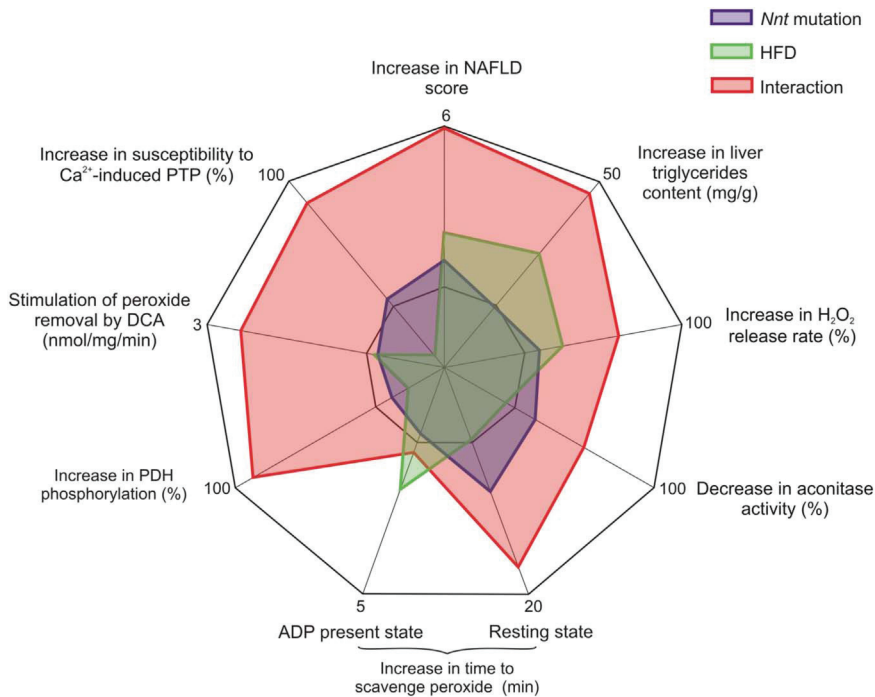


Fig. 8. Graphical summary of the effects of the *Nnt* mutation, high fat diet (HFD) and interaction between them on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and mitochondrial functions. The effects of *Nnt* mutation were the differences between the mean values observed in *Nnt*^{+/+} and in *Nnt*^{-/-} mice groups, both given a chow diet. The effects of HFD were the differences between the mean values observed in chow-fed *Nnt*^{+/+} mice and in *Nnt*^{+/+} mice on a HFD. The effects of the interaction between the *Nnt* mutation and a HFD were the differences between the mean values observed in chow-fed *Nnt*^{+/+} mice and in *Nnt*^{-/-} mice on a HFD. Each spoke of the radar chart is an axel representing the absolute or relative changes in a given variable; grid lines are shown at zero and maximal scale values only; the higher the distances from the zero line, the higher were the deleterious effects; values below zero indicate changes in opposite directions (i.e., of protection), and the only variable significantly altered in this direction was “Ca²⁺-induced permeability transition (PTP)” in response to HFD. The changes in H₂O₂ release rate, aconitase activity, pyruvate dehydrogenase (PDH) phosphorylation and susceptibility to Ca²⁺-induced PTP (measured using malate plus pyruvate as substrates) are expressed in percentages and their scale amplitudes vary between -50% and 100%; the changes in the other variables are expressed in absolute units with upper limits that are shown next to their axes (the origin of each axel is equal to its upper limit value multiplied by -0.5). All data used to build this radar chart were shown in Figs. 1–7. The NAFLD score was the sum of all histological grades depicted in Fig. 2.

counteracting mitochondrial redox imbalance and NAFLD following HFD. These findings implicate that mice models carrying mutated *Nnt*, such as C57BL/6J, can bias results and must not be overlooked when planning or interpreting studies on HFD-induced NAFLD.

Acknowledgments

We are thankful to Rosana A. T. Pereira from the laboratory of *Anatomia Patológica* (FCM/UNICAMP) for assisting with the preparation of liver slides for histological analyses.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant numbers 11/50400-0 and 13/07607-8). Fellowships were granted to TRF (from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, CNPq #150546/2015-7), to AF (from FAPESP, #15/22063-0) and to JCR (from FAPESP, #14/02819-0).

Conflicts of interest

None

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.026>.

References

- [1] R.T. Hurt, C. Kulisek, L.A. Buchanan, S.A. McClave, The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists, *Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2011) 780–792.
- [2] R. Buettner, J. Scholmerich, L.C. Bollheimer, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents, *Obesity* 15 (2007) 798–808.
- [3] Y. Go, J.Y. Jeong, N.H. Jeoung, J.H. Jeon, B.Y. Park, H.J. Kang, C.M. Ha, Y.K. Choi, S.J. Lee, H.J. Ham, B.G. Kim, K.G. Park, S.Y. Park, C.H. Lee, C.S. Choi, T.S. Park, W.N. Lee, R.A. Harris, I.K. Lee, Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase 2 protects against hepatic steatosis through modulation of TCA cycle anaplerosis and ketogenesis, *Diabetes* 65 (2016) 2876–2887.

- [4] T.C. Alves, D.E. Befroy, R.G. Kibbey, M. Kahn, R. Codella, R.A. Carvalho, K. Falk Petersen, G.I. Shulman, Regulation of hepatic fat and glucose oxidation in rats with lipid-induced hepatic insulin resistance, *Hepatology* 53 (2011) 1175–1181.
- [5] S. Satapati, B. Kucejova, J.A. Duarte, J.A. Fletcher, L. Reynolds, N.E. Sunny, T. He, L.A. Nair, K. Livingston, X. Fu, M.E. Merritt, A.D. Sherry, C.R. Malloy, J.M. Shelton, J. Lambert, E.J. Parks, I. Corbin, M.A. Magnuson, J.D. Browning, S.C. Burgess, Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver, *J. Clin. Investig.* 125 (2015) 4447–4462.
- [6] T. Schroder, D. Kucharczyk, F. Bar, R. Pagel, S. Derer, S.T. Jendrek, A. Sunderhauf, A.K. Brethack, M. Hirose, S. Moller, A. Kunstner, J. Bischof, I. Weyers, J. Heeren, D. Koczan, S.M. Schmid, S. Divanovic, D.A. Giles, J. Adamski, K. Fellermann, H. Lehnert, J. Kohl, S. Ibrahim, C. Sina, Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis, *Mol. Metab.* 5 (2016) 283–295.
- [7] P.A. Kakimoto, A.J. Kowaltowski, Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance, *Redox Biol.* 8 (2016) 216–225.
- [8] V. Ribas, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa, Glutathione and mitochondria, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 151.
- [9] K. Begriche, J. Massart, M.A. Robin, F. Bonnet, B. Fromenty, Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 58 (2013) 1497–1507.
- [10] S. Spahis, E. Delvin, J.M. Borys, E. Levy, Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis, *Antioxid. Redox Signal.* 26 (2017) 519–541.
- [11] B. Hwang, N.H. Jeoung, R.A. Harris, Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet, *Biochem. J.* 423 (2009) 243–252.
- [12] S.C. Tso, X. Qi, W.J. Gui, C.Y. Wu, J.L. Chuang, I. Wernstedt-Asterholm, L.K. Morlock, K.R. Owens, P.E. Scherer, N.S. Williams, U.K. Tambar, R.M. Wynn, D.T. Chuang, Structure-guided development of specific pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors targeting the ATP-binding pocket, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 4432–4443.
- [13] J. Rydstrom, Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 721–726.
- [14] T.R. Figueira, M.H. Barros, A.A. Camargo, R.F. Castilho, J.C. Ferreira, A.J. Kowaltowski, F.E. Sluse, N.C. Souza-Pinto, A.E. Vercesi, Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2029–2074.
- [15] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, *FEBS Lett.* 495 (2001) 12–15.
- [16] A.E. Vercesi, The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 252 (1987) 171–178.
- [17] J.A. Ronchi, A. Francisco, L.A. Passos, T.R. Figueira, R.F. Castilho, The contribution of nicotinamide nucleotide transhydrogenase to peroxide detoxification is dependent on the respiratory state and counterbalanced by other sources of NADPH in liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 20173–20187.
- [18] J.A. Ronchi, T.R. Figueira, F.G. Ravagnani, H.C. Oliveira, A.E. Vercesi, R.F. Castilho, A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities, *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 446–456.

- [19] B.A. Paim, J.A. Velho, R.F. Castilho, H.C. Oliveira, A.E. Vercesi, Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 444–451.
- [20] H.C. Oliveira, R.G. Cosso, L.C. Alberici, E.N. Maciel, A.G. Salerno, G.G. Dorighello, J.A. Velho, E.C. de Faria, A.E. Vercesi, Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria, *FASEB J.* 19 (2005) 278–280.
- [21] A.A. Toye, J.D. Lippiat, P. Proks, K. Shimomura, L. Bentley, A. Huggill, V. Mijat, M. Goldsworthy, L. Moir, A. Haynes, J. Quarterman, H.C. Freeman, F.M. Ashcroft, R.D. Cox, A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice, *Diabetologia* 48 (2005) 675–686.
- [22] C. Poussin, M. Ibberson, D. Hall, J. Ding, J. Soto, E.D. Abel, B. Thorens, Oxidative phosphorylation flexibility in the liver of mice resistant to high-fat diet-induced hepatic steatosis, *Diabetes* 60 (2011) 2216–2224.
- [23] A. Nicholson, P.C. Reifsnnyder, R.D. Malcolm, C.A. Lucas, G.R. MacGregor, W. Zhang, E.H. Leiter, Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene, *Obesity* 18 (2010) 1902–1905.
- [24] A. Vitali, I. Murano, M.C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier, S. Cinti, The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 619–629.
- [25] D.A. Fontaine, D.B. Davis, Attention to background strain is essential for metabolic research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium, *Diabetes* 65 (2016) 25–33.
- [26] K. Mekada, K. Abe, A. Murakami, S. Nakamura, H. Nakata, K. Moriwaki, Y. Obata, A. Yoshiki, Genetic differences among C57BL/6 substrains, *Exp. Anim.* 58 (2009) 141–149.
- [27] A. Kraev, Parallel universes of Black Six biology, *Biol. Direct* 9 (2014) 18.
- [28] K.H. Fisher-Wellman, T.E. Ryan, C.D. Smith, L.A. Gilliam, C.T. Lin, L.R. Reese, M.J. Torres, P.D. Neuffer, A Direct comparison of metabolic responses to high fat diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ mice, *Diabetes* 65 (2016) 3249–3261.
- [29] E. Rendina-Ruedy, K.D. Hembree, A. Sasaki, M.R. Davis, S.A. Lightfoot, S.L. Clarke, E.A. Lucas, B.J. Smith, A Comparative study of the metabolic and skeletal response of C57BL/6J and C57BL/6N mice in a diet-induced model of type 2 diabetes, *J. Nutr. Metab.* 2015 (2015) 758080.
- [30] A. Kim, C.H. Chen, P. Ursell, T.T. Huang, Genetic modifier of mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice delays heart failure and prolongs survival, *Mamm. Genome* 21 (2010) 534–542.
- [31] T.T. Huang, M. Naemuddin, S. Elchuri, M. Yamaguchi, H.M. Kozy, E.J. Carlson, C.J. Epstein, Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 1187–1194.
- [32] Y. Kamada, S. Kiso, Y. Yoshida, N. Chatani, T. Kizu, M. Hamano, M. Tsubakio, T. Takemura, H. Ezaki, N. Hayashi, T. Takehara, Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (2011) G1031–G1043.
- [33] M. Ganz, T. Csak, G. Szabo, High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 8525–8534.
- [34] D.E. Kleiner, E.M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M.J. Contos, O.W. Cummings, L.D. Ferrell, Y.C. Liu, M.S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A.J. McCullough, A.J. Sanyal, Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 41 (2005) 1313–1321.
- [35] H. Chweih, R.F. Castilho, T.R. Figueira, Tissue and sex specificities in Ca(2+) handling by isolated mitochondria in conditions avoiding the permeability transition, *Exp. Physiol.* 100 (2015) 1073–1092.
- [36] P.R. Gardner, D.D. Nguyen, C.W. White, Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 12248–12252.
- [37] Y. Chen, J. Cai, D.P. Jones, Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant-induced cell death, *FEBS Lett.* 580 (2006) 6596–6602.
- [38] H. Liu, J.P. Kehrer, The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 433–442.
- [39] Y. Zhang, Z. Zhao, B. Ke, L. Wan, H. Wang, J. Ye, Induction of posttranslational modifications of mitochondrial proteins by ATP contributes to negative regulation of mitochondrial function, *PLoS One* 11 (2016) e0150454.
- [40] C. Crewe, M. Kinter, L.I. Szweda, Rapid inhibition of pyruvate dehydrogenase: an initiating event in high dietary fat-induced loss of metabolic flexibility in the heart, *PLoS One* 8 (2013) e77280.
- [41] M.J. Rardin, S.E. Wiley, R.K. Naviaux, A.N. Murphy, J.E. Dixon, Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex, *Anal. Biochem.* 389 (2009) 157–164.
- [42] J.R. Mercer, E. Yu, N. Figg, K.K. Cheng, T.A. Prime, J.L. Griffin, M. Masoodi, A. Vidal-Puig, M.P. Murphy, M.R. Bennett, The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM+/-/ApoE-/- mice, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 841–849.
- [43] M.M. Simon, S. Greenaway, J.K. White, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, S. Wells, T. Sorg, K. Wong, E. Bedu, E.J. Cartwright, R. Dacquin, S. Djebali, J. Estabel, J. Graw, N.J. Ingham, I.J. Jackson, A. Lengeling, S. Mandillo, J. Marvel, H. Mezziane, F. Preitner, O. Puk, M. Roux, D.J. Adams, S. Atkins, A. Ayadi, L. Becker, A. Blake, D. Brooker, H. Cater, M.F. Champy, R. Combe, P. Danecek, A. di Fenza, H. Gates, A.K. Gerdin, E. Golini, J.M. Hancock, W. Hans, S.M. Holter, T. Hough, P. Jurdic, T.M. Keane, H. Morgan, W. Muller, F. Neff, G. Nicholson, B. Pasche, L.A. Roberson, J. Rozman, M. Sanderson, L. Santos, M. Selloum, C. Shannon, A. Southwell, P.P. Tocchini-Valentini, V.E. Vancollie, H. Westerberg, W. Wurst, M. Zi, B. Yalcin, R. Ramirez-Solis, K.P. Steel, A.M. Mallon, M.H. de Angelis, Y. Herauld, S.D. Brown, A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains, *Genome Biol.* 14 (2013) R82.
- [44] J.T. Heiker, A. Kunath, J. Kosacka, G. Flehmig, A. Knigge, M. Kern, M. Stumvoll, P. Kovacs, M. Blüher, N. Kloting, Identification of genetic loci associated with different responses to high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N and C57BL/6J substrains, *Physiol. Genom.* 46 (2014) 377–384.
- [45] K. Gariani, K.J. Menzies, D. Ryu, C.J. Wegner, X. Wang, E.R. Ropelle, N. Moullan, H. Zhang, A. Perino, V. Lemos, B. Kim, Y.K. Park, A. Piersigilli, T.X. Pham, Y. Yang, C.S. Ku, S.I. Koo, A. Fomitchova, C. Canto, K. Schoonjans, A.A. Sauve, J.Y. Lee, J. Auwerx, Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice, *Hepatology* 63 (2016) 1190–1204.
- [46] M.L. Pratt, T.E. Roche, Mechanism of pyruvate inhibition of kidney pyruvate dehydrogenase kinase and synergistic inhibition by pyruvate and ADP, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 7191–7196.
- [47] Q. Zhou, P.Y. Lam, D. Han, E. Cadenas, c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons, *J. Neurochem.* 104 (2008) 325–335.
- [48] H. Kamata, S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, M. Karin, Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases, *Cell* 120 (2005) 649–661.
- [49] K.H. Fisher-Wellman, C.T. Lin, T.E. Ryan, L.R. Reese, L.A. Gilliam, B.L. Cathey, D.S. Lark, C.D. Smith, D.M. Muoio, P.D. Neuffer, Pyruvate dehydrogenase complex and nicotinamide nucleotide transhydrogenase constitute an energy-consuming redox circuit, *Biochem. J.* 467 (2015) 271–280.
- [50] A.G. Nickel, A. von Hardenberg, M. Hohl, J.R. Löffler, M. Kohlhaas, J. Becker, J.C. Reil, A. Kazakov, J. Bonnekoh, M. Stadelmaier, S.L. Puhl, M. Wagner, I. Bogeski, S. Cortassa, R. Kappel, B. Pasielka, M. Lafontaine, C.R. Lancaster, T.S. Blacker, A.R. Hall, M.R. Duchon, L. Kastner, P. Lipp, T. Zeller, C. Müller, A. Knopp, U. Laufs, M. Bohm, M. Hoth, C. Maack, Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure, *Cell Metab.* 22 (2015) 472–484.
- [51] Y. Guo, M. Darshi, Y. Ma, G.A. Perkins, Z. Shen, K.J. Haushalter, R. Saito, A. Chen, Y.S. Lee, H.H. Patel, S.P. Briggs, M.H. Ellisman, J.M. Olefsky, S.S. Taylor, Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice, *Mol. Cell Proteom.* 12 (2013) 3744–3758.
- [52] J.B. Hoek, J. Rydstrom, Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase, *Biochem. J.* 254 (1988) 1–10.
- [53] M. Bourdi, J.S. Davies, L.R. Pohl, Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 794–796.
- [54] S.J. Navarro, T. Trinh, C.A. Lucas, A.J. Ross, K.G. Waymire, G.R. Macgregor, The C57BL/6J mouse strain background modifies the effect of a mutation in Bcl2l2, *G3 (Bethesda)* 2 (2012) 99–102.

Supplementary Material

Supplementary Experimental Procedures

Aconitase activity assay: Aconitase activity produces isocitrate which is immediately oxidized in presence of exogenous isocitrate dehydrogenase and NADP^+ , thus generating NADPH that can be followed spectrofluorometrically [1]. Mitochondria (0.5 mg/mL) were added to 2 mL of a medium (36 mM Tris, 1 mM sodium citrate, 25 mM KH_2PO_4 , 0.6 mM MnCl_2 , 0.05% Triton X-100, 0.2 mM NADP^+ , 1 U/mL IDH2, pH 7.25) at 37 °C. The fluorescence of the NADPH produced was monitored over time in a spectrofluorometer (Hitachi F-4500, Tokyo, Japan) operating with slit widths of 5 nm and using 563 and 587 nm as the excitation and emission wavelengths. A calibration curve was generated with known amounts of NADH to allow for the specific enzyme activity to be calculated.

NADP-dependent IDH (IDH2) activity: Mitochondria (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated in 1 mL of a medium (33 mM Tris, 0.33 mM EDTA, 1.33 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, 0.25 mM NADP^+ , pH 7.4). The reaction was started by the addition of 1 mM isocitrate. The enzyme activity was measured by following the increase in absorbance at 340 nm (caused by the production of NADPH) at 37 °C in a spectrophotometer (UV-1800, Kyoto, Japan) [2].

Citrate synthase activity: Mitochondrial protein (4 μg) was added to the well of a 96-well microplate before the addition of 250 μL of a medium that contained 10 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 250 μM oxaloacetate, 50 μM acetyl-CoA, and 100 μM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and pH of 8.0 [3]. The increase in absorbance at 412 nm was monitored at 37 °C for 5 min using a microplate reader (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The maximal slope of the increase in absorbance and the extinction coefficient of 13.6/mM/cm were used in the calculation of specific enzyme activity after determining the optical path length, according to the manufacturer's instructions. The activity of citrate synthase was also determined in the supernatant obtained following the first centrifugation step of the mitochondrial isolation procedure. The analysis of citrate synthase activity in these two liver fractions allowed the calculation of relative mitochondrial recovery after the isolation procedure.

Supplementary Results

Supplementary Table I. Absolute and relative liver mass.

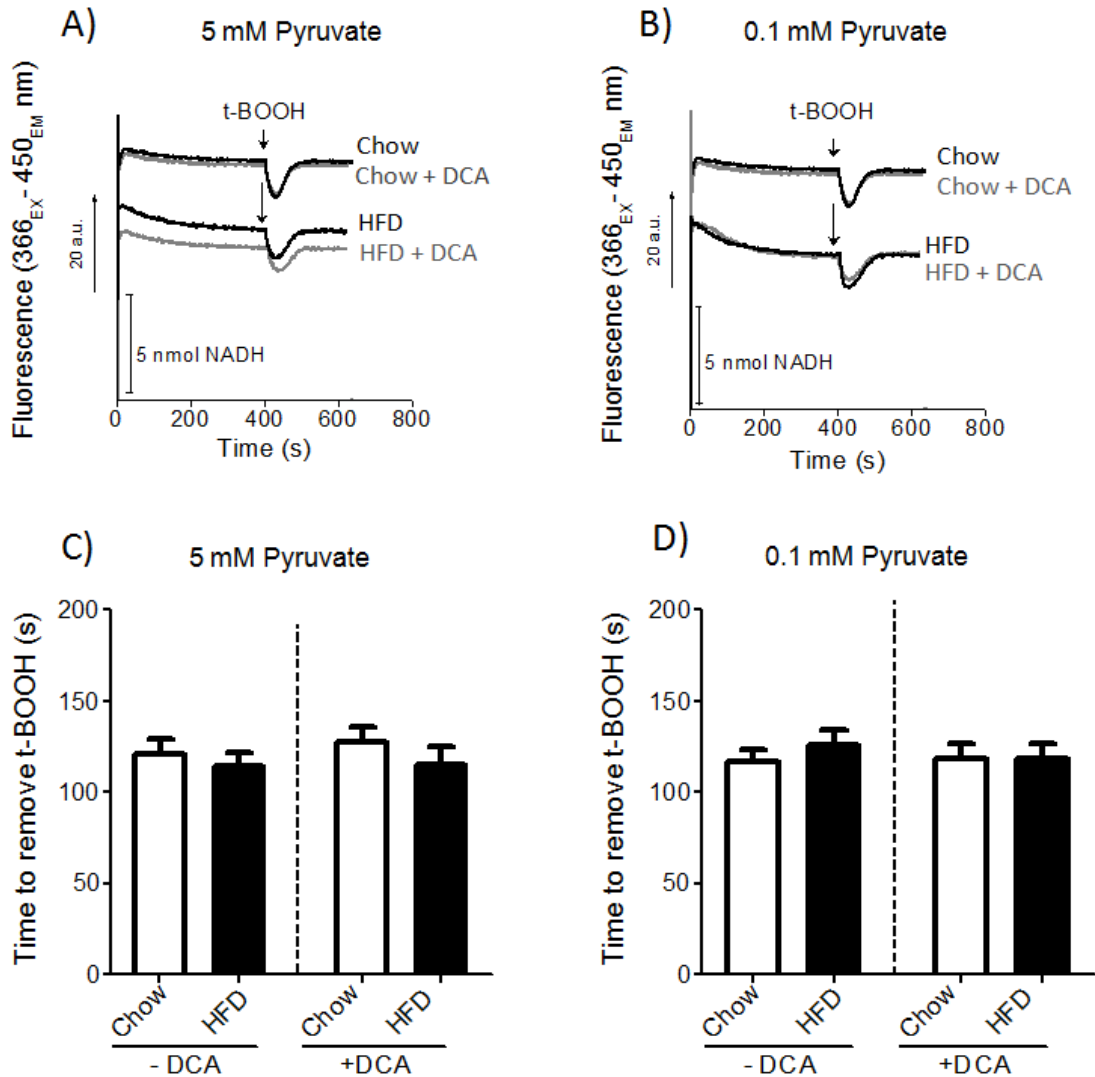
		Liver mass	Relative liver mass
		(g)	(g/100 g body mass)
<i>Nnt</i> ^{+/+}	Chow	1.66 ± 0.06	5.12 ± 0.17
	HFD	1.80 ± 0.03	4.68 ± 0.19
<i>Nnt</i> ^{-/-}	Chow	1.43 ± 0.09	4.44 ± 0.17
	HFD	1.82 ± 0.06**	4.14 ± 0.19
C57BL/6J	Chow	1.60 ± 0.05	5.39 ± 0.17
	HFD	2.17 ± 0.16* [#]	4.63 ± 0.37

Data are the mean ± SEM (N = 5). ** $P \leq 0.05$, * $P \leq 0.01$ vs. genotype-matched chow-fed mice; [#] $P \leq 0.01$ vs. *Nnt*^{+/+} on a HFD.

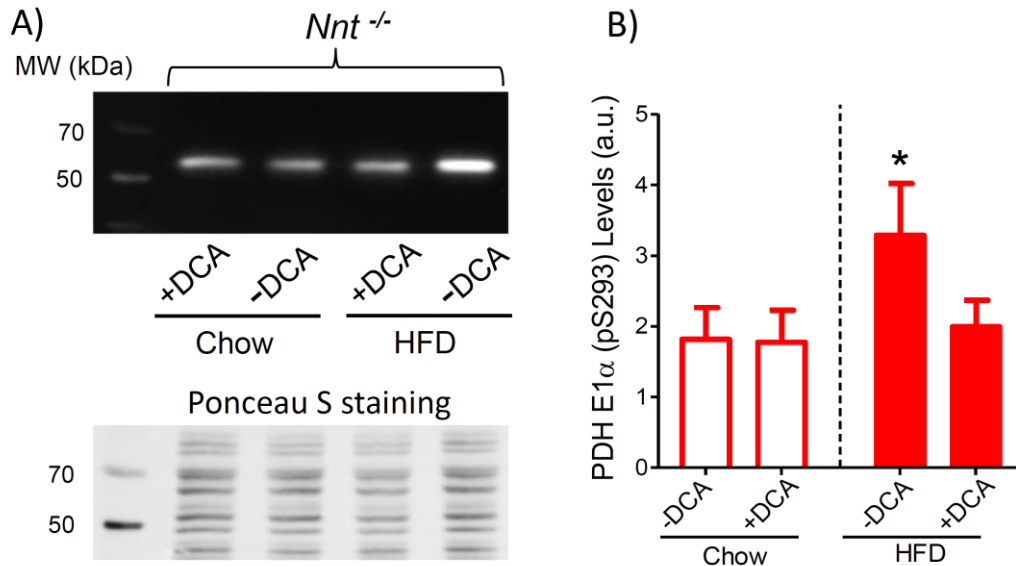
Supplementary Table II. Evaluation of mitochondrial respiratory function

	<i>Nnt</i> ^{+/+}		<i>Nnt</i> ^{-/-}	
	Chow	HFD	Chow	HFD
S3 (nmol/mg/min)	51.7 ± 5.1	51.3 ± 4.7	46.2 ± 4.3	48.0 ± 2.5
S4 (nmol/mg/min)	9.7 ± 1.1	9.9 ± 1.0	8.7 ± 0.6	10.3 ± 0.9
S4 _{oligo} (nmol/mg/min)	7.0 ± 0.7	7.7 ± 0.5	6.4 ± 0.6	6.9 ± 0.6
S _{FCCP} (nmol/mg/min)	37.3 ± 4.9	40.0 ± 4.4	37.2 ± 4.7	36.9 ± 3.6
Respiratory Control Ratio	5.6 ± 0.3	5.3 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.1
Citrate Synthase (mU/mg)	210.8 ± 18.4	227.0 ± 15.9	201.7 ± 10.0	211.0 ± 19.0

Isolated liver mitochondria were incubated in standard reaction medium supplemented with 200 μ M EGTA and NAD-linked substrates (5 mM of each: malate, glutamate, pyruvate, and α -ketoglutarate). Respiration linked to oxidative phosphorylation (also known as state 3, S3) was elicited by the addition of 150 μ M of ADP. After the phosphorylation of added ADP, mitochondrial respiration slowed down (state 4, S4), then, 1 μ g/mL of oligomycin was added to cease residual phosphorylation by ATP synthase (S4_{oligo}). Finally, 80 nM FCCP was added to promote maximal uncoupled respiration (S_{FCCP}). Respiratory control by ADP was calculated as the ratio between S3 and S4. Citrate synthase activity in isolated mitochondria was assessed in stock samples. Data are the mean \pm SEM.



Supplementary Fig. 1. Effects of the pyruvate dehydrogenase activator dichloroacetate (DCA) on peroxide removal in mitochondria from *Nnt*^{+/+} under a chow or a high fat diet (HFD). These experiments were undertaken in parallel with experiments shown in Fig. 6. The endogenous fluorescence NAD(P) in the reduced state was continuously monitored over time in mitochondria incubated in standard reaction medium supplemented with EGTA (300 μ M) and malate (2.5 mM); some traces (HFD groups, Panels A and B) were displaced downwards in the plots to facilitate reading. Pyruvate (0.1 or 5 mM) was the respiratory substrate, as specified in the panels. One millimolar DCA (a PDH kinase inhibitor that results in PDH activation) was present (“+DCA”) or absent (Control; “-DCA”) from the beginning of the incubation. The representative traces in **panels A** and **B** depict the addition of isolated mitochondria (0.5 mg/mL) and 10 μ M tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH, an organic peroxide) to the system where indicated. The time spent to recover the reduced state of NAD(P) following the addition of the t-BOOH load (i.e., the ability of mitochondria to scavenge peroxide) is shown in **panels C** and **D** (Mean + SEM, N = 5-8).

Anti-PDH E1 α (pS293)

Supplementary Fig. 2. The pyruvate dehydrogenase (PDH) activator dichloroacetate (DCA) decreases the levels of serine²⁹³ phosphorylated (S293) PDH-E1 α subunit in the liver mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a high fat diet (HFD). Liver mitochondria from *Nnt*^{-/-} mice on a standard chow or on a HFD were incubated for 5 min in the presence or absence of DCA, exactly as described in Fig. 6C. Following the incubation period, the mitochondrial suspensions were centrifuged at 10000g for 5 min at 4 °C; then, the mitochondria-containing pellet was suspended in 200 μ L of a medium containing phosphatase and protease inhibitors (described in the Material and Methods section); then, the samples were prepared and probed (25 μ g protein per lane) by SDS-PAGE/Western blot. **Panel A:** representative bands (~43 kDa, predicted) obtained with the primary antibody against serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α (molecular weight markers are on the left lane); Ponceau S stained membranes were used as protein loading control. **Panel B:** shows the mean \pm SEM (N = 8-10) levels of serine²⁹³-phosphorylated PDH-E1 α (optical densities of the bands were normalized by the optical densities of their respective loading controls). **P* \leq 0.01 vs. the other groups.

References

- [1] Gardner, P. R.; Nguyen, D. D.; White, C. W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12248-12252; 1994.
- [2] Yan, H.; Parsons, D. W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B. A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G. J.; Friedman, H.; Friedman, A.; Reardon, D.; Herndon, J.; Kinzler, K. W.; Velculescu, V. E.; Vogelstein, B.; Bigner, D. D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**:765-773; 2009.
- [3] Figueira, T. R.; Castilho, R. F.; Saito, A.; Oliveira, H. C.; Vercesi, A. E. The higher susceptibility of congenital analbuminemic rats to Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition is associated with the increased expression of cyclophilin D and nitrosothiol depletion. *Mol. Genet. Metab.* **104**:521-528; 2011.

4 – DISCUSSÃO / CONCLUSÕES

A discussão desta Tese será apresentada em tópicos, de acordo com os principais achados que compõem os Resultados.

4.1 – Camundongos com deficiência de NNT mantidos em dieta hiperlipídica apresentam quadro de progressão de simples esteatose para esteatohepatite gordurosa não alcoólica.

No presente estudo, inicialmente foram analisadas as alterações hepáticas induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem C57BL/6J e em congênicos para a mutação no gene que codifica a NNT ($Nnt^{+/+}$ e $Nnt^{-/-}$). Histologicamente, observamos que as três linhagens de camundongos apresentaram alterações hepáticas em resposta à dieta hiperlipídica após o período de 20 semanas. No entanto, camundongos com deficiência de NNT (C57BL/6J e $Nnt^{-/-}$) apresentaram um quadro de agravamento da doença hepática gordurosa não alcoólica. Camundongos C57BL/6J e $Nnt^{-/-}$ apresentaram maior frequência de balonização, esteatose macrovesicular/microvesicular e conteúdo de triglicérides hepático quando comparados aos camundongos com a NNT intacta mantidos em dieta hiperlipídica.

De acordo com Kleiner e colaboradores (2005), o escore de atividade de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA; em inglês – *NAFLD Activity Score*) inclui apenas alterações de lesão ativa, as quais são potencialmente reversíveis em um curto prazo. Este escore é definido pela soma dos escores específicos de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização (0-2), variando de 0-8. É importante notar que devido a seu menor potencial de reversão, a fibrose não está incluída como componente de determinação do escore de atividade de doença hepática gordurosa não alcoólica. Deste modo, o presente estudo determinou o escore de atividade de doença hepática gordurosa não alcoólica a partir dos resultados expressos nos painéis de A-D da **Figura 2 de Resultados** (valores de mediana \pm intervalo interquartil: 3 ± 2 , 7 ± 0 e 8 ± 2 para camundongos $Nnt^{+/+}$, $Nnt^{-/-}$ e C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica, respectivamente). Notavelmente, os valores expressos dos escores em animais C57BL/6J e $Nnt^{-/-}$ são significativamente maiores quando comparados aos obtidos para camundongos $Nnt^{+/+}$. A relação do escore de atividade de doença hepática gordurosa não alcoólica para diagnóstico de esteatohepatite aponta que valores ≥ 5 são associados à presença de esteatohepatite não alcoólica (Kleiner et al., 2005). Assim, baseados nos valores de escore obtidos no presente estudo com diferentes linhagens de camundongos, podemos afirmar que camundongos

C57BL/6J e *Nnt*^{-/-} desenvolveram esteatohepatite após 20 semanas de HFD, sendo que o mesmo não foi observado em camundongos *Nnt*^{+/+}. Mediante a este resultado, podemos afirmar que a ausência da enzima NNT funcional aumenta significativamente a incidência da esteatohepatite não alcoólica.

O presente estudo não é o primeiro a observar que camundongos da linhagem C57BL/6J desenvolvem quadro agravado da doença hepática gordurosa quando mantidos em dieta hiperlipídica. Estudos já publicados apontam que a linhagem C57BL/6J é mais susceptível ao desenvolvimento de esteatohepatite frente à dieta hiperlipídica. Mantena e colaboradores (2009) observaram que camundongos machos C57BL/6J apresentavam quadro de esteatose hepática macrovesicular e microvesicular acompanhado de balonização hepatocelular e presença de corpúsculo de *Mallory* após período de 8 e 16 semanas de dieta hiperlipídica. Um ponto divergente do referido estudo se deve ao fato da esteatohepatite ter sido induzida por uma dieta onde 71% das calorias foram provenientes de gordura (óleo de milho), enquanto em nosso estudo esta proporção foi de 60%. Alguns pesquisadores acreditam que protocolos onde mais de 60% das calorias adquiridas são provenientes de gordura trazem resultados duvidosos quando comparados à dieta humana (Buettner et al., 2006).

Posteriormente, Sundaresam e colaboradores (2011) ao utilizarem duas dietas distintas: baixo teor lipídico (12% kcal derivado de gordura – óleo de soja) e alto teor lipídico, dieta *Western* (45% kcal derivado de gordura – gorduras lácteas) puderam observar que camundongos C57BL/6J submetidos à dieta *Western* por um período de 20 semanas apresentaram características histológicas de esteatohepatite. Observaram esteatose, balonização, inflamação e também fibrose hepática (Sundaresam et al., 2011). Um ponto que merece ser discutido é o fato de dietas *Western* também apresentarem alta sacarose, sendo a adição da sacarose em dietas hiperlipídicas um componente que favorece o quadro de desenvolvimento de esteatohepatite. Mediante a estes resultados, os autores sugerem a linhagem de camundongos C57BL/6J como um possível modelo experimental de estudo de esteatohepatite.

Em estudo com dieta hiperlipídica idêntica à utilizada no presente trabalho, Thounaojam e colaboradores (2012) observaram que camundongos C57BL/6J apresentaram quadro característico de esteatohepatite com balonização hepatocelular (presença de corpúsculo de *Mallory*), acúmulo de gordura nos hepatócitos e infiltração de células inflamatórias após um período de 16 semanas de dieta hiperlipídica (60% kcal derivada de gordura - *lard*). Afrin e colaboradores (2017) também observaram que

camundongos C57BL/6J submetidos à mesma dieta apresentaram quadro de esteatose hepática acompanhado de balonização e inflamação lobular. É importante ressaltar que as características de esteatohepatite observadas neste trabalho já foram evidentes na 14ª semana de tratamento. Este efeito pode ser justificado pelo fato destes animais além de serem submetidos à dieta hiperlipídica também receberam injeção subcutânea de estreptozotocina (200 µg), a qual é comumente utilizada para induzir diabetes *mellitus* II. Desta forma, a maior susceptibilidade destes animais às alterações histológicas de esteatohepatite pode ser explicada pelo desenvolvimento simultâneo de diabetes *mellitus* II, uma vez que o mesmo está diretamente relacionado à maior incidência da doença hepática gordurosa não alcoólica (Cornier et al., 2008). Estes dados corroboram com os resultados observados no presente estudo mostrando suscetibilidade aumentada de camundongos C57BL/6J ao desenvolvimento de esteatohepatite quando mantidos em dieta hiperlipídica.

Recentemente, Tessitore e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica (58% kcal derivada de gordura – óleo de coco) por um período de 3 meses apresentaram somente esteatose simples, consistindo em deposição isolada de gordura nos hepatócitos. Porém, neste estudo foram observadas as características típicas de esteatohepatite (esteatose, balonização e infiltrados inflamatórios por linfócitos, macrófagos e leucócitos) após um período de 12 meses de dieta. Estes dados demonstram o quanto que diferentes fontes de gordura da dieta hiperlipídica podem interferir na progressão da doença hepática gordurosa (Kakimoto e Kowaltowski 2016).

A dieta hiperlipídica é considerada um modelo com alta reprodutibilidade quanto ao desenvolvimento de características histológicas de esteatohepatite não alcoólica, no entanto, podemos observar que ainda não existe um padrão na composição e duração destas dietas. Atualmente dietas hiperlipídicas variam de 30% a 60% do conteúdo energético derivado de gordura, incluem ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados e podem durar de alguns dias até mesmo meses (Buettner et al., 2007). Como resultado, fenótipos muito variáveis são encontrados em estudos na área e os dados são muitas vezes de difícil comparação.

Os resultados dos estudos acima mencionados foram obtidos com camundongos cuja descrição metodológica de sua origem é compatível com a presença de NNT mutada (camundongos C57BL/6J). O presente estudo mostra que um fator de grande variabilidade quanto ao desenvolvimento de esteatohepatite em modelos murinos

submetidos à dieta hiperlipídica é a presença de NNT mutada. Tal fato é de grande relevância para estudos sobre o efeito de dieta hiperlipídica em camundongos knowouts ou transgênicos homozigotos derivados da linhagem C57BL/6, onde a presença ou ausência de mutação em NNT precisa ser rigorosamente monitorada nos respectivos grupos controles.

Outro resultado interessante observado no presente estudo é o fato de camundongos da linhagem C57BL/6J terem apresentado quadro mais agravado de esteatohepatite não alcoólica (fibrose e inflamação acinar/portal) quando comparados aos animais *Nnt*^{-/-} mantidos em dieta hiperlipídica. Este resultado pode ser fundamentado pelos dados obtidos do serviço de genotipagem do *The Jackson Laboratory*, que ao comparar os marcadores de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) entre camundongos da linhagem C57BL/6J e os animais congênicos (*background* genético C57BL/6JUnib) observaram que 28% dos SNPs diferiram entre a linhagem C57BL/6J e os camundongos congênicos. Diante deste resultado, podemos afirmar que camundongos C57BL/6J provavelmente possuem outras diferenças genéticas (Mekada et al., 2009), além da mutação de *Nnt*. Tal fato poderia explicar o fenótipo de esteatohepatite agravado frente à dieta hiperlipídica. No entanto, ainda não existem dados na literatura que sugerem qual outra diferença genética encontrada na linhagem C57BL/6J poderia explicar experimentalmente a maior severidade de esteatohepatite. De fato, este é o primeiro estudo que utilizou camundongos geneticamente adequados para investigar o papel da NNT no desenvolvimento da esteatohepatite sob dieta hiperlipídica.

4.2 – Desequilíbrio redox mitocondrial mediante a interação entre dieta hiperlipídica e deficiência de NNT está diretamente relacionado com a progressão de esteatose simples para esteatohepatite não alcoólica.

As oxidações de NADH, isocitrato, malato e glutamato pela NNT, IDH2, NADP-ME e GDH, respectivamente, são fontes conhecidas de NADPH na matriz mitocondrial. O NADP em seu estado reduzido sustenta a capacidade de remoção de peróxido em mitocôndrias hepáticas, o que destaca a importância da manutenção de sua homeostase redox. A contribuição das enzimas acima citadas para a redução de NADP⁺ depende do estado respiratório e dos substratos mitocondriais fornecidos (Ronchi et al., 2016). No presente estudo, mostrou-se que em mitocôndrias incubadas na presença dos substratos respiratórios malato e piruvato, a NNT desempenha importante papel na

manutenção do equilíbrio redox frente à dieta hiperlipídica. Essa conclusão é sustentada por várias alterações na homeostase redox mitocondrial observadas somente na condição de interação entre ausência de NNT (camundongos *Nnt*^{-/-}) e dieta hiperlipídica.

Dentre as funções relacionadas à manutenção da homeostase redox mitocondrial, avaliou-se, experimentalmente, a capacidade de mitocôndrias hepáticas metabolizarem t-BOOH (peróxido orgânico metabolizado pelos sistemas antioxidantes da glutathione peroxidase e peroxiredoxina). Observou-se que a capacidade de metabolizar peróxido apresentou-se, nitidamente, prejudicada em animais *Nnt*^{-/-}, mesmo em dieta padrão. Tal constatação corrobora os dados publicados por Ronchi e colaboradores (2013). Em adição, os dados do presente estudo apontam que quando os animais *Nnt*^{-/-} foram submetidos à dieta hiperlipídica, a capacidade de metabolizar peróxido foi ainda mais prejudicada. É notório que mediante a ausência de fornecimento de NADPH via NNT, a oxidação de substratos através do ciclo de Krebs é a fonte de NADPH que sustenta a remoção de peróxido NADPH-dependente (Ronchi et al., 2013; Ronchi et al., 2016). Desta forma, presume-se que mitocôndrias provenientes de camundongos *Nnt*^{-/-} sob HFD apresentam prejuízo na oxidação destes substratos. Estes resultados demonstram, claramente, que a interação entre deficiência de NNT e dieta hiperlipídica pode agravar o desequilíbrio redox mitocondrial.

A taxa de liberação mitocondrial de H₂O₂ na presença de malato e piruvato como substratos energéticos também foi avaliada no presente estudo. Como resultado, observou-se que somente os animais *Nnt*^{-/-} sob dieta hiperlipídica apresentaram maior taxa de liberação de H₂O₂. O que indica que esta alteração redox foi sustentada pela interação entre HFD e a mutação de NNT. A associação entre uma maior taxa de liberação de H₂O₂ mitocondrial e menor capacidade de remoção de peróxido pelos sistemas antioxidantes mitocondriais glutathione peroxidase e peroxiredoxina, resulta em desequilíbrio redox. O que corrobora os resultados observados referentes à inibição da atividade enzimática da aconitase mitocondrial, que por sua vez, pôde ser constatada majoritariamente na interação entre dieta hiperlipídica e mutação de NNT. Considera-se a enzima aconitase como um marcador sensível ao equilíbrio redox e a sua inibição indica desequilíbrio do mesmo (Gardner et al., 1994).

A associação entre a condição de estresse oxidativo e altas concentrações do íon cálcio (Ca²⁺) na matriz mitocondrial pode gerar a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP). Deste modo, a abertura do PTP é um evento redox-sensível que pode resultar em disfunção bioenergética, injúria celular e apoptose (Figueira et al.,

2013). A avaliação da capacidade mitocondrial de captação e retenção de Ca^{2+} sugere efeitos divergentes entre mutação de NNT e HFD. Como previsto, em camundongos *Nnt*^{-/-} alimentados com dieta padrão, a susceptibilidade à abertura do PTP foi significativamente maior quando comparada aos camundongos *Nnt*^{+/+} (Ronchi et al., 2013), sendo importante destacar que este efeito foi observado somente na presença de succinato e rotenona. Surpreendentemente, a dieta hiperlipídica diminuiu a susceptibilidade da abertura do PTP em mitocôndrias de camundongos *Nnt*^{+/+}. Este efeito, à primeira vista parece ser contra-intuitivo, no entanto, estudo recente forneceu observações importantes sugerindo que a inibição da abertura do PTP pode não ser uma adaptação benéfica frente à HFD (Laker et al., 2016). Quando avaliada a susceptibilidade à abertura do PTP em camundongos *Nnt*^{-/-}, observou-se que a mutação de NNT alterou, inversamente, o efeito da dieta hiperlipídica nesta variável. Camundongos *Nnt*^{-/-} submetidos à dieta hiperlipídica exibiram maior susceptibilidade à abertura do PTP induzida por Ca^{2+} . Estes resultados corroboram evidências que o desequilíbrio redox favorece a abertura de PTP (Vercesi, 1987; Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 2009; Figueira et al., 2013). Mediante ao conjunto de resultados descritos, fica claramente explícito os efeitos deletérios da interação entre deficiência de NNT e dieta hiperlipídica no equilíbrio redox mitocondrial.

É importante ressaltar que muitos estudos afirmam que o desenvolvimento da esteatohepatite está diretamente relacionada ao desequilíbrio redox mitocondrial (Begriche et al., 2013; Spahis et al., 2016), no entanto, esta afirmação ainda é pouco fundamentada por dados experimentais. Estudos indicam haver desequilíbrio redox mitocondrial na esteatohepatite baseados em resultados que demonstram aumento de liberação mitocondrial de peróxido de hidrogênio (Eccleston et al., 2011) e aumento da presença de produtos decorrentes de estresse oxidativo, tais como malondialdeído e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) (Nobili et al., 2010; Liu et al., 2011; Irie et al., 2012; Pirgon et al., 2013). Estes resultados com certeza são indícios da associação entre estresse oxidativo e esteatohepatite. No entanto, o presente estudo demonstra, experimentalmente, que a ausência de NNT leva ao desenvolvimento de esteatohepatite em camundongos mantidos em dieta hiperlipídica. Estes novos achados de diferentes fenótipos hepáticos observados nos camundongos *Nnt*^{+/+} e *Nnt*^{-/-} fornecem prova experimental do conceito que o desequilíbrio redox mitocondrial agrava a doença hepática gordurosa induzida por dieta hiperlipídica.

4.3 – Dieta hiperlipídica leva à inibição do complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH) em camundongos com deficiência de NNT: Ciclo entre desequilíbrio redox e inibição de PDH.

No que se refere ao efeito da dieta hiperlipídica, os resultados deste trabalho demonstraram que a ausência de NNT acarretou em várias consequências na homeostase redox mitocondrial. Notou-se que a detoxificação do peróxido por mitocôndrias desprovidas de atividade de NNT foi, majoritariamente, prejudicada em animais submetidos à HFD. Curiosamente, este efeito foi completamente corrigido pela presença de ADP. Diante deste resultado, foram estabelecidos novos protocolos para a avaliação do possível alvo molecular responsável pela modulação da remoção de peróxido pelo ADP.

Estudos recentemente publicados demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica crônica apresentaram inibição da atividade da piruvato desidrogenase (PDH) (Hwang et al., 2009; Tso et al., 2014; Go et al., 2016). Evidentemente, os resultados do presente estudo revelaram que, na ausência da NNT, a oxidação do piruvato através da PDH exerce papel extremamente relevante na remoção do peróxido mitocondrial, pois fornece acetil-CoA para o ciclo de Krebs, o qual está associado à formação de isocitrato que sustenta a redução do NADP^+ pela isocitrato desidrogenase NADP-dependente (IDH2) (Ronchi et al., 2013; Ronchi et al., 2016). Notadamente, quando o piruvato foi substituído por palmitoilcarnitina (fonte de acetil-CoA através da β -oxidação), a capacidade de remoção de peróxido pelas mitocôndrias dos camundongos *Nnt*^{-/-} submetidos à dieta hiperlipídica foi reestabelecida. Os valores observados da capacidade de remoção de peróxido se aproximaram daqueles obtidos em mitocôndrias de camundongos *Nnt*^{-/-} sob dieta padrão.

Este conjunto de resultados aponta que o comprometimento da oxidação do piruvato através da PDH poderia ser o mecanismo responsável pela menor capacidade de remoção de peróxido observada em camundongos *Nnt*^{-/-} sob HFD. No entanto, a evidência definitiva foi obtida com o uso de DCA, um ativador de PDH, e concentrações de piruvato alta (5 mM) e limitante (0,1 mM). Nestas condições, os efeitos deletérios da HFD observados na remoção de peróxido por mitocôndrias de camundongos *Nnt*^{-/-} foram completamente revertidos. É importante ressaltar que os efeitos estimulantes do DCA na capacidade de remoção do peróxido por mitocôndrias de camundongos *Nnt*^{-/-} foram, claramente, maiores quando a oxidação do piruvato foi desfavorecida, ou seja, na

concentração de piruvato limitante (0,1 mM). Deste modo, aumenta-se a evidência de que a dieta hiperlipídica promoveu inibição da PDH e conseqüentemente levou a diminuição do fluxo de piruvato e da capacidade de remoção do peróxido em mitocôndrias hepáticas de animais *Nnt*^{-/-}.

Os resultados obtidos a partir do experimento com DCA trazem evidências funcionais da inibição da PDH. Estudos previamente publicados demonstraram que a dieta hiperlipídica promove a fosforilação da subunidade PDH E1 α em resíduos de serina (através da piruvato desidrogenase quinase (PDK)) com conseqüente inibição da PDH (Crewe et al., 2013; Go et al., 2016; Zhang et al., 2016). Baseados nestas evidências, avaliamos os níveis das subunidades de PDH E1 α total e fosforilada (serina293) por *Western Blot*. Os dados obtidos mostraram que os níveis de expressão da subunidade PDH E1 α total não foram alterados pela mutação em *Nnt* ou HFD. No entanto, os níveis das subunidades PDH E1 α fosforilada em serina293 foram aumentados somente no grupo *Nnt*^{-/-} mantido em HFD.

Quanto ao efeito de ADP corrigir o prejuízo na remoção de peróxido observado em mitocôndrias de camundongos *Nnt*^{-/-} mantidos em dieta HFD, isso pode estar relacionado a dois processos principais. Uma alta razão ADP/ATP leva a inibição da PDH quinase, resultando em menor fosforilação da PDH e sua conseqüente ativação (Patel e Roche, 1990). Em adição, por promover um maior fluxo de substratos no ciclo de Krebs, devido a fosforilação oxidativa, a presença de concentrações micromolares de ADP leva a uma maior disponibilidade de substratos para enzimas responsáveis pela redução de NADP⁺, como a IDH2.

Os mecanismos moleculares que levam a inibição de PDH em modelos de dieta hiperlipídica ainda permanecem desconhecidos. No entanto, alguns estudos apontam que o estresse oxidativo poderia afetar a função da PDH (Kamata et al., 2005; Zhou et al., 2008). Recentemente, trabalhos têm demonstrado a importância da inibição da PDH na fisiopatologia de doença hepática gordurosa não alcoólica. Os dados apresentados por estes estudos mostram que a ativação da PDH, por meio da supressão molecular ou farmacológica da fosforilação da PDH, melhora significativamente o perfil metabólico e a esteatose hepática observada em camundongos da linhagem C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica (Hwang et al., 2009; Tso et al., 2014; Go et al., 2016). Como já mencionado, estes estudos utilizaram a linhagem de camundongos com deficiência de NNT, assim sendo, nossos achados atuais sugerem que os mecanismos adjacentes à melhoria do perfil metabólico e doença hepática gordurosa resultantes da ativação de PDH, podem incluir a

restauração do equilíbrio redox nas mitocôndrias hepáticas e seus amplos efeitos benéficos secundários em processos celulares relacionados.

4.4 – Implicações da utilização da linhagem de camundongos C57BL/6J como modelo de estudo de doença hepática gordurosa não alcoólica.

O estudo da patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica possui inúmeras limitações quanto à utilização de biópsias hepáticas de humanos. Diante disto, modelos animais de doença hepática gordurosa/esteatohepatite têm sido métodos cruciais para a elucidação da fisiopatologia da doença hepática gordurosa e também para a avaliação de possíveis alvos terapêuticos. Fixados na busca do modelo animal ideal, ou seja, aquele que reflita corretamente a histopatologia e a patofisiologia da doença hepática gordurosa, pesquisadores têm utilizado amplamente a linhagem de camundongos C57BL/6J submetida a dietas hiperlipídicas. Essa ampla variedade de estudos com esta linhagem fundamenta-se principalmente no grau de fidelidade do perfil metabólico e histológico observado em humanos. Adequadamente, o fígado deste modelo animal (C57BL/6J) apresenta esteatose macrovesicular e/ou microvesicular, inflamação intralobular, balonização hepatocelular (Sundaresam et al., 2011; Thounaojam et al., 2012; Afrin et al., 2017) e, em alguns estudos, fibrose perissinusoidal (Mantena et al., 2009). Além disto, camundongos C57BL/6J também apresentam anormalidades metabólicas tais como obesidade (Nicholson et al., 2010) e resistência à insulina (Afrin et al., 2017). É mediante a este conjunto de características que a linhagem de camundongos C57BL/6J representa, atualmente, o modelo animal mais utilizado para o estudo de doença hepática gordurosa, obesidade e resistência à insulina.

No entanto, em 2005 foi identificada a mutação no gene que codifica para a NNT em camundongos da linhagem C57BL/6J (Toye et al., 2005; Huang et al., 2006). Nestes dois primeiros estudos, foi sugerido que a mutação de NNT poderia estar relacionada a um prejuízo na homeostase da glicose (Toye et al., 2005) e um fenótipo anormal de camundongos geneticamente modificados para deficiência de superóxido dismutase mitocondrial (SOD2; Huang et al., 2006). Posteriormente, Ronchi e colaboradores (2013) demonstraram que mitocôndrias hepáticas desprovidas da função da NNT exibem menor capacidade de remoção de peróxido, bem como outras anormalidades redox. Mesmo diante a estes trabalhos, um grande número de trabalhos simplesmente tem ignorado o impacto da presença de mutação em *Nnt* em camundongos C57BL/6J.

Um considerável número de estudos implica o desequilíbrio no balanço redox na progressão de esteatose simples a um quadro de esteatohepatite não alcoólica (Begrache et al., 2013; Spahis et al., 2016). Mediante a tal fato, questionamos a utilização de um modelo animal com deficiência de NNT (que já resulta em desequilíbrio redox) para avaliar mecanismos fisiopatológicos e a eficácia de intervenções em uma doença cuja progressão está relacionada ao quadro de estresse oxidativo. De fato, nossos resultados em relação à esteatohepatite induzida por dieta hiperlipídica em camundongos *Nnt*^{-/-} e C57BL/6J apontam fortes evidências experimentais de que a mutação em *Nnt* contribuiu significativamente para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica. Desta forma, muitos dos resultados observados em estudos de doença hepática gordurosa em camundongos com mutação em *Nnt* podem estar relacionados somente a presença desta mutação e não aos mecanismos da doença hepática humana em estudo. Portanto, os presentes resultados são de fundamental importância, já que inúmeros estudos continuam a utilizar camundongos C57BL/6J como modelos de doenças metabólicas, incluindo doença hepática gordurosa não alcoólica (Hwang et al., 2009; Poussin et al., 2011; Mercer et al., 2012; Guo et al., 2013; Go et al., 2016; Zhang et al., 2016).

5 - REFERÊNCIAS

- Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010 Jun; **51(6)**: 1961–71.
- Afrin R, Arumugam S, Rahman A, Wahed MI, Karuppagounder V, Harima M, Suzuki H, Miyashita S, Suzuki K, Yoneyama H, Ueno K, Watanabe K. Curcumin ameliorates liver damage and progression of NASH in NASH-HCC mouse model possibly by modulating HMGB1-NF- κ B translocation. *Int Immunopharmacol*. 2017 Mar; **44**: 174-182.
- Alves TC, Befroy DE, Kibbey RG, Kahn M, Codella R, Carvalho RA, Falk Petersen K, Shulman GI. Regulation of hepatic fat and glucose oxidation in rats with lipid-induced hepatic insulin resistance. *Hepatology*. 2011 Apr; **53(4)**: 1175-81.
- Ande SR, Nguyen KH, Grégoire Nyomba BL, Mishra S1. Prohibitin-induced, obesity-associated insulin resistance and accompanying low-grade inflammation causes NASH and HCC. *Sci Rep*. 2016 Mar 23; **6**: 23608.
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006 Feb; **87(1)**: 1-16.
- Arkblad EL, Betsholtz C, Rydström J. The cDNA sequence of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase from man and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996 Mar; **1273(3)**: 203-5.
- Arkblad EL, Egorov M, Shakhparonov M, Romanova L, Polzikov M, Rydström J. Expression of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase in mouse, human brain and *C elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002 Sep; **133(1)**:13-21.
- Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, Tranberg M, Rydström J. A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005 Jun; **38(11)**: 1518-25.
- Begriffe K; Massart J; Robin MA; Bonnet F; Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013 Oct; **58(4)**: 1497-507; 2013.

- Brand, M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010 Aug; **45(7-8)**: 466–72.
- Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev.* 1979 Jul; **59(3)**: 719-809.
- Brenner DA. Molecular Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009; **120**: 361–368.
- Brix AE, Elgavish A, Nagy TR, Gower BA, Rhead WJ, Wood PA. Evaluation of liver fatty acid oxidation in the leptin-deficient obese mouse. *Mol Genet Metab.* 2002 Mar; **75(3)**: 219-26.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007 Apr; **15(4)**: 798-808.
- Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010 May; **28(1)**: 162–8.
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine.* 1995 Mar; **18(3)**: 479-86.
- Chalasani N1, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. 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.* 2012 Jun; **55(6)**: 2005-23.
- Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, Masuoko H, Gores G. Fast food diet mouse: novel small animal model of nash with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Nov; **301(5)**: G825–34.
- Clarke DM, Bragg PD. Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry.* 1985 Jun; **149(3)**: 517-23.

- Colowick SP, Kaplan NO, Neufeld EF, Ciotti MM. Pyridine nucleotide transhydrogenase. Indirect evidence for the reaction and purification of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1952 Mar; **195(1)**: 95-105.
- Cook WS, Jain S, Jia Y, Cao WQ, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-responsive genes induced in the newborn but not prenatal liver of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase null mice. *Exp Cell Res*. 2001 Aug 1; **268(1)**: 70-6.
- Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. 2008. The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2008 Dec; **29(7)**: 777–822.
- Crewe C, Kinter M, Szveda LI. Rapid inhibition of pyruvate dehydrogenase: an initiating event in high dietary fat-induced loss of metabolic flexibility in the heart. *PLoS One*. 2013 Oct 7; **8(10)**: e77280.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 Apr; **114(4)**: 842-5.
- Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006 Jan; **130(1)**: 207-10.
- Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2005 Nov; **129(5)**: 1663-74.
- Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatology Res*. 2005 Oct; **33(2)**: 138-44.
- Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1; **51(7)**: 1289-301.
- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010 Feb; **103(2)**: 71–83.
- Drechsel DA, Patel M. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Sep; **285(36)**: 27850-8.
- Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, Tinsley HN, Nolte RN, Nagy TR, Abrams GA, Bailey SM. 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 Jul 15; **15(2)**: 447–59.

- Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Nov; **265(32)**: 19955-60.
- Fan CY, Pan J, Chu R, et al. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acylcoenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem*. 1996 Oct 4; **271(40)**: 24698–710.
- Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-coa oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem*. 1998 Jun; **273(25)**: 15639–45.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004 Jul; **40(1)**: 185-94.
- Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, Sluse FE, Souza-Pinto NC, Vercesi AE. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013 Jun; **18(16)**: 2029-74.
- Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr; **25(2)**: 207-17.
- Freeman H, Shimomura K, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a link between insulin secretion, glucose metabolism and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2006 Nov; **34**: 806-10.
- Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003; **38 Suppl 1**: S38-53.
- Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May; **134(6)**: 1655–69.
- Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T, Giulivi C. Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical*. 2015 Jun; **3**: 70-8.

- Go Y; Jeong JY; Jeoung NH; Jeon JH; Park BY; Kang HJ; Ha CM; Choi YK; Lee SJ; Ham HJ; Kim BG; Park KG; Park SY; Lee CH; Choi CS; Park TS; Lee WN; Harris RA; Lee IK. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase 2 protects against hepatic steatosis through modulation of TCA cycle anaplerosis and ketogenesis. *Diabetes*. 2016 Oct; **65(10)**: 2876-87.
- Gonçalves RL, Bunik VI, Brand MD. Production of superoxide/hydrogen peroxide by the mitochondrial 2-oxoadipate dehydrogenase complex. *Free Radical Biology & Medicine*. 2016 Feb; **91**: 247-55.
- Guo Y, Darshi M, Ma Y, Perkins GA, Shen Z, Haushalter KJ, Saito R, Chen A, Lee YS, Patel HH, Briggs SP, Ellisman MH, Olefsky JM, Taylor SS. Quantitative Proteomic and Functional Analysis of Liver Mitochondria from High Fat Diet (HFD) Diabetic Mice. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Dec; **12(12)**: 3744–58.
- Haentjens P, Massaad D, Reynaert H, Peeters E, Van Meerhaeghe A, Vinken S, Poppe K, Velkeniers B. Identifying non-alcoholic fatty liver disease among asymptomatic overweight and obese individuals by clinical and biochemical characteristics . *Acta Clin Belg*. 2009 Nov-Dec; **64(6)**: 483 – 93.
- Halliwell B and Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;**186**:1-85.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991 Sep 30; **91(3C)**:14S-22S.
- Hamanaka R.B., Chandel N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010 Sep; **35(9)**: 505-13.
- Hewitt KN, Pratis K, Jones MEE, Simpson ER. Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology*. 2004 Apr; **145(4)**: 1842–8.
- Hoek JB, Rydström J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J*. 1988 Aug; **254(1)**: 1-10.
- Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*. 2004 Jun; **113(12)**: 1774-83.

- Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, Carlson EJ, Epstein CJ. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet.* 2006 Apr; **15(7)**: 1187-94.
- Hwang B, Jeoung NH, Harris RA. Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet. *Biochem J.* 2009 Sep 25; **423(2)**: 243-52.
- Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 1966 Sep 2; **153(3740)**: 1127-8.
- Humphrey GF. The distribution and properties of transhydrogenase from animal tissues. *Biochemical Journal.* 1957 Mar; **65(3)**: 546-50.
- Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci.* 2016 May; **61(5)**:1325-36.
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology.* 2001 Aug; **34(2)**: 288-97.
- Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2004 May; **39(5)**: 1286-96.
- Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, Kanatani A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Res.* 2007 Jan; **37(1)**: 50-7.
- Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 May; **25(3)**: 223-9.
- Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, Huh TL. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Jul; **276(19)**: 16168-76.
- Kakimoto PA, Kowaltowski AJ. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol.* 2016 Aug; **8**: 216-25.

- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005 Mar 11; **120(5)**: 649-61.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009 Aug; **47(4)**: 333-43.
- Kaplan NO, Colowick SP, Neufeld EF, Ciotti MM. Pyridine nucleotide transhydrogenase. IV. Effect of adenylic acid a on the bacterial transhydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*. 1953 Nov; **205(1)**: 17-29.
- Kaufman B, Kaplan NO. Pyridine nucleotide transhydrogenase. VIII. Properties of the transhydrogenase reactions of an enzyme complex isolated from beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1961 Jul; **236**: 2133-9
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999 Jun; **103(11)**: 1489-98.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun; **41(6)**: 1313-21.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009 Aug; **47(4)**: 333-43.
- Kozakova M, Palombo C, Eng MP, Dekker J, Flyvbjerg A, Mitrakou A, Gastaldelli A, Ferrannini E. Fatty liver index, gamma-glutamyltransferase, and early carotid plaques. *Hepatology*. 2012 May; **55(5)**:1406–15.
- Laker RC, Taddeo EP, Akhtar YN, Zhang M, Hoehn KL, Yan Z. The Mitochondrial Permeability Transition Pore Regulator Cyclophilin D Exhibits Tissue-Specific Control of Metabolic Homeostasis. *PLoS One*. 2016 Dec 22; **11(12)**: e0167910.
- Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol*. 2008 Sep; **49(3)**: 407-16.

- Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000 Apr; **105(8)**: 1067-75.
- Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol*. 2002 Aug; **37(2)**: 206–13.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr; **25(2)**: 195–206.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (pparalpha) in the cellular fasting response: The pparalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Jun 22; **96(13)**: 7473–8.
- Leung JH, Schurig-Briccio LA, Yamaguchi M, Moeller A, Speir JA, Gennis RB, Stout CD. Structural biology: Division of labor in transhydrogenase by alternating proton translocation and hydride transfer. *Science*. 2015 Jan; **347(6218)**: 178-81.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, , Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*. 2004 Mar; **79(3)**: 502–9.
- Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism*. 2016 Aug; **65(8)**: 1136-50.
- London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis*. 2007 Feb; **11(1)**: 55-74, viii.
- Lopert P, Patel MJ. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 May; **289(22)**: 15611-20.
- Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1a knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 May 8; **98(10)**: 5560–5.
- Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J*. 2009 Jan 1; **417(1)**: 183-93.

- Martinez-Chantar ML, Corrales FJ, Martinez-Cruz LA, García-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, Avila MA, Mato JM, Lu SC. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J*. 2002 Aug; **16(10)**: 1292–4.
- Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007 Nov; **46(5)**: 1392–1403.
- Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental Animals*. 2009 Apr; **58(2)**: 141-9.
- Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, Nürnberg P, Mann NP, Banerjee R, Saka HN, Chapple JP, King PJ, Clark AJ, Metherell LA. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nature Genetics*. 2012 May; **44(7)**: 740-2.
- Mercer JR, Yu E, Figg N, Cheng KK, Prime TA, Griffin JL, Masoodi M, Vidal-Puig A, Murphy MP, Bennett MR. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM+/-/ApoE-/- mice. *Free Radic Biol Med*. 2012 Mar 1; **52(5)**: 841-9.
- Mitchel P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 1961 Jul; **191**: 144-8.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009 Jan; **417(1)**: 1-13.
- Nakayama H, Otabe S, Ueno T, Hirota N, Yuan X, Fukutani T, Hashinaga T, Wada N, Yamada K. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*. 2007 Apr; **56(4)**: 470-5.
- Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Aug; **21(8)**: 1240-1249.
- Newberry EP, Kennedy S, Xie Y, Luo J, Jiang H, Ory DS, Davidson NO. Phenotypic divergence in two lines of L-FABP -/- mice reflects substrain differences and

- environmental modifiers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015 Oct 15; **309(8)**: G648–661.
- Nicholson A, Reifsnnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, Leiter EH. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring)* 2010 Oct; **18(10)**: 1902-5.
- Novoselova TV, Rath SR, Carpenter K, Pachter N, Dickinson JE, Price G, Chan LF, Choong CS, Metherell LA. NNT pseudoexon activation as a novel mechanism for disease in two siblings with familial glucocorticoid deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2015 Feb; **100(2)**: 350-4.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Oct; **276(42)**: 38388-93.
- Okumura K, Ikejima K, Kon K, et al. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic kk-a(y) mice. *Hepatology.* 2006 Nov; **36(3)**: 217–28.
- Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis.* 2007 Feb; **11(1)**: 1–16, vii.
- Pacifico L, Anania C, Martino F, et al. Functional and morphological vascular changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010 Nov; **52(5)**: 1643–51.
- Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 1990 Nov; **4(14)**: 3224-33.
- Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, et al. High prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus and normal plasma aminotransferase levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; **100**: 2231–8.
- Poussin C, Ibberson M, Hall D, Ding J, Soto J, Abel ED, Thorens B. Oxidative phosphorylation flexibility in the liver of mice resistant to high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 2011 Sep; **60(9)**: 2216-24.
- Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 2013 May 23; **1**: 304-12.

- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Nov; **266(32)**: 22028-34.
- Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010 Aug; **53(2)**: 372 – 384.
- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 May; **290 (5)**: G852-8.
- Ribas V; Garcia-Ruiz C; Fernandez-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 2014 Jul 1; **5**:151.
- Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol*. 2004 Jan; **40(1)**: 47-51.
- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015; **313**: 2263–2273.
- Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HC, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Oct; **63**: 446-56.
- Ronchi, J. A.; Francisco, A.; Passos, L. A.; Figueira, T. R.; Castilho, R. F. The contribution of nicotinamide nucleotide transhydrogenase to peroxide detoxification is dependent on the respiratory state and counterbalanced by other sources of NADPH in liver mitochondria. *J Biol Chem*. 2016 Sep 16; **291(38)**: 20173 – 87.
- Rydström J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Properties of proton-translocating and ATP-driven transhydrogenase reconstituted from synthetic phospholipids and purified transhydrogenase from beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1979 Sep; **254(17)**: 8611-9.
- Rydström J, Hu X, Fjellström O, Mueller J, Zhang J, Johansson C, Bizouarn T. Domains, specific residues and conformational states involved in hydride ion transfer and proton pumping by nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998 Jun; **1365(1-2)**: 10-6.

- Rydström J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006 May; **1757(5-6)**: 721-6.
- Schrader, M., Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec; **1763(12)**: 1755-66.
- Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Nov; **287(5)**: G1035-43.
- Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World J Gastroenterol*. 2014 Nov; **20(44)**: 16474-16479.
- Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Aug; **282(33)**: 24407-15.
- Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, Fu X, He TT, Méndez-Lucas A, Shelton JM, Perales JC, Browning JD, Burgess SC. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res*. 2012 Jun; **53(6)**: 1080-92.
- Satapati S; Kucejova B; Duarte JA; Fletcher JA; Reynolds L; Sunny NE; He T; Nair LA; Livingston K; Fu X; Merritt ME; Sherry AD; Malloy CR; Shelton JM; Lambert J; Parks EJ; Corbin I; Magnuson MA; Browning JD; Burgess SC. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest* 2015 Dec 1; **125(12)**: 4447-62.
- Sato W, Horie Y, Kataoka E, Ohshima S, Dohmen T, Iizuka M, Sasaki J, Sasaki T, Hamada K, Kishimoto H. Hepatic gene expression in hepatocyte-specific Pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatology*. 2006 Apr; **34(4)**: 256-65.
- Schattenberg JM, Galle PR. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis*. 2010; **28(1)**: 247-54.
- Schröder T, Kucharczyk D, Bär F, Pagel R, Derer S, Jendrek ST, Sünderhauf A, Brethack AK, Hirose M, Möller S, Künstner A, Bischof J, Weyers I, Heeren J, Koczan D, Schmid SM, Divanovic S, Giles DA, Adamski J, Fellermann K, Lehnert H, Köhl J,

- Ibrahim S, Sina C. Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Metab.* 2016 Feb 2; **5(4)**: 283-95.
- Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* 1998 Oct 15; **12(20)**: 3182–3194.
- Spahis S; Delvin E; Borys JM; Levy E. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2016; **26(10)**: 519-54.
- Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim YJ, Sherwin R, Devaskar S, Lesche R, Magnuson MA. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Feb 17; **101(7)**: 2082-7.
- Sundaresan S, Vijayagopal P, Mills N, Imrhan V, Prasad C. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem.* 2011 Oct; **22(10)**: 979-84.
- Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol.* 2006 Sep; **169(3)**: 846-60.
- Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012 May 21; **18(19)**: 2300-8.
- Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, NeuschwanderTetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Nov; **295(5)**: G987–95.
- Tessitore A, Ciccirelli G, Del Vecchio F, Gaggiano A, Verzella D, Fischietti M, Mastroiaco V, Vetuschi A, Sferra R, Barnabei R, Capece D, Zazzeroni F, Alesse E. MicroRNA expression analysis in high fat diet-induced NAFLD-NASH-HCC progression: study on C57BL/6J mice. *BMC Cancer.* 2016 Jan **5**;16:3.

- Thounaojam MC, Jadeja RN, Dandekar DS, Devkar RV, Ramachandran AV. Sida rhomboidea.Roxb extract alleviates pathophysiological changes in experimental in vivo and in vitro models of high fat diet/fatty acid induced non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Toxicol Pathol*. 2012 Mar; **64(3)**: 217-24.
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Nov; **52(5)**: 1836-46.
- Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010; **5**:145-71.
- Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005 Apr; **48(4)**: 675-86.
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*. 1999 Feb; **49(2)**: 91-102.
- Treberg, J. R., Quinlan, C. L., and Brand, M. D. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*. 2011 Aug 5; **286(31)**: 27103-10.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 2003 Oct; **552**: 335-44.
- Tso SC, Qi X, Gui WJ, Wu CY, Chuang JL, Wernstedt-Asterholm I, Morlock LK, Owens KR, Scherer PE, Williams NS, Tambar UK, Wynn RM, Chuang DT. Structure-guided development of specific pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors targeting the ATP-binding pocket. *J Biol Chem*. 2014 Feb 14; **289(7)**: 4432-43.
- Vercesi AE. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987 Jan; **252(1)**: 171-8.
- Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem*. 2003 Oct; **278(44)**: 42774–84.

- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults . *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Aug ; **34(2)** : 274 – 285.
- Vetelainen R, Vliet A, Gouma DJ, Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg.* 2007 Jan; **245(1)**: 20-30.
- Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 2012 Apr; **53(4)**: 619-29.
- Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neuroscience Letters.* 1999 Nov; **275(2)**: 97-100.
- Wong RJ, Ahmed A. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Disparate associations among Asian populations. *World J Hepatol.* 2014 May 27; **6(5)**: 263–73.
- Wong, H., Digue P. A., Mezera, V., Monternier, P., Brand M.D. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *Free Radical Biology and Medicine.* 2017 Aug. doi: 10.1074/jbc.R117.789271.
- Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan YJ. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMA depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci.* 2008 Oct; **53(10)**: 2761-74.
- Yamaguchi M, Hatefi Y, Trach K, Hoch JA. The primary structure of the mitochondrial energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase deduced from the sequence of cDNA clones. *Journal of Biological Chemistry.* 1988 Feb; **263(6)**: 2761-7.
- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar; **94(6)**: 2557-2562.
- Yao ZM, Vance DE. Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient in choline. *Biochem Cell Biol.* 1990 Feb; **68(2)**: 552-8.
- Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2012 Dec; **17(12)**: 1714-27.

Zhang Y, Zhao Z, Ke B, Wan L, Wang H, Ye J. Induction of Posttranslational Modifications of Mitochondrial Proteins by ATP Contributes to Negative Regulation of Mitochondrial Function. PLoS One. 2016 Mar 1; **11(3)**: e0150454.

Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. J Neurochem. 2008 Jan; **104(2)**: 325-35.

6 – ANEXO I: Parecer de aprovação do Comitê de Ética.



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Influência da Transidrogenase de Nucleotídeos de Nicotinamida (NNT) na Função de Mitocôndrias Hepáticas em Resposta à Dieta Hiperlipídica", protocolo nº 3914-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi / Claudia Daniele Carvalho Navarro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 17 de agosto de 2015.

Vigência do projeto: 09/2015-08/2017

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / C57BL/6/JUnib

No. de animais: 200

Peso/Idade: 30 dias / 23gr

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 17 de agosto de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II: Autorização de “Copyright” de publicação:

Navarro CDC, Figueira TR, Francisco A, Dal’Bó GA, Ronchi JA, Rovani JC, Escanhoela CAF, Oliveira HC, Castilho RF, Vercesi AE. “Redox Imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-Transhydrogenase Markedly Aggravates High Fat Diet-Induced Fatty Liver Disease in Mice”. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 190-202, 2017.

A editora “Elsevier” permite o uso de artigo em Tese do autor, dispensando a solicitação específica (<https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>).