

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AÇÃO DA SINVASTATINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATO-
HEPATITE NÃO ALCOÓLICA**

Graziella Ramos Rodrigues

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AÇÃO DA SINVASTATINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATO-
HEPATITE NÃO ALCOÓLICA**

Graziella Ramos Rodrigues

Orientadora: Prof. Dra. Norma Possa Marroni

*Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor*

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Graziella Ramos
Ação da sinvastatina no modelo experimental de
Esteato-Hepatite não alcoólica / Graziella Ramos
Rodrigues. -- 2014.
116 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Esteato-Hepatite não alcoólica. 2.
Sinvastatina. 3. Dieta deficiente em metionina e
colina. 4. Fígado. I. Marroni, Norma Possa, orient.
II. Título.

Dedico este trabalho à minha família:

*Aos **meus pais**, Paulo Renato e Suzette Rodrigues. Ele, agora meu anjo no céu, mas para sempre meu grande incentivador; ela, a grande parceira na minha vida, o eterno exemplo de dedicação e amor.*

*Ao **meu marido**, Rafael Mello, agradeço intensamente as palavras de incentivo que me ajudaram a não desanimar. Obrigada pela paciência dedicada e pela constante presença na vida*

*Ao **meu irmão e cunhada**, Eduardo Rodrigues e Letícia Medina, meu carinho e agradecimento por me concederem a alegria de ser tia e dinda do Nikholas e da Lara.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

`A doutora Norma Possa Marroni, muito obrigada pela oportunidade profissional e de vida que me proporcionou. O presente trabalho, não tenho dúvidas, aconteceu porque SEMPRE esteve ao meu lado, acreditando em mim, apoiando meu esforço, confiando na minha capacidade e principalmente me dando forças nos momentos turbulentos. Passaram-se onze anos, desde que entrei no laboratório e, hoje, tenho certeza de que muito mais que minha “prof” e orientadora, tenho uma amiga por quem tenho muito respeito. Obrigada por acreditar em mim, até mesmo nos momentos em que eu não acreditava.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Claudio Marroni, meu reconhecimento e carinho pela disponibilidade durante a minha trajetória e, além das sugestões, pelas correções deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Simões Dias, ao Dr. Henrique Fillmann e à Dra. Marilene Porawski, agradeço o apoio, as palavras de incentivo e a disponibilidade em todos os momentos deste trabalho e da vida.

A Silvia Bona, pessoa responsável pela minha entrada na pesquisa e com quem eu pude contar durante todos os anos de trajetória entre faculdade e pós-graduação, meu carinho e agradecimento por ser a amiga das horas boas e ruins.

À Andrea Janz Moreira, minha professora, minha colega e principalmente minha amiga, agradeço a presença constante na execução das técnicas deste trabalho, além das horas de conversas, sugestões e ideias pertinentes.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo da ULBRA, em especial, Elizângela Schemitt, Adriane Dal Bosco, Jozielli Raskopf, Renata Minuzzo, Francielli Licks, Maira Moraes, Mariana Soraes, Dra. Maria Isabel Morgan-Martins, Dra. Themis Reverbel da Silveira, Dr. Jorge Santos, Thais Ortiz, Larisse Longo, Leila Fratta e Giovana Weber agradeço o carinho, a ajuda e a dedicação disponibilizada durante diferentes etapas de concretização deste trabalho.

À Dra. Lidiane Filippin, que se tornou minha grande amiga, meu reconhecimento por fazer parte da minha vida e por me deixar fazer parte da sua vida.

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial, à secretaria em nome do Sr. Everaldo Almeida, a toda a equipe da Unidade de Experimentação Animal, à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, ao Laboratório de Patologia Experimental, ao Grupo de pesquisa e pós-graduação, a cada um dos componentes de cada setor, meu carinho e reconhecimento.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, meu reconhecimento, afeto e amizade.

Finalmente, o agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) pelo financiamento do projeto.

RESUMO

Os conhecimentos atuais têm mostrado que a Esteato-Hepatite não alcoólica (EHNA), é a mais importante forma epidemiológica e clínica da Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Até o momento não existe terapia comprovada e conclusiva para o tratamento da EHNA. As estatinas são uma importante classe de agentes para tratar dislipidemia, mas ainda há relutância de usar esse medicamento em pacientes com doenças crônicas estabelecidas ou suspeita de doença hepática, EHNA inclusive.

Objetivo: Avaliar o efeito da sinvastatina (SIM) sobre o tecido hepático em camundongos C57BL6 com EHNA, induzida por dieta MCD, na tentativa de elucidar a ação desse fármaco sobre as complicações desse modelo experimental. **Métodos:** Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=13): CO+V (I – ração controle + veículo de carboximetilcelulose), SIM 4 (II- ração controle + 4mg/Kg de SIM), EHNA+V (III- dieta MCD mais veículo), EHNA+SIM 4 (IV- dieta MCD mais sinvastatina). As dietas foram administradas por 4 semanas e a SIM (na dose de 200 µL, intragastricamente) durante as 2 últimas semanas. Foram realizadas análises séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol e triglicerídeos, teste anatomopatológico, avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa, avaliação da lipoperoxidação (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico-TBARS) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), bem como os parâmetros moleculares de estresse oxidativo e reticular, dano celular, inflamação, disfunção endotelial e fibrose através da expressão proteica de NQO1, KEAP1, Nrf2, ATF6, GRP78, TGF- β , eNOS, iNOS, IL-12, HSF1 e HSP70 respectivamente, por *Western blotting*, avaliando o efeito da SIM. **Resultados:** Após o tratamento com sinvastatina observou-se melhora na integridade hepática e diminuição nos lipídios hepáticos. No teste anatomopatológico todos os animais doentes apresentam inflamação, esteatose microvacuolar e macrovacuolar além de balonização hepatocelular e a sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente esta alteração. Quanto ao dano ao DNA, o ensaio cometa revelou que a dose de 4mg/Kg de sinvastatina não foi capaz de induzir dano ao DNA. Constatou-se também uma redução do dano oxidativo e às enzimas antioxidantes mantiveram seus valores semelhantes aos controles. A SIM ativou enzimas

antioxidantes via Nrf2 e inibiu o estresse do retículo endoplasmático além de reduzir a fibrose, melhorar a função endotelial, diminuir a inflamação e o dano celular.

Conclusão: Os resultados obtidos sugerem que a administração da sinvastatina, após estabelecimento da EHNA, desempenhou um papel protetor no fígado a julgar pelos parâmetros analisados, possivelmente devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

ABSTRACT

Current knowledge have shown that non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is the most important epidemiological and clinic nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). So far there is no proven efficient therapy for the treatment of NAFLD. Statins are an important class of agents to treat dyslipidemia, but there is still reluctance to use this drug in patients with established or suspected chronic liver disease, including NASH.

Objective: To evaluate the effect of simvastatin (SIM) on liver tissue in C57BL6 mice with NASH induced by MCD diet in an attempt to elucidate the action of this drug on the complications of this experimental model. **Methods:** Male C57BL/6 mice were used at 8 weeks. The animals were divided into 4 groups (n=10): CO+V (I- control diet + vehicle carboxymethylcellulose), SIM 4 (II-control diet + 4mg/kg SIM), NASH+V (III-MCD diet plus vehicle), NASH+SIM 4 (IV-MCD diet plus simvastatin). The diets were administered for 4 weeks and the SIM (200 μ l, intragastrically) for the last 2 weeks. Analyzes of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol and triglycerides, pathology testing, assessment of DNA damage by comet assay, assessment of lipid peroxidation (substances that react to TBARS-thiobarbituric acid) and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the molecular parameters of oxidative and reticular stress, fibrosis, endothelial dysfunction, inflammation and cellular injury through the expression protein of NQO1, KEAP1, Nrf2, ATF6, GRP78, TGF- β , eNOS, iNOS, IL-12, HSF1 and HSP70 respectively, for Western blotting, assessing the effect of the SIM. **Results:** After treatment with simvastatin was observed an improvement in liver integrity and decrease in hepatic lipids. Pathology test all sick animals exhibit inflammation, micro and macrovesicular steatosis, hepatocellular ballooning. SIM was able to significantly reduce this change. For the DNA damage, the comet assay revealed that the dose of 4mg/kg simvastatin was unable to induce DNA damage. We also observed a reduction of oxidative damage and antioxidant enzymes maintained their values similar to controls. SIM activated antioxidant enzymes via Nrf2 and inhibited endoplasmic reticulum stress, reduce the fibrosis, improve endothelial function, inflammation and reduce cellular damage. **Conclusion:** The results suggest that the administration of simvastatin after

establishment of NASH, played a protective role in the liver according the parameters, possibly due to its antioxidant and anti-inflammatory properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca.....	17
Figura 2. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	19
Figura 3. Hepatócitos balonizados.....	23
Figura 4. Esteato-hepatite com esteatose macrovesicular e foco inflamatório.....	24
Figura 5. Característica padrão "Chicken wire".....	25
Figura 6. Metabolismo lipídico normal.....	26
Figura 7. Mecanismos da esteatose hepática.....	27
Figura 8. Influência de radicais livres, peroxidação lipídica e citocinas no desenvolvimento da EHNA.....	29
Figura 9. Principais fontes que levam a formação de espécies reativas e defesas antioxidantes.....	33
Figura 10. Produção e degradação de radicais de oxigênio.....	35
Figura 11. Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO.....	36
Figura 12. Indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes através da via de sinalização Keap1/Nrf2.....	37
Figura 13. Via de sinalização em resposta às proteínas desdobradas no Retículo Endoplasmático.....	38
Figura 14. Efeitos das estatinas na biossíntese do colesterol.....	43
Figura 15. Efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	44
Figura 16. Mecanismo antioxidante das estatinas.....	45
Figura 17. Representação química da sinvastatina.....	46
Figura 18. Marco conceitual esquemático.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Importantes espécies reativas no sistema biológico.	34
Tabela 2.Classificação das proteínas de choque térmico, divididas em famílias de acordo com o peso molecular.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ALT	Alanina Amino Transferase
AST	Aspartato amino Transferase
ATF6	do inglês, <i>activating transcription factor 6</i>
BiP	do inglês, <i>immunoglobulin binding protein</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
Cl [•]	Cloro Atômico
Cl ₂	Gás Cloro
CO ₃ ²⁻	Carbonato
Cu ⁺	Cobre
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EHNA	Esteato-Hepatite não alcoólica
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERA	Elemento Responsivo Antioxidante
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
FGNA	Fígado Gorduroso Não Alcolico
Fipe	Fundo de Incentivo à Pesquisa
γGT	Gama Glutamil Transpeptidase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GRP78	do inglês, <i>Glucose-regulated protein 78</i>
GSH	Glutationa Reduzida
GTPase	Proteínas de Ligação Guanina Trifosfato
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
HNE	Hidroxinonal
HNO ₂	Ácido Nitroso
HOCl	Ácido Hipocloroso
HSC	Células Estreladas Hepáticas
HSE	do inglês, <i>Heat Shock Element</i>
HSF	do inglês, <i>Heat Shock Factors</i>
HSP	do inglês, <i>Heat Shock Protein</i>
ICAM	Molécula de Adesão
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível

IRE-1	do inglês, <i>Inositol Requiring Protein 1</i>
JNK	Jun amino terminal quinase
KDa	Quilodaltons
KEAP1	Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein 1
Kg	Quilograma
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LPO	Lipoperoxidação
MCD	Deficiente em Metionina e Colina
MCP	Proteína Quimiotática de Macrófagos
MDA	Malondealdeído
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
NAFLD	do inglês, Non-alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	do inglês, Non-Alcoholic Steatohepatitis
N ₂ O ₃	Trióxido Dinitrogênio
N ₂ O ₄	Tetraóxido Dinitrogênio
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO ⁺	Cátion Nitrosila
NO ⁻	Ânion Nitrosila
NO	Óxido Nitrico
NO ₂ [•]	Dióxido de Nitrogênio
NO ₂ Cl	Nitro-Cloro-Benzeno
NQO1	NAD(P)H: Quinona Oxidorredutase 1
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
O ₂	Oxigênio
¹ O ₂	Oxigênio <i>singlet</i>
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PERK	do inglês, <i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PKC	Proteína quinase C
RE	Retículo Endoplasmático
RO ₂ [•]	Peroxila
RO [•]	Alcoxila
ROOH	Peróxidos Orgânicos
ROONO	Alquil Peroxinitrito
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteína
SIM	Sinvastatina ou Simvastatin
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
μL	Microlitro
UPR	do inglês, <i>Unfolded Protein Response</i>
VCAM	Molécula de Adesão da Célula Vascolar
VLDL	do inglês, <i>Very Low Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações	17
2.2 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-Hepatite Não Alcoólica	18
2.2.1 <i>Definição</i>	18
2.2.2 <i>Epidemiologia da DHGNA e EHNA</i>	20
2.2.3 <i>Fatores de risco para DHGNA/EHNA</i>	21
2.2.4 <i>Alterações histológicas e Diagnóstico da DHGNA/EHNA</i>	22
2.2.5 <i>Aspectos da Fisiopatogênica da DHGNA/EHNA</i>	25
2.2.6 <i>Modelo animal de EHNA – Modelo nutricional deficiente em metionina e colina.</i>	29
2.3 Estresse Oxidativo	32
2.4 Estresse do Retículo Endoplasmático	38
2.5 Proteínas do Choque Térmico	39
2.6 Estatinas	42
2.6.1 <i>Estatina na EHNA</i>	46
3 MARCO TEÓRICO	48
4 JUSTIFICATIVA	50
5 OBJETIVOS	51
5.1 Objetivo Geral	51
5.2 Objetivos Específicos	51
5.2.1 <i>Objetivos Específicos do artigo I</i>	51
5.2.2 <i>Objetivos Específicos do artigo II</i>	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7 ARTIGOS	67
7.1 Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis	67
7.2 Simvastatin treatment attenuates non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline deficient diet in mice	87
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
8.1 Conclusões	109
8.2 Perspectivas Futuras	110
ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

O termo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende um largo espectro de condições associadas ao acúmulo excessivo de lipídios no fígado, variando da esteatose ou fígado gorduroso não alcoólico (FGNA) à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), podendo progredir para formas mais graves como fibrose e cirrose e carcinoma hepatocelular^(1,2).

A DHGNA possui distribuição mundial e sua prevalência pode aumentar com a idade, atingindo seu pico na 4ª década em homens e, na 6ª década, em mulheres ⁽³⁾ e varia amplamente dependendo da população estudada e do método de diagnóstico usado ⁽⁴⁾. A incidência de DHGNA foi investigada em um número limitado de estudos e serão necessárias novas investigações para entender melhor a sua incidência de DHGNA em diferentes faixas etárias, grupos étnicos e áreas geográficas ⁽⁴⁾.

O tratamento para DGHNA ainda permanece controverso. Existem estudos que, entre as medidas não-farmacológicas, sugerem a perda de peso, tanto por dieta quanto por exercício físico. Apesar dos benefícios da mudança do estilo de vida sobre a regressão da DGHNA, sabe-se que 50% dos pacientes não conseguem atingir as metas de perda de peso ⁽⁵⁾.

Não há consenso quanto ao tratamento farmacológico da DHGNA. Os estudos enfocam os mecanismos-alvo da doença, na tentativa de encontrar terapias específicas com ação localizada, utilizando, dessa forma, fármacos que promovam a sensibilização à insulina, reduzam a dislipidemia, a inflamação e/ou o estresse oxidativo ⁽⁵⁻⁷⁾. As propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias das estatinas, como a sinvastatina, fazem dela uma possível ferramenta terapêutica para esta doença ⁽⁷⁾.

A denominação EHNA foi criada por Ludwig e colaboradores em 1980 para descrever uma condição, na maioria das vezes assintomática, caracterizada por alterações de provas de função hepática, hepatomegalia e achados histológicos semelhantes aos observados em pacientes com doença hepática alcoólica, porém sem histórico de abuso alcoólico ⁽⁸⁾.

A EHNA está englobada dentro da DHGNA. Enquanto a esteatose apresenta um curso clínico benigno, a EHNA pode evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular ⁽⁹⁾.

A prevalência da EHNA é menor que a da esteatose e estima-se que a razão entre as duas seja de 1:3 ⁽¹⁰⁾.

Este estudo tem como objetivo avaliar as alterações hepáticas decorrentes da EHNA e os efeitos da sinvastatina na sua evolução.

A apresentação da tese será em seções. Após a seção de introdução (seção 1), será apresentada a revisão da literatura (seção 2). Posteriormente, o marco conceitual (seção 3), a justificativa (seção 4), os objetivos do estudo (seção 5) e as referências bibliográficas (seção 6) utilizadas na seção 1 e 2, respectivamente.

Os resultados do presente estudo serão apresentados na forma de dois artigos científicos (seção 7). O primeiro artigo intitulado: “***Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis***” foi submetido, para publicação, na revista ***Journal of Biomedicine and Biotechnology***. O segundo artigo, intitulado: “***Simvastatin treatment attenuates non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline deficient diet in mice***”, foi submetido, para publicação na revista ***Protoplasma***. E as considerações finais serão apresentadas na oitava seção.

Este trabalho contou com o auxílio financeiro do FIPE/HCPA e CAPES.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

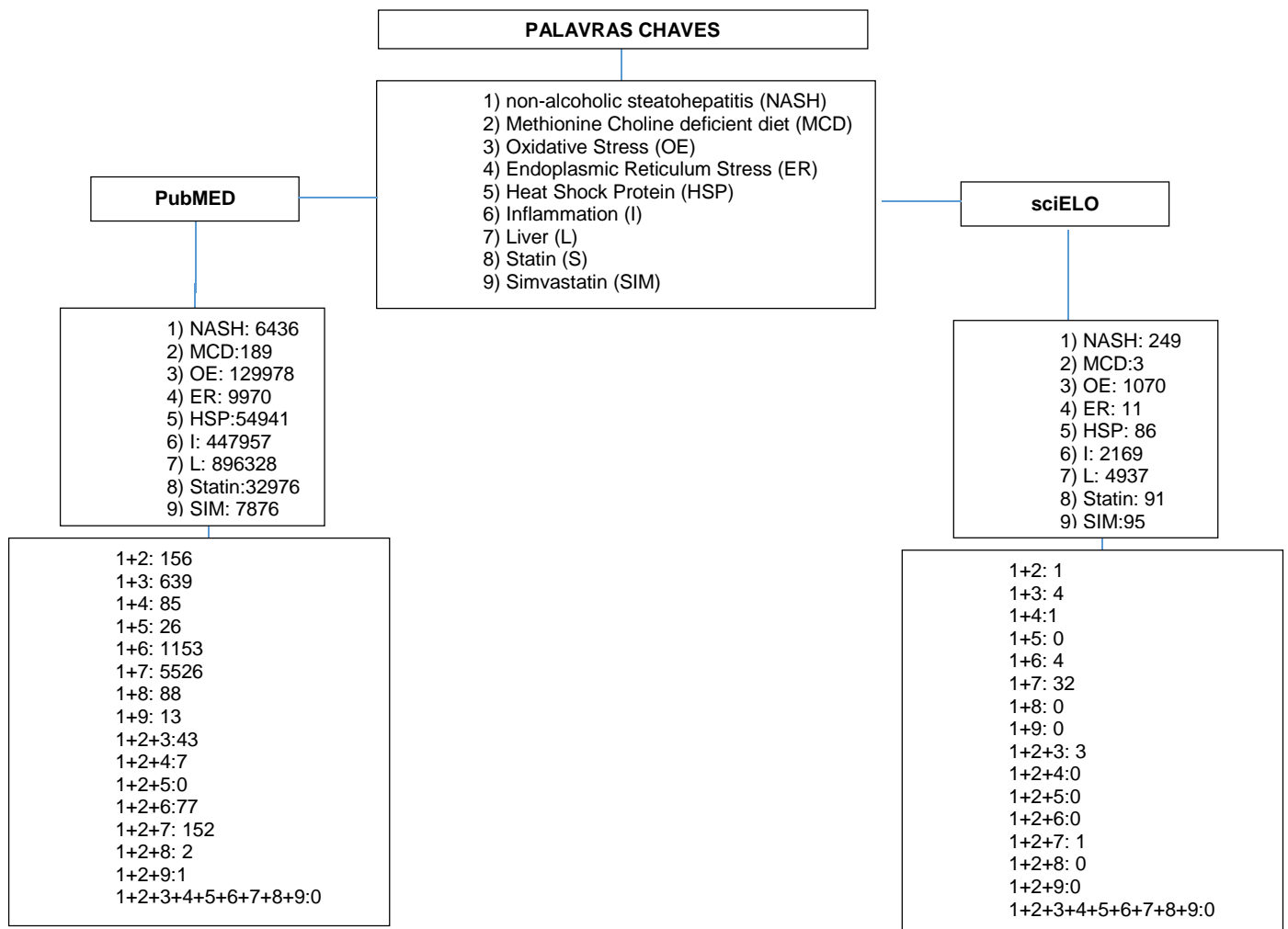
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Nesta revisão da literatura, buscamos ressaltar os principais aspectos relacionados com a EHNA, englobando o papel dos diferentes tipos de estresse como o oxidativo e reticular, o dano celular e processos inflamatórios bem como o uso da simvastatina.

A estratégia de busca envolveu as bases de dados MEDLINE (*página*, PubMed) e SciELO (**Figura 1**). Também foram consultados bancos de monografias, dissertações e teses de diversas universidades brasileiras, além de livros-texto.

As referências bibliográficas dos artigos identificados foram revisadas para localizar outros não contemplados na busca. Nos sites PubMed e SciELO foram realizadas buscas com palavras chaves, que estão ao longo da tese.

Figura 1. Estratégia de busca



2.2 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Esteato-Hepatite Não Alcoólica

2.2.1 Definição

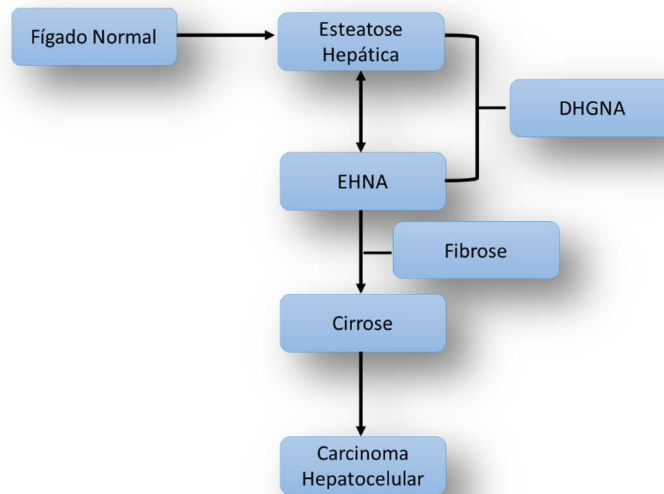
A DHGNA é considerada, atualmente, uma das causas mais comuns de doença hepática crônica e reconhecida como causa importante para o crescimento na morbimortalidade relacionada a alterações metabólicas ^(11,12).

A DHGNA é o acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos, sem a presença da ingestão de álcool ⁽¹³⁾. A sua definição exige dois aspectos: requer a presença de esteatose hepática documentada por análise histológica ou exames de imagem e ausência de causas para o acúmulo secundário de gordura hepática, como alto consumo de álcool, uso de medicamentos esteatogênicos ou doenças hereditárias ⁽⁴⁾.

Histologicamente, a DHGNA é dividida em esteatose e EHNA. A esteatose é definida pela presença de esteatose hepática sem evidências de lesão hepatocelular. A EHNA é definida pela presença de esteatose hepática e infiltrado inflamatório, com lesão hepatocelular (balonização hepatocelular) com ou sem fibrose ⁽⁴⁾.

Os conhecimentos atuais têm mostrado que a EHNA é a mais importante forma epidemiológica e clínica da DHGNA, com potencial de evolução para formas mais graves como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (**Figura 2**) ^(14,15).

Figura 2. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.



Fonte: Adaptado de Iser D, Ryan M ⁽¹⁶⁾

Os primeiros relatos de EHNA ocorreram em 1962, quando Leevy ⁽¹⁷⁾ estudou a associação entre a esteatose hepática, com ou sem necrose, em indivíduos não alcoolistas, obesos ou diabéticos ⁽¹⁸⁾.

No final da década de 1970, Schaffner e Adler ⁽¹⁹⁾, ao avaliarem 29 pacientes obesos, 22 (75%) do sexo feminino, 18 (62%) com diagnóstico de diabetes mellitus, com alterações de provas de função hepática e/ ou hepatomegalia, sem história de alcoolismo, encontraram esteatose em sete pacientes; esteatose acompanhada de infiltrado inflamatório em oito, que denominaram “hepatite gordurosa”; esteatose, infiltrado inflamatório e fibrose em sete, e, nos sete restantes, constataram a presença de cirrose ⁽²⁰⁾.

Por longo tempo, devido à falta de uma terminologia adequada e devido à resistência em reconhecer a etiologia proposta, muitos pacientes foram denominados de alcoolistas não confessos. A denominação EHNA foi introduzida em 1980 por Ludwig e colaboradores ⁽⁸⁾, que a descreveram como entidade clínico-histopatológica observada em mulheres obesas e diabéticas, que negavam o uso de álcool, mas apresentavam alterações no fígado muito semelhantes às da hepatite alcoólica, com aumento do volume do fígado, alterações em exames laboratoriais e biópsias hepáticas com macrovesículas de gordura nos hepatócitos, balonização, necrose focal, inflamação e corpúsculos hialinos de Mallory ^(8, 21,22).

2.2.2 Epidemiologia da DHGNA e EHNA

A DHGNA é a pandemia hepática do século XXI, sendo a causa número um de doença hepática crônica no mundo ocidental ^(23,24).

São poucas as pesquisas que relatam a incidência de DHGNA ⁽⁴⁾. Em dois estudos japoneses ^(25,26), a incidência anual aproximada foi de 10% em um, e no outro, de 31 casos por 1.000 pessoas-ano. Na Inglaterra, encontraram a incidência de 29 casos por 100.000 pessoas/ano ⁽²⁷⁾.

A prevalência da DHGNA está aumentando em todo o mundo, em paralelo com o aumento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2 ⁽²⁸⁾ e sofre influências tanto de variações geográficas e étnicas, como do tipo de estudo realizado (dados de necrópsias, biópsias ou métodos de imagem).

A prevalência da DHGNA, por definição histológica, foi de 20% e 51%, em dois estudos diferentes, compreendendo potenciais doadores de fígado ⁽²⁹⁾. Quando a ultrassonografia foi empregada como método de diagnóstico, a prevalência variou entre 17% e 46%, dependendo da população estudada ⁽³⁰⁾. Em outro estudo, realizado com 400 indivíduos de meia idade, a prevalência de DHGNA, definida por ultrassonografia, foi de 46%, e a confirmação histológica de EHNA foi de 12,2% ⁽³¹⁾. Em estudo recente, empregando somente níveis séricos das aminotransferases como diagnóstico, a prevalência da DHGNA variou entre 7% e 11% ⁽³⁰⁾.

A DHGNA é a causa mais comum de doença hepática crônica no grupo pediátrico, varia de 2,6% a 9,6% avaliada por método ultrassonográfico ou através de autópsias de pacientes com morte acidental ⁽³²⁾. É mais prevalente em adolescentes do que em crianças, e os fatores que explicam isso incluem os hormônios sexuais e a resistência insulínica ⁽³³⁾.

A prevalência da DHGNA foi de 2,3% em adolescentes brasileiros (média de idade $14 \pm 2,0$ anos), assintomáticos e obesos. Esse estudo utilizou como diagnóstico a presença de esteatose hepática (ultra-som) ou elevados níveis da alanina aminotransferase (ALT). A maioria dos adolescentes que apresentaram esses parâmetros era do sexo masculino e de cor branca ⁽³⁴⁾.

Em estudo recente, que incluiu 1.280 doentes de vários estados brasileiros, foram descritas as características demográficas e clínicas da DHGNA; a média de idade foi de 50 ± 14 anos e 53% eram do sexo masculino. Os fatores de riscos mais frequentes foram dislipidemia, observada em 67% dos casos, obesidade em 45%, sobrepeso em 44%, diabetes mellitus em 23% e exposição às toxinas em 10%. A biópsia hepática, realizada em 437 casos, mostrou EHNA com fibrose em 27% e cirrose em 15%⁽³⁵⁾.

Em 98 pacientes diabéticos, brasileiros, a prevalência de EHNA na biópsia hepática foi de 78%, correlacionada com hipertrigliceridemia, elevação da ALT e baixa lipoproteína de alta densidade no soro (HDL). Os fatores independentes, correlacionados com fibrose avançada, foram níveis séricos elevado de gama glutamil transpeptidase (γ GT) e sexo masculino⁽³⁶⁾.

A real prevalência da EHNA é difícil de ser estimada, pois a doença apresenta-se de forma assintomática e de difícil diagnóstico. Mesmo assim, estima-se a sua prevalência de 3 a 5%⁽⁴⁾.

2.2.3 Fatores de risco para DHGNA/EHNA

Do ponto vista etiológico, dois tipos principais de condições podem causar DHGNA/EHNA: 1- as associadas à síndrome metabólica; 2- ou associadas a outras condições^(37,38,39).

- 1- Obesidade, diabetes mellitus tipo II e hiperlipidemia são os fatores de risco primário mais frequentes. A resistência à insulina tem sido considerada um dos mecanismos-chaves na patogênese de DHGNA. Esses dados motivaram a sugestão de que a DHGNA (esteatose e EHNA) seja mais um dos componentes da síndrome metabólica, caracterizada por obesidade central, triglicérides elevado, HDL- colesterol baixo e hipertensão arterial.
- 2- Uso de fármacos, esteroides, anabolizantes, exposição crônica a produtos químicos, exposição ocupacional a substâncias voláteis tóxicas, doença de Wilson, perda de peso rápida e acentuada, lipodistrofias hereditárias e

adquiridas, procedimentos cirúrgicos relacionados à derivação intestinal em obesos e uso de nutrição parenteral total.

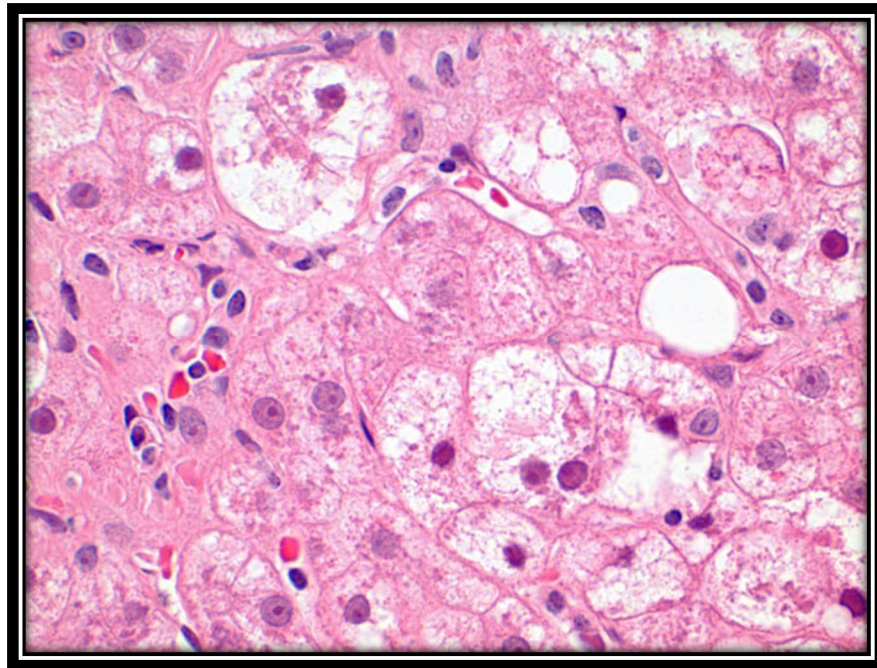
2.2.4 Alterações histológicas e Diagnóstico da DHGNA/EHNA

O conjunto das alterações observadas no tecido hepático reflete o que se supõe ser a sequência patogênica da doença ⁽³⁷⁾.

- **Esteatose:** A esteatose macrovacuolar é representada por hepatócitos contendo um grande e único vacúolo de gordura que desloca o núcleo da célula, do centro para a periferia. A esteatose é mais comum na zona 3 do ácino hepático, entretanto, se for mais intensa, pode ocupar todo o ácino hepático ⁽⁴⁰⁾. Esse tipo de esteatose é a mais comum na DHGNA; quando não está acompanhada de outras alterações histológicas hepáticas, não resulta em progressão para formas mais graves da doença ⁽²²⁾. A esteatose microvacuolar é representada por hepatócitos contendo inúmeros e pequenos vacúolos de gordura. Este tipo de esteatose está relacionada ao prejuízo da β -oxidação mitocondrial hepática de ácidos graxos ⁽⁴¹⁾ mas não é fator definidor do diagnóstico da DHGNA e reflete alterações mais graves do metabolismo celular ⁽³⁷⁾.

- **Balonização hepatocelular:** É uma degeneração celular representada por hepatócitos distendidos, com forma globosa (em balão), (**Figura 3**), com citoplasma amplo, claro e com aspecto de baixa densidade ^(42, 43). Reflete alterações da permeabilidade da membrana, decorrentes da ação de radicais livres. A presença da balonização é fundamental para o diagnóstico de EHNA e relaciona-se ao risco de progressão para a fibrose ^(22,49).

Figura 3. Hepatócitos balonizados.

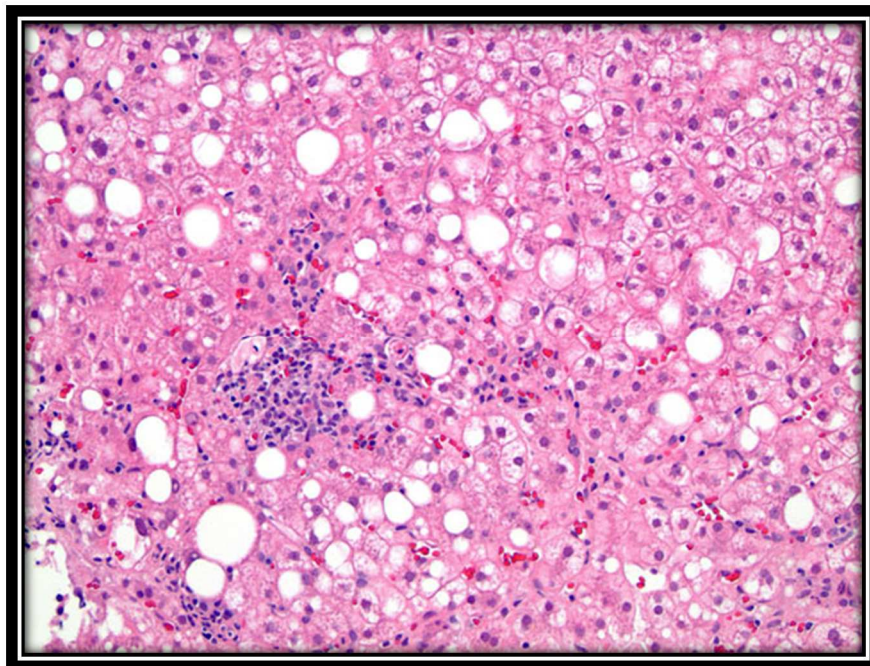


Hepatócitos balonizados e corpos de Mallory-Denk (hematoxilina-eosina, 600x).
Fonte: 44

- **Corpúsculos de Mallory:** São inclusões citoplasmáticas hialinas, apresentam-se como grânulos, cordões ou agregados fortemente eosinofílicos, constituídos por queratinas (principalmente 8 e 18), proteínas de choque térmico (HSP), por proteínas envolvidas em processos de degradação e eventualmente proteínas inespecíficas incorporadas aos agregados ^(45, 46).

- **Inflamação (Figura 4):** Pode ser desencadeada por vários fatores como o estresse oxidativo ⁽⁴⁷⁾ e a lipotoxicidade (lesão ou morte celular causada pelos ácidos graxos livres e seus metabólitos). Tais ácidos graxos livres e seus metabólitos, como o diacilglicerídeo, o colesterol livre e a ceramida podem ser tóxicos para o hepatócito e, assim, iniciarem o processo inflamatório ^(48,49). Os adipócitos podem liberar citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), o que influencia no desenvolvimento da inflamação hepática ⁽⁵⁰⁾. Além disso, evidências sugerem que a liberação de endotoxinas, derivadas do intestino, podem participar da inflamação hepática ⁽⁵¹⁾. Independentemente do fator que inicia os processos inflamatórios, as vias de sinalização que ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a quinase c-Jun-N terminal (JNK) são as vias mais comuns nas respostas pró-inflamatórias durante a EHNA, resultando na expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão ^(49,52-54).

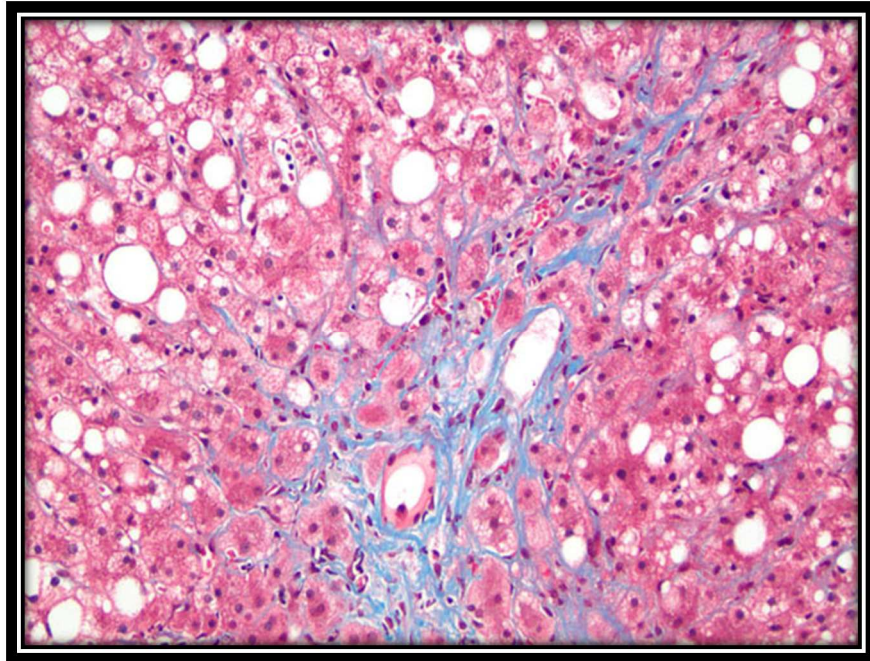
Figura 4. Esteato-hepatite com esteatose macrovesicular e foco inflamatório.



EHNA com esteatose e focos predominantemente macrovesicular e inflamatório, composto predominantemente de linfócitos e células de Kupffer nos lóbulos hepáticos (hematoxilina-eosina, 200x)
Fonte: 44

- **Fibrose:** É caracterizada pelo acúmulo de tecido cicatricial em resposta à lesão hepática crônica ⁽⁵⁵⁾, ou seja, é uma resposta de cicatrização reversível caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC), principalmente de colágeno, pelas células estreladas hepáticas (HSC) ativadas após lesão hepática ^(56,57). Em adultos com EHNA, a fibrose geralmente começa na zona 3 do ácino hepático e tem uma característica padrão "*chicken wire*" (**Figura 5**) devido a deposição de colágeno e outras fibras da MEC ao longo dos sinusóides da zona 3 e em torno dos hepatócitos ⁽⁴⁰⁾. Como consequência final da fibrose progressiva, desenvolve-se cirrose. A fibrose não é uma alteração requerida para o diagnóstico de EHNA, mas sua presença é um indicador de doença com risco de progressão para estágios mais avançados, a cirrose ⁽⁴⁰⁾.

Figura 5. Característica padrão "Chicken wire".



Fibrose perivenular / pericelular na EHNA (200x).

Fonte: 44

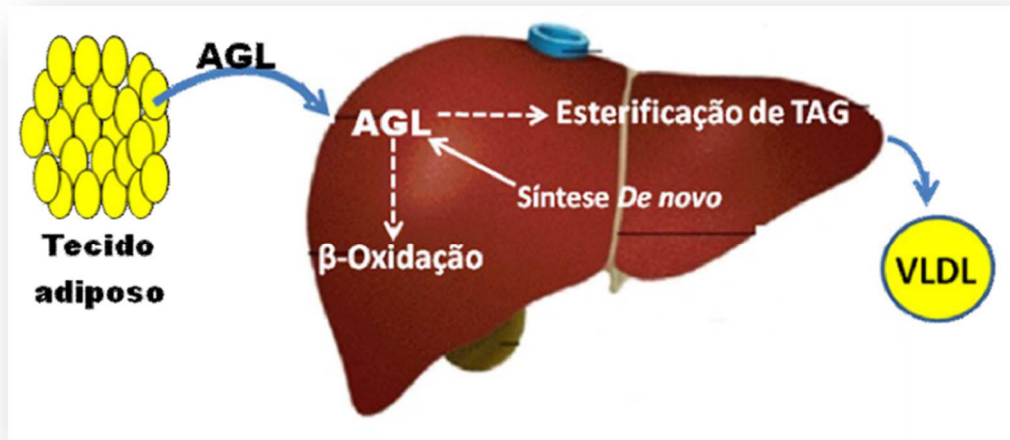
A definição histológica da DHGNA consiste na presença de depósitos gordurosos no citoplasma de mais de 5% dos hepatócitos. Para a maioria dos hepatologistas, os critérios mínimos para o diagnóstico histológico de adulto EHNA; em adultos, incluem esteatose e balonização ⁽⁴⁰⁾. Os critérios histológicos para a sua definição e a sua gradação têm, contudo, sido alvo de forte controvérsia. Os *guedlines* da *American Association for the Study of liver* propuseram que a EHNA seja definida pela presença de esteatose e inflamação hepática com balonização, com ou sem fibrose ⁽⁵⁸⁾.

2.2.5 Aspectos da Fisiopatogênica da DHGNA/EHNA

Ainda não estão bem entendidos os mecanismos de desenvolvimento da esteatose hepática.

No fígado (**Figura 6**), os ácidos graxos livres, provenientes da lipólise ou da dieta, são captados pelo hepatócito, oxidados na mitocôndria ou esterificados em triglicerídeos. Tais triglicerídeos podem ser estocados no hepatócito ou incorporados a partículas de VLDL (*very low density lipoprotein*) para exportação ^(59,60,61).

Figura 6. Metabolismo lipídico normal.



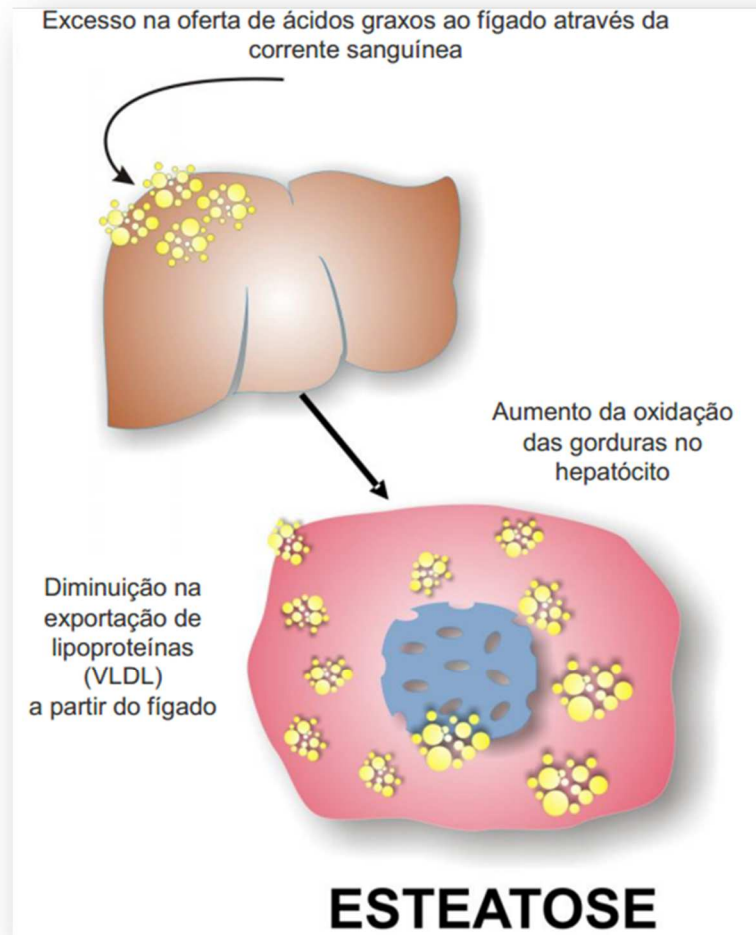
AGL: ácidos graxos livres; VLDL: *very low density lipoprotein*; TAG: Triglicerídeos

Fonte: 62

O acúmulo excessivo de lipídeos nos hepatócitos em indivíduos com esteatose (**Figura 7**) parece ocorrer por um desequilíbrio entre a síntese e a exportação e/ou oxidação dos triglicerídeos ⁽⁶³⁾, mais especificamente:

- Diminuição da síntese e secreção de lipoproteínas;
- Aumento da lipólise no tecido adiposo, principalmente o visceral;
- Aumento do fluxo de ácidos graxos livres no hepatócito;
- Alteração da β -oxidação nas mitocôndrias dos hepatócitos;
- Aumento na lipogênese hepática ⁽⁶⁴⁾.

Figura 7. Mecanismos da esteatose hepática.



Fonte: 65

Os mecanismos que promovem a progressão da esteatose hepática à esteato-hepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular ainda não são bem compreendidos. Atualmente, a DHGNA tem sido considerada uma doença poligênica e multifatorial, ou seja, sofre influências do *back ground* genético, de fatores ambientais e do estilo de vida (dieta e sedentarismo).

Assim, sua fisiopatogênese torna-se complexa, envolvendo múltiplos fatores. Atualmente, a maioria dos autores acredita na teoria dos múltiplos “*hits*”, em que a resistência insulínica seria a condição inicial para o acúmulo de ácidos graxos no hepatócito (primeiro *hit*), uma vez que favorece a lipogênese e inibe a lipólise, até mesmo no fígado, aumentando significativamente o aporte de ácidos graxos a esse órgão, seguida de uma sequência de eventos com o aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático (RE), disfunção mitocondrial e endotoxemia

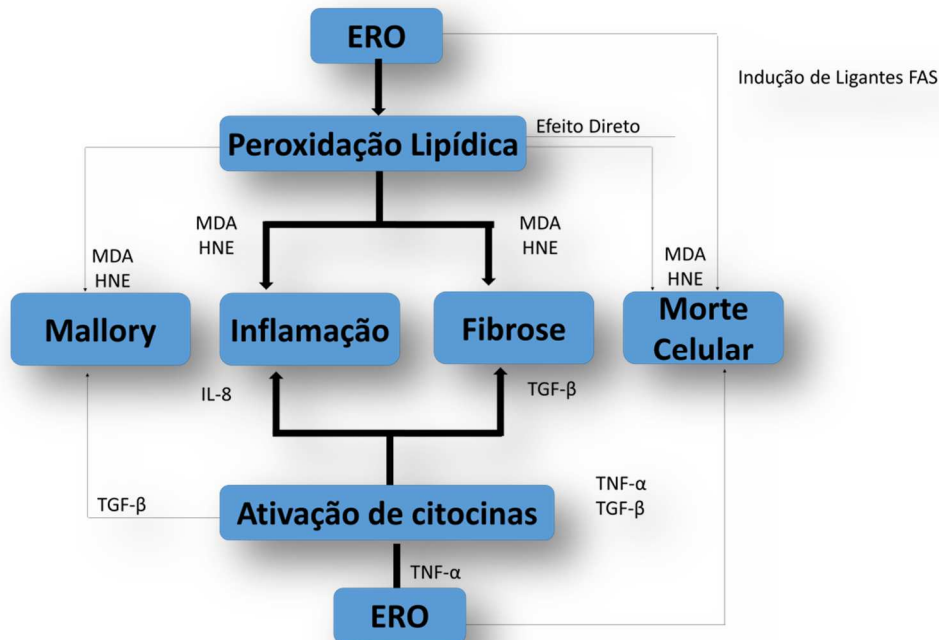
crônica (múltiplos *hits*). Assim, o fígado esteatótico ficaria vulnerável aos *hits*, levando à lesão hepatocelular, à inflamação e à fibrose ⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾.

A resistência insulínica, importante fator de risco para a DHGNA, pode promover a esteatose por mecanismos como hiperinsulinemia, aumento de ácidos graxos livres na circulação (provenientes da lipólise do tecido adiposo), desequilíbrio na produção de citocinas, entre outros. O aumento da captação destes ácidos graxos pelo hepatócito promove uma sobrecarga na β -oxidação mitocondrial, acumulando ácidos graxos nos hepatócitos e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres ^(63,70,71), desencadeando injúria celular e ativação dos mecanismos de fibrose. A resistência insulínica também bloqueia a exportação de triglicérides do hepatócito por degradar e impedir a produção de VLDL ⁽⁷²⁻⁷⁵⁾.

O excessivo aporte de ácidos graxos, a fim de ser oxidado, é direcionado para a mitocôndria do hepatócito. Pode promover uma disfunção mitocondrial ao esgotar a β -oxidação, causando a superprodução de EROs, ativando vias alternativas (vias microsomal e nos peroxissomos) que geram mais EROs. Os produtos intermediários, como o Malondealdeído (MDA) e o Hidroxinonenal (HNE), quando da formação cíclica de EROs, são agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as HSCs, favorecendo a formação de fibrogênese ^(47,67, 75,76).

Assim, a progressão da esteatose para EHNA e fibrose poderia ocorrer por três mecanismos principais (**Figura 8**): peroxidação lipídica, indução de citocinas pró-inflamatórias e por indução de ligantes FAS (e apoptose). A peroxidação de lipídeos deflagrada pelas EROs causa necrose celular ou induz apoptose, que podem gerar citoqueratinas de ligação cruzada para formar corpúsculos hialanos de Mallory ou ativar HSCs, promovendo síntese de colágeno e estímulo de quimiotaxia de neutrófilos ^(75,77).

Figura 8. Influência de radicais livres, peroxidação lipídica e citocinas no desenvolvimento da EHNA.



Fonte:75

2.2.6 Modelo animal de EHNA – Modelo nutricional deficiente em metionina e colina.

Estudos em animais têm ajudado no conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos e terapêuticos de DHGNA e EHNA. Existem vários modelos animais para estudar estas doenças, embora nenhum deles consiga reproduzir na totalidade, os componentes essenciais presentes na doença humana ⁽⁷⁸⁻⁸⁸⁾. Portanto é importante selecionar o modelo que melhor obedece ao objetivo do estudo ⁽⁸⁸⁾.

As principais abordagens para a EHNA, por meio de modelos animais, podem ser divididas em três grupos: modelos nutricionais, modelos genéticos e modelos farmacológicos ⁽⁸¹⁾.

A utilização de modelos nutricionais para induzir EHNA tem grande relevância para a doença humana, uma vez que apenas a minoria de pacientes com EHNA apresentam defeitos genéticos ⁽⁸⁰⁾.

Um grande número de modelos nutricionais está disponível. Diferentes abordagens nutricionais têm sido desenvolvidas para induzir o acúmulo de gordura hepática em roedores: dieta deficiente em colina e metionina (MCD), dietas aterogênicas, superalimentação de gordura insaturada e dietas enriquecidas com frutose. Abordagens nutricionais para induzir esta doença também têm sido utilizadas em diferentes animais como peixes, coelhos, porcos, galinhas e macacos⁽⁸¹⁾.

Historicamente, a dieta MCD foi descrita em 1973 por Rogers e Newberne⁽⁸⁹⁾, ao observarem que poderia ocorrer o desenvolvimento de cirrose em um modelo animal, apenas com manipulação da dieta e sem o uso de álcool. Os autores demonstraram que a utilização de dieta deficiente dos aminoácidos colina e metionina, mas rica em lipídios, induz importante esteatose e doença hepática semelhante à observada com o uso de álcool. Quanto mais deficiente em aminoácidos, maior a velocidade de instalação e gravidade da doença hepática. Nesse estudo, os autores descreveram e testaram três composições com graus progressivos de deficiência nutricional, mas não relataram a percentagem de esteatose e EHNA obtida com cada dieta⁽⁹⁰⁾.

O modelo MCD é clássico para a indução de EHNA. Contém elevado teor de sacarose e gordura (40% de sacarose e 10% de gordura), mas não tem metionina e colina, que são fatores essenciais para β -oxidação hepática e para a produção de VLDL, importante para a exportação hepática de ácidos graxos⁽⁸²⁾.

A colina é um nutriente com funções na integridade da membrana celular, sinalização transmembrana, neurotransmissão, metabolismo do grupo metil e síntese da fosfatidilcolina, essencial na composição de membranas celulares e de VLDL, que são importantes para o transporte de triglicerídeos para o fígado^(82,91,92). A colina é sintetizada na presença de Fosfatidil-serina e metionina, sendo necessários também a vitamina B12 e o ácido fólico⁽⁹³⁾, e pode ser oxidada à betaína, que atua na regulação do equilíbrio osmótico. A colina é a única fonte de doação de grupos metil prontamente ativa, permitindo a síntese de metionina, carnitina, fosfatidilcolina e creatina, compostos chave para o metabolismo proteico e energético⁽⁹⁴⁾.

O acúmulo de gordura no fígado, resultante da deficiência de colina, ocorre porque a colina é necessária para fazer a porção fosfatidilcolina nas partículas de VLDL^(95,96). Na ausência de colina, o VLDL não é secretado e o triacilglicerol (triglicerídeo) acumula no citosol hepático.

A metionina é um aminoácido essencial, que provém da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, sendo metabolizada principalmente no fígado. A metionina é catabolizada em dois intermediários, S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH), respectivamente, que por sua vez é hidrolizado à homocisteína e Adenosina ^(97,98). O metabolismo da homocisteína pode ocorrer por meio de duas vias: transulfuração ou remetilação ⁽⁹⁹⁾.

A via de transulfuração é ativada quando há metionina em excesso no organismo ⁽¹⁰⁰⁾ como, por exemplo, após uma dieta hiperproteica ⁽¹⁰¹⁾. Nesta via, a homocisteína, em uma reação catalisada pela enzima cistationina b-sintase, é convertida em cistationina. Essa é hidrolisada à cisteína pela cistationina g-liase. A cisteína pode participar da formação da glutathione reduzida (GSH) ^(97,98), ser metabolizada novamente a sulfato ou eliminada na urina ⁽¹⁰²⁾.

A remetilação ocorre quando há um balanço negativo de metionina no organismo ⁽⁹⁹⁾ como em uma dieta proteica ou em jejum ⁽¹⁰¹⁾. Nesta via, a homocisteína recebe um radical metil, transformando-se novamente em metionina. A enzima metilenotetrahidrofolato redutase, dependente do ácido fólico, catalisa a reação que converte o 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato. Este doa um radical metil à He, em uma reação catalisada pela enzima metionina sintetase, dependente da vitamina B12, formando a metionina. Sabe-se que sob condições nas quais há excesso de metionina, além da transulfuração, existe outra via alternativa capaz de degradar esse aminoácido, a transaminação, na qual são formados metabólitos como o metanotiol e o sulfeto de hidrogênio ^(98,103,104).

Os mecanismos de indução da EHNA por dieta MCD incluem:

- A interrupção da fosfatidilcolina, causada pela deficiência de colina e metionina ^(82,84);

- Aumento da inflamação do fígado pelo aumento na produção de moléculas pró-inflamatórias, pró-fibróticas, como a interleucina 6 (IL-6), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), TNF- α e moléculas de adesão, tais como molécula de adesão (ICAM) -1, molécula de adesão da célula vascular (VCAM) -1 e da proteína quimiotática de macrófagos (MCP) 1 ^(53, 105-107);

- Aumento do potencial de estresse oxidativo. A dieta MCD induz ERO e diminui a produção de antioxidantes (por exemplo, GSH) e SAM ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾;

- A ativação NF-κB é, em parte, responsável por muitas das mudanças pró-inflamatórias e é um elo importante entre o estresse oxidativo, inflamação crônica e fibrogênese hepática ^(53,85);

- Estudos recentes têm demonstrado que este modelo provoca uma diminuição significativa nos níveis e na expressão de transportadores de captação hepática (OAT2 e OAT3), resultando em significativa alteração farmacocinética de xenobióticos ⁽¹¹⁰⁾.

Embora esse modelo cause inflamação, estresse oxidativo, dano mitocondrial, apoptose e fibrogênese mais do que em outros modelos nutricionais utilizados ⁽⁹³⁾, a gravidade da doença, em roedores alimentados com a dieta MCD, pode depender da espécie, sexo e linhagem do animal ⁽⁷⁹⁾.

A maior desvantagem da dieta MCD é que o perfil metabólico é oposto ao observado em pacientes com EHNA. Os animais não desenvolvem resistência insulínica, além de apresentarem reduzidas concentrações de glicemia, insulina e leptina e apresentarem caquexia ^(85,86,110-112).

Esse modelo continua, porém, sendo o mais utilizado, pela sua facilidade de utilização e a disponibilidade de uma dieta-padrão comercial para laboratórios de pesquisa do mundo todo ⁽⁸⁸⁾.

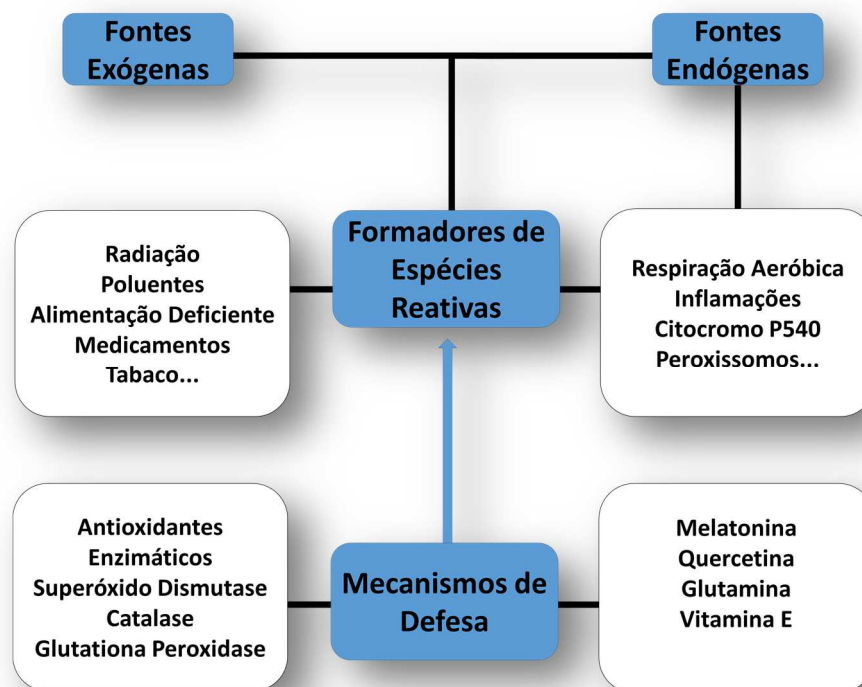
2.3 Estresse Oxidativo

O termo estresse oxidativo refere-se a uma situação, na qual existe aumento sustentado na concentração, em estado estacionário das ERO acima de seus níveis fisiológicos. Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há diminuição dos níveis das defesas antioxidantes, elevada velocidade de produção de ERO, ou a combinação de ambas as condições ⁽¹¹³⁾.

Um importante aspecto do estresse oxidativo indica que a perda da sinalização óxido-redução é, às vezes, mais importante que o desequilíbrio pró-

oxidante/antioxidante ou do dano tecidual induzido pelo desequilíbrio ⁽¹¹⁴⁾. As consequências do estresse oxidativo podem ser muito sutis ou muito agressivas, incluindo dano oxidativo às biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular e isso depende do balanço entre a geração das espécies reativas formadas e das defesas antioxidantes presentes nas células ⁽¹¹⁵⁾. Algumas fontes endógenas e exógenas de espécies reativas e mecanismos de defesa estão resumidas na **Figura 9**.

Figura 9. Principais fontes que levam a formação de espécies reativas e defesas antioxidantes.



Espécies reativas podem ser ou não um radical livre, que é qualquer espécie química (átomo, molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo. ERO é um termo coletivo que inclui os radicais do oxigênio e não radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾. A **Tabela 1** mostra espécies reativas importantes no sistema biológico.

Tabela 1. Importantes espécies reativas no sistema biológico.

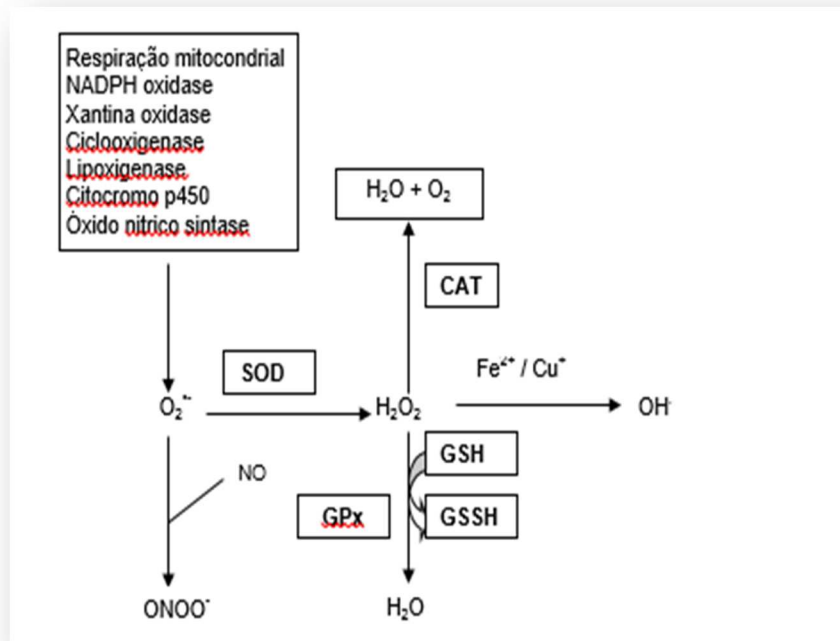
Radicais Livres	Não-radicais
Espécies Reativas de Oxigênio	
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$ Hidroxil, OH^{\cdot} Peroxil, RO_2^{\cdot} Alcoxil, RO^{\cdot} Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Oxigênio singlet, 1O_2 Peróxidos orgânicos, $ROOH$
Espécies Reativas de Cloro	
Cloro atômico, Cl^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$ Gás cloro, Cl_2 Nitro-cloro-benzeno, NO_2Cl
Espécies Reativas de Nitrogênio	
Óxido nítrico, ON Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2 Cátion nitrosila, NO^+ Ânion nitrosila, NO^- Tetraóxido dinitrogênio, N_2O_4 Trióxido dinitrogênio, N_2O_3 Peroxinitrito, $ONOO^-$ Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$ Alquil Peroxinitrito, $ROONO$

Fonte:119

As ERO participam de funções fisiológicas e são parte integrante na defesa contra micro-organismos invasores. São produzidas durante o metabolismo celular aeróbico normal e têm papel importante na manutenção do estado celular redox ^(120, 121).

As espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos a eliminarem micro-organismos e a regularem eventos sinalizadores pela via redox e, assim, influenciam na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição ⁽¹¹⁸⁾. Algumas reações pró-oxidantes-antioxidantes foram resumidas na **Figura 10**.

Figura 10. Produção e degradação de radicais de oxigênio.



$O_2^{\bullet -}$: ânion superóxido; $ONOO^{\bullet}$: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; OH \cdot : radical hidroxila; H_2O : água; O_2 : oxigênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSH: glutatona oxidada; Fe^{2+} : íon ferroso; Cu^+ : cobre; OH \cdot : hidroxila

Fonte:122

Quando um radical livre reage com um composto não radical, outro radical livre pode ser formado, induzindo, assim, as reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro radical livre formado. São efeitos gerais da peroxidação lipídica: diminuição da fluidez da membrana, dano das proteínas de membrana, desarranjos e inativação de receptores, de enzimas, de canais de íons e potenciação da lise celular ⁽¹¹⁹⁾.

O processo de LPO termina quando dois radicais peróxil reagem entre si, formam um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet (1O_2) e a carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental, emitindo quantas de luz visível ⁽¹²³⁾. Outros lipídios hidroperóxidos também se decompõem numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como MDA, HNE, hidrocarbonetos voláteis (como o gás etano e pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente ^(124,125).

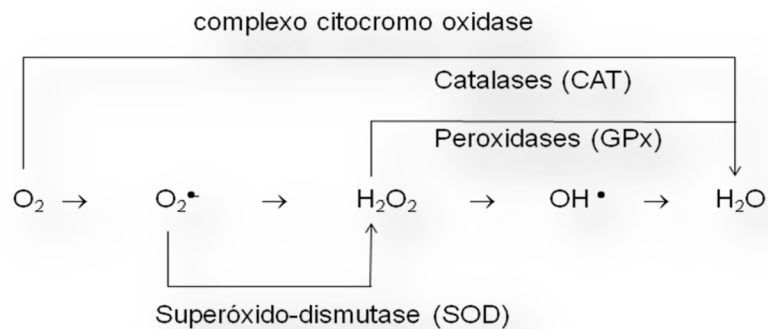
O desequilíbrio no estado redox tem efeitos potencialmente deletérios sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na

proteção das células e organismos para um eventual dano causado por quantidades excessivas desses mediadores altamente reativos ^(126,127).

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos ⁽¹²⁴⁾.

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas (**Figura 11**) estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, a catalase (CAT), responsável pela dismutação do H_2O_2 e glutathiona peroxidase (GPx). A GPx degrada, além do H_2O_2 , outros peróxidos ^(128, 129).

Figura 11. Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO.



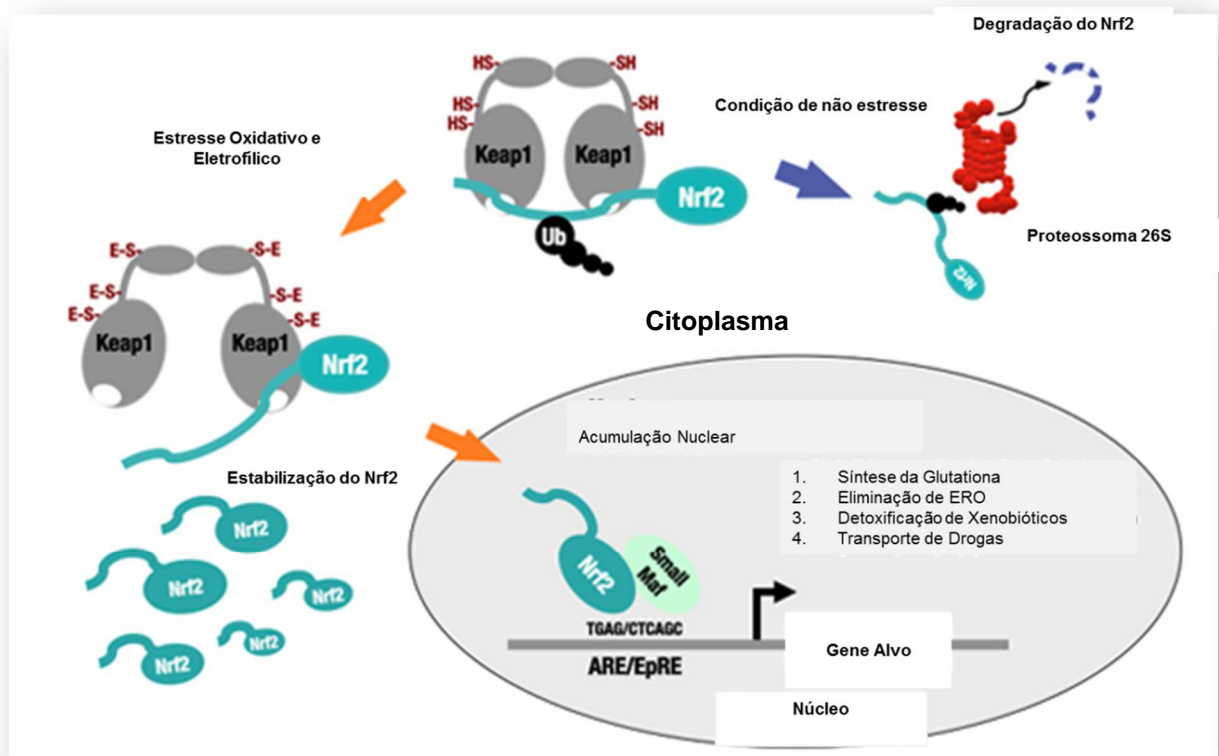
Fonte: 116

Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, os carotenoides, os flavonoides e a glutathiona. A glutathiona é considerada o antioxidante não enzimático hidrossolúvel mais importante por participar de inúmeras reações de óxido-redução ^(121,127).

A resposta antioxidante celular contra os radicais livres e/ou EROs é regulada pelo fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) que é um fator de transcrição localizado no citoplasma e regula a expressão da maioria das enzimas que participam do sistema antioxidante, é mantido inativo pela proteína Keap1 (*ECH Kelch* associando proteína 1), constantemente degradado pela via ubiquitina–proteasoma dependente de Keap1 ^(130,131), sob condições normais.

Quando a célula sofre estímulos eletrofílicos, inflamatórios e oxidativos, o Keap1 sofre oxidação dos grupos SH de resíduos de cisteína, alterando sua estrutura que causa a dissociação de Nrf2, que é estabilizado e translocado para o núcleo ligando-se em pequenas proteínas Maf (fatores de transcrição) que ativam o Elemento de Resposta Antioxidante (ERA), e ativa genes alvos que apresentam ERA no seu promotor, iniciando a transcrição de novas enzimas. A via Keap1/Nrf2 é responsável por regular tanto genes citoprotetores como defesas antioxidantes, entre eles, os genes da SOD, CAT, e das enzimas do metabolismo da GPx, glutathiona redutase (GR), e γ -glutamil cisteína ligase, da detoxificação de xenobiótico, NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), genes da família da Glutathiona S-transferase e do transporte de drogas (genes da família das proteínas associadas à resistência de multidrogas) (Figura 12) ⁽¹³¹⁻¹³⁶⁾.

Figura 12. Indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes através da via de sinalização Keap1/Nrf2.



Fonte: 137 Modificado 131; 138

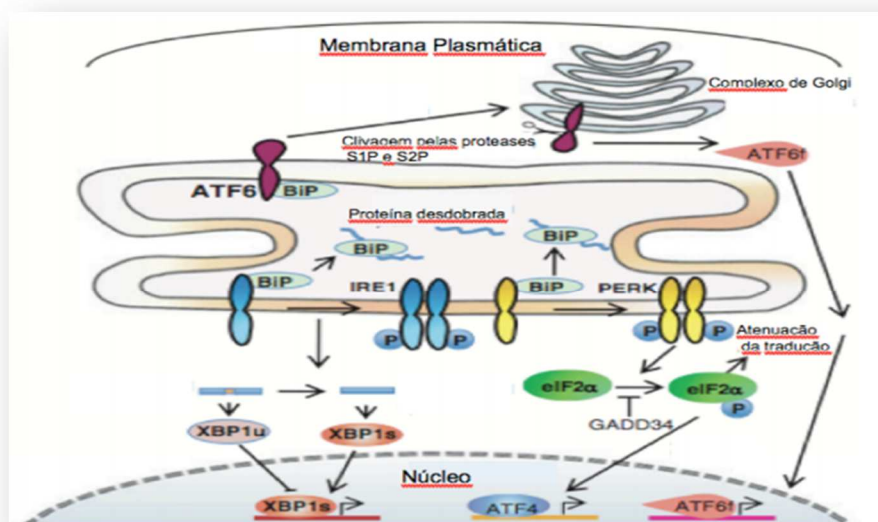
2.4 Estresse do Retículo Endoplasmático

O RE é a organela celular responsável pela síntese, dobramento e modificação de peptídeos e proteínas, ou seja, é essencial para função e sobrevivência celular. Perturbações no metabolismo celular podem prejudicar a síntese proteica, causando o acúmulo de proteínas mal dobradas, o que caracteriza o estresse do RE e induz ativação da via de sinalização intracelular denominada UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*)^(139,140).

A UPR é mediada a partir da ativação de três proteínas transmembranas do RE, conhecidas como *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1), *PKR-like ER-regulated kinase* (PERK) e a *activating transcription factor 6* (ATF6) e pela chaperona *glucose-regulated protein 78 kDa* (GRP78)⁽¹⁴¹⁾.

Em condições normais, a GRP78, também conhecida como BiP, se liga ao domínio amino-terminal de IRE-1 e PERK e ao domínio carboxi-terminal da ATF6, mantendo-as inativas⁽¹⁴²⁾. E durante a ativação da via da UPR a BiP se dissocia das proteínas do RE, pois possui maior afinidade por proteínas não dobradas localizadas no lúmen do RE⁽¹⁴³⁾, permitindo que a IRE1 e PERK fiquem livres para serem ativadas. A dissociação da BiP com o ATF6 libera este para o complexo de Golgi⁽¹⁴⁴⁾ (**Figura 13**).

Figura 13. Via de sinalização em resposta às proteínas desdobradas no Retículo Endoplasmático.



Fonte: 145,146

A ativação destas três vias deve reverter o efeito do estresse do RE e restaurar a homeostase celular. Porém, a adaptação ao agente estressor pode levar ao comprometimento da funcionalidade da célula ativando caminhos que desencadeiam a morte por apoptose ⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾.

O acúmulo lipídico hepático é capaz de induzir o estresse RE, e, por sua vez, a resposta ao estresse RE promove a lipogênese hepática, criando um ciclo de feedback positivo, o que pode contribuir para o desenvolvimento de esteatose hepática ⁽¹⁵⁰⁾. Este estresse tem sido implicado não só no desenvolvimento de esteatose hepática, mas também no desenvolvimento de lesão hepatocelular e fibrose, que anunciam a progressão da esteatose simples a EHNA. Uma das linhas comumente citadas das provas que sustentam o papel do estresse do RE na patogênese de EHNA é a observação de que camundongos alimentados com dieta MCD respondem a ativação de estresse do RE hepático ⁽¹⁵¹⁾.

2.5 Proteínas do Choque Térmico

Há cinco décadas atrás Ferruccio Ritossa expôs células de glândulas salivares de *Drosophila* a um choque térmico e estas demonstraram novo padrão de espessamento cromossomal, cujos genes foram determinados, posteriormente, como sendo das HSPs ou simplesmente proteínas de estresse ⁽¹⁵²⁾.

Alterações funcionais e estruturais são reações biológicas observadas após evento estressante. A resposta do organismo irá depender tanto da intensidade como da duração do estímulo estressor, ou seja, muitas vezes essa resposta é insuficiente para combater os danos sofridos, precisando de mecanismos de proteção ativados durante o estresse.

Embora as HSPs tenham recebido essa denominação por serem sintetizadas em condições de temperaturas acima de valor limiar ⁽¹⁵³⁾, são proteínas expressas tanto em células eucariontes como procariontes em condições normais, e sua síntese é intensamente aumentada quando são expostas a vários estímulos nocivos ⁽¹⁵⁴⁾, incluindo exercícios físicos ⁽¹⁵⁵⁾, formação de ERO, infecções virais ou bacterianas, acumulação de metais pesados ou etanol, isquemia, ⁽¹⁵⁶⁾, inibidores da ciclo-oxigenase ⁽¹⁵⁷⁾, entre outros igualmente eficazes.

As HSPs estão localizadas na mitocôndria, no citoplasma, na superfície celular ou soro, porém, são predominantemente proteínas intracelulares ⁽¹⁵⁸⁾ e são conhecidas como chaperonas por possuírem importante função em adaptação ao estresse e proteção celular, atuando principalmente na síntese e degradação proteica, além de regular processos celulares fundamentais, tais como formação, segregação, degradação e conformação de proteínas, e ressolubilização de agregados proteicos ^(154, 159-163).

A classificação das HSPs depende do peso molecular (**Tabela 2**) e apresentam localização e função específica nas células. As grandes famílias são as HSP40,60,70 e 90. As pequenas HSPs são o grupo de proteínas com o peso molecular entre 10 e 30 kDa. As famílias mais referenciadas são as HSP27, HSP60, HSP70 e HSP90 kDa ⁽¹⁵⁷⁾.

Tabela 2. Classificação das proteínas de choque térmico, divididas em famílias de acordo com o peso molecular.

NOME	FORMA DE INDUÇÃO	PRINCIPAIS FUNÇÕES
HSP 110	Choque térmico; Isquemia;	Confere resistência celular ao calor e apresenta função chaperona, reduzindo a agregação protéica. Age como um eficiente fator de troca de nucleotídeo (NEF) para atividade citosólica das Hsp70s.
GRP94	Ionóforo de cálcio; Estrogênio; IFN α - γ ; IL-6; Privação de oxigênio; Hipóxia; Anóxia; UV	Abundante em células secretórias, está presente no lúmen do ER. Previne agregação protéica. 50% homólogo da HSP90
HSP90	Choque térmico; Frio; Fatores de crescimento; Hipoxia; Glicocorticóides; Estradiol; Prostaglandina A1; Insulina; IL-4; IL-6; Privação de glutatona; Hipóxia; Infecção; Álcool;	Ambas isoformas da Hsp90 (HSP90 α e HSP90 β) são requeridas para a diferenciação e maturação celular, encontrada em grande quantidade no citoplasma, apresenta atividade chaperona. Intermediária no remodelamento protéico após estresse, auxilia na estabilidade da estrutura celular. Interage com diversas co-chaperonas que modulam o reconhecimento de substratos, ciclo ATPase e função chaperona desta proteína.
GRP78	Privação de glicose; Frio; Congelamento; Ionóforo de cálcio; UV;	Previne agregação protéica no ER e liga-se a proteínas desnaturadas retardando sua liberação até completo dobramento.
GRP75	Privação de glicose; Ionóforo de cálcio; UV;	Previne agregação protéica, apresenta papel importante na proliferação celular, resposta ao estresse, facilitando o correto dobramento de proteínas presentes na mitocôndria
HSP72	Choque térmico; Frio; Seca; Metais pesados; Hipóxia; Anóxia; Isquemia; Infecção; Inflamação; UV; Álcool; Exposição a toxinas; Anestésicos; Prostaglandina; Insulina;	Rapidamente induzida durante estresse, essa proteína apresenta função citoprotetora e antiinflamatória, reconhecendo e ligando-se a proteínas sintetizadas, dobradas ou localizadas de forma inapropriada, mantendo a integridade dos componentes celulares.
HSP70B'	Choque térmico;	Isoforma da HSP72. Juntas, são as principais HSPs induzidas após choque térmico. Seu gene interage de forma seletiva e não covalente com o ATP e nucleotídeos.
HSP73	Choque térmico; Seca; Hipóxia; Isquemia;	Constitutivamente expressa, essa proteína é encontrada no citoplasma em situações basais, capazes de se ligar a polipeptídeos para facilitar seu dobramento correto.
HSP60	Choque térmico; Frio; Luz; Ozônio; Anoxia; Infecção;	Previne o desdobramento e agregação de polipeptídeos gerados na matriz mitocondrial. Estimulada pela ligação da HSP10
HSP40	Choque térmico;	Co-chaperona requerida na catálise de reações, funcionando como fator de troca de nucleotídeo na atividade ATPase da HSP70.
HSP27	Choque térmico; Estresse oxidativo; Isquemia; Frio; Estrogênio; Infecção; Anoxia; Glicocorticóides;	Chaperona molecular, previne a agregação de proteínas mal sintetizadas ou dobradas de forma irregular, interagindo com mecanismos reguladores da morte celular. Associada a filamentos, mantém a estrutura das células.
HSP10	Choque térmico;	Facilita o dobramento de proteínas de forma ATP-dependente. Associada a HSP60 pode induzir proteção as funções, mitocondriais. Previne apoptose e morte celular.

Fonte:164

Existem moléculas que são expressas em condições normais e apenas aumentam ligeiramente a sua expressão em casos de estresse. Assim, alguns autores atribuem a designação de HSP, pela sua expressão constitutiva. De acordo com esses autores, o termo HSPs seria reservado a proteínas induzíveis ⁽¹⁵⁶⁾.

Sua expressão depende de estímulos, seja por estresse químico, ambiental, seja fisiológico, induzindo seu fator de transcrição, o HSF (do inglês *Heat-shock factors* – Fatores de choque térmico). Tais fatores adquirem a capacidade de ligação ao DNA e são chamados de HSE (do inglês *Heat shock element* – Elemento do choque térmico), mediando a transcrição de genes de choque térmico que resulta em acumulação de HSPs ⁽¹⁶⁵⁾.

2.6 Estatinas

Até o momento, não existe terapia comprovada e conclusiva para o tratamento da EHNA, demonstrando a importância de estudos com potenciais agentes nessa área. Vários medicamentos com diferentes propriedades e diferentes mecanismos de ação estão propostos para o tratamento da EHNA, e as principais linhas de estudos envolvem medicamentos que melhoram a resistência insulínica e diminuem o estresse oxidativo.

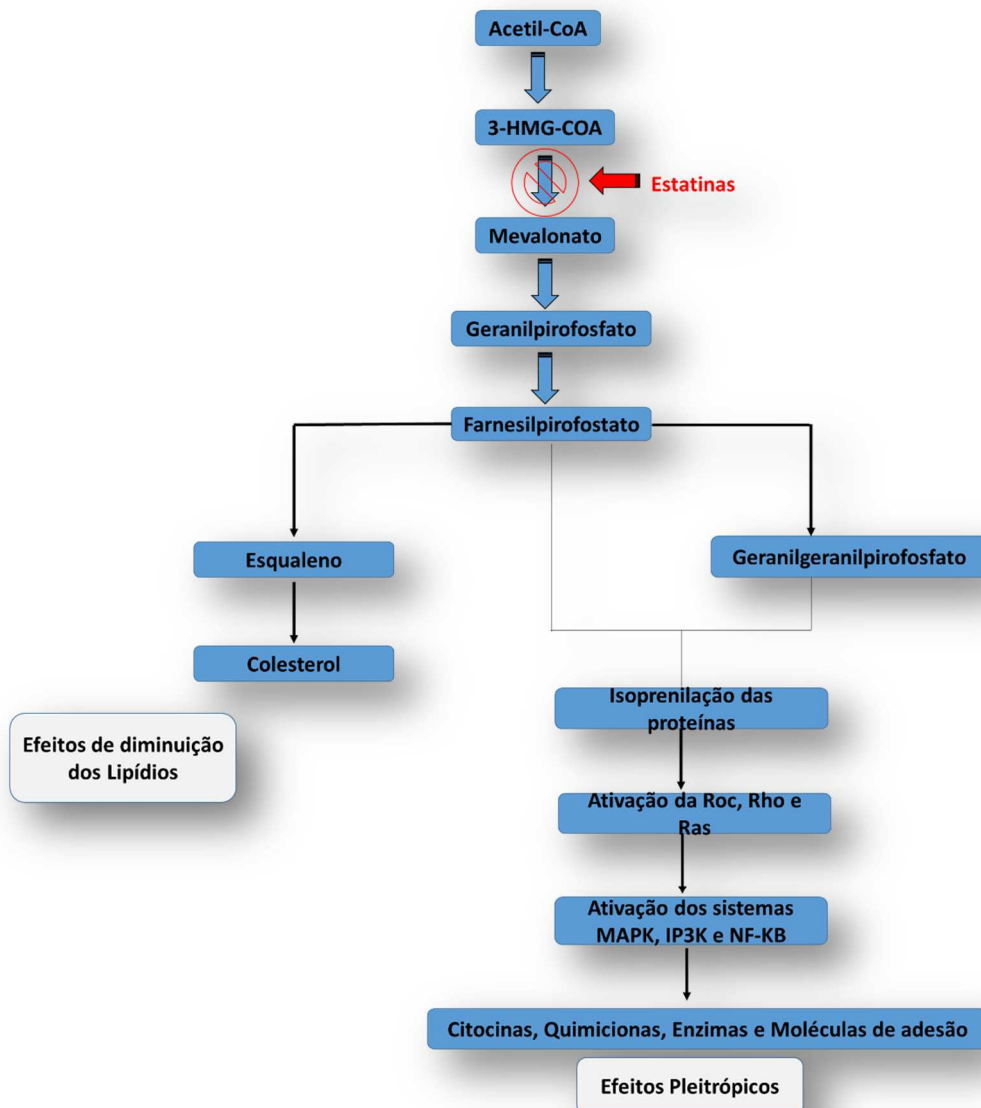
As estatinas são os fármacos de primeira escolha na redução dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), podendo reduzir também os níveis de triglicerídeos e induzir aumento nos níveis de HDL ^(166,167).

As estatinas são inibidores estruturais da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA), em uma fase inicial da via do mevalonato. Com a inibição da HMG-CoA, a biossíntese hepática de colesterol é reduzida, resultando em *up regulation* dos receptores da LDL que levam à diminuição dos níveis de LDL ^(168, 169).

As estatinas, intracelularmente, inibem competitivamente a HMG-CoA redutase, impedindo a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, diminuindo, desse modo, a síntese de colesterol. A inibição da HMG-CoA redutase interfere também na redução da produção de intermediários isoprenoides incluindo Farnesilpirofosfato e Geranilgeralpirofosfato (**Figura 14**), ao impedir a conversão da HMG-CoA a ácido L-mevalônico ⁽¹⁷⁰⁾.

Tais moléculas servem como acessórios lipídicos para a modificação pós-translacional de pequenas proteínas de ligação, as quais estão envolvidas dentro da ativação por isoprenilação de pequenas proteínas de ligação guanina trifosfato (GTPase), como Roc, Rho, e Ras. Além da redução dos níveis do colesterol, a inibição das proteínas intracelulares dependentes dos isoprenóides promove efeitos biológicos, conhecidos como efeitos pleiotrópicos ⁽¹⁷¹⁾.

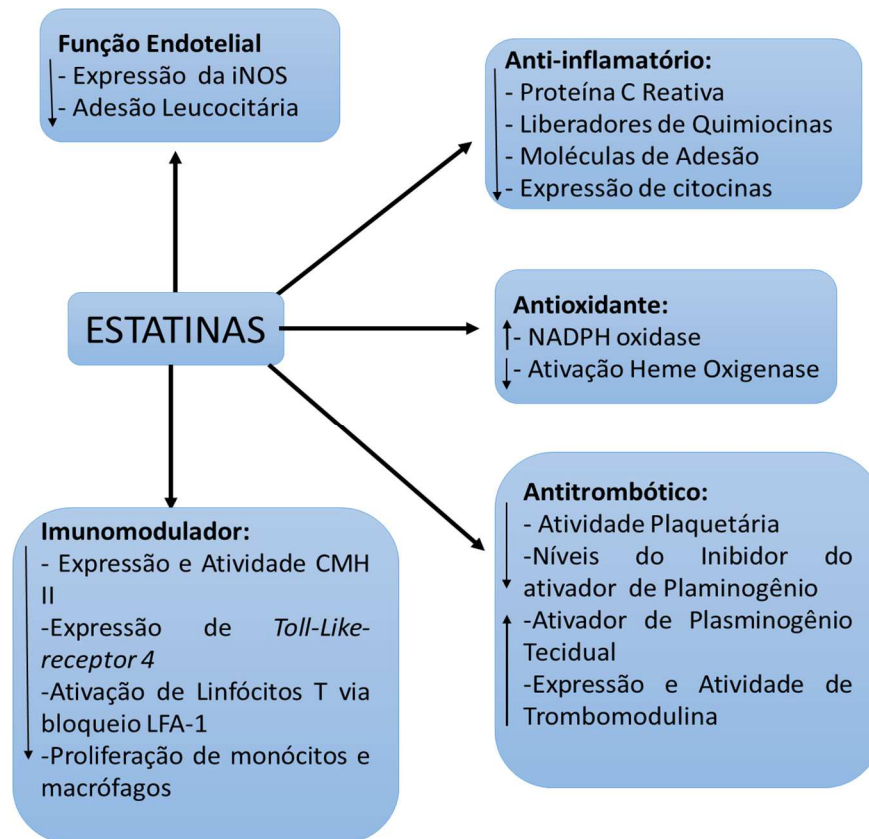
Figura 14. Efeitos das estatinas na biossíntese do colesterol.



Fonte: 171

Os chamados efeitos pleiotrópicos (**Figura 15**) caracterizam-se por atividades secundárias das estatinas, como propriedades anti-inflamatórias, ações imunomoduladoras, antitrombogênicas, proteção da função endotelial, propriedades antioxidantes entre outras ⁽¹⁷¹⁻¹⁷⁴⁾.

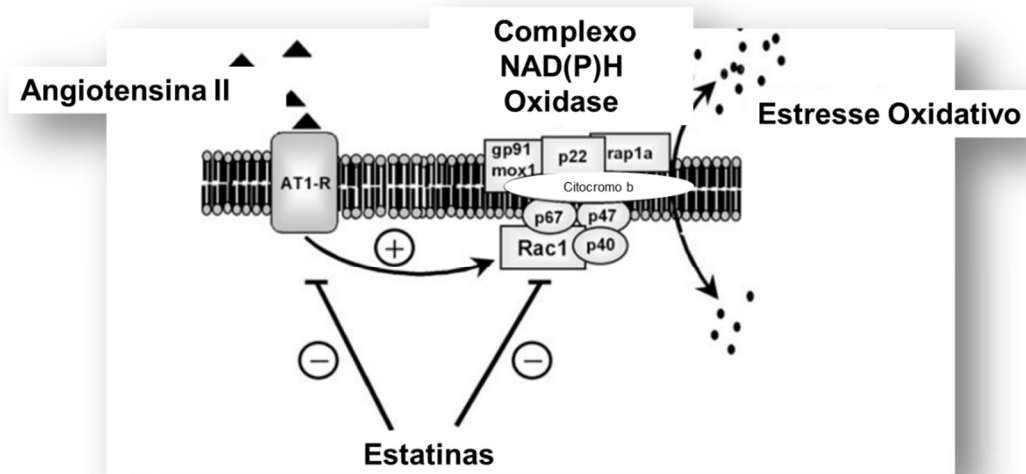
Figura 15. Efeitos pleiotrópicos das estatinas.



Fonte: 171

Entre os efeitos antioxidantes (**Figura 16**) das estatinas, incluem-se a modulação do estresse oxidativo, a diminuição da geração de ERO pela NAD(P)H oxidase vascular, antagonistas dos efeitos pró-oxidantes da angiotensina II e endotelina-1 e o aumento da síntese óxido nítrico vascular ⁽¹⁷²⁾.

Figura 16. Mecanismo antioxidante das estatinas.



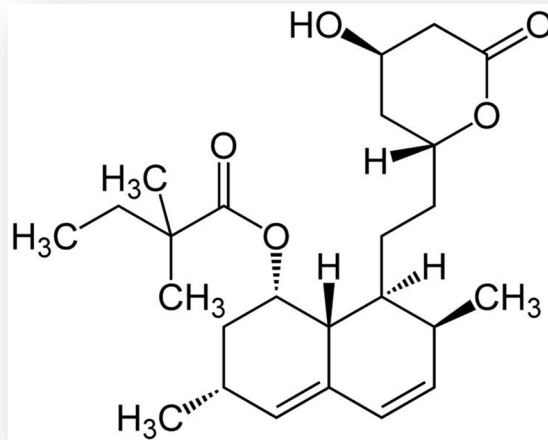
Fonte: 173

O primeiro inibidor de HMG-CoA reductase, a compactina (mevastatina), foi descoberto em 1976 por Akita Endo e originalmente isolado como produto metabólico de culturas do fungo *Penicillium citrinum*. Essa substância, devido à sua alta toxicidade, não foi empregada para uso clínico ⁽¹⁷⁵⁾.

Mais tarde, a lovastatina, análogo estruturalmente correlato à mevastatina, foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* por Alberts e colaboradores ⁽¹⁷⁶⁾. A lovastatina, então, tornou-se a primeira desta classe de agentes redutores do colesterol a ser aprovada para uso clínico em humanos. Desde então, novas estatinas, naturais e modificadas, tornaram-se comercialmente disponíveis, incluindo pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, e mais recentemente, pitavastatina e rosuvastatina. Essas moléculas diferem entre si na absorção, biodisponibilidade, ligação às proteínas plasmáticas, excreção e solubilidade ^(173,177).

A sinvastatina (**Figura 17**), droga escolhida para o nosso estudo, é uma modificação química da lovastatina.

Figura 17. Representação química da sinvastatina.



Fonte: 173

2.6.1 Estatina na EHNA

As estatinas são uma importante classe de agentes para tratar dislipidemia, mas ainda há relutância de usar esse medicamento em pacientes com doenças crônicas estabelecidas ou suspeita de doença hepática, DHGNA e EHNA inclusive (4,178-181).

Aminotransferases elevadas não são incomuns em pacientes que receberam estatinas, mas lesão hepática grave, causada pelo uso de estatinas, raramente é visto na prática clínica (4).

Ao longo da última década, um ensaio clínico randomizado (4) demonstraram que as estatinas são seguras em pacientes com doença hepática. Destacaram também que não há nenhuma evidência com a qual se comprove que pacientes com doença hepática crônica, incluindo a EHNA, estão em maior risco de apresentarem lesão hepática do que aqueles que não fazem o uso. Vários estudos têm sugerido que as estatinas podem melhorar as aminotransferases, diminuir a incidência de eventos cardiovasculares (que são a principal causa de morte neste grupo de pacientes) e melhorar os achados histológicos presentes na doença (178-181).

Embora haja estudos que mostrem a utilidade das estatinas em pacientes com EHNA, mesmo na ausência de dislipidemia, são necessários mais estudos prospectivos para sustentar esses dados ⁽¹⁶⁹⁾.

3 MARCO TEÓRICO

As evidências, nos últimos anos, indicam que a peroxidação lipídica é uma pedra angular da lesão celular relacionada à EHNA uma vez que a peroxidação dos lipídios exerce um papel central na fisiopatogenia da doença de forma independente da etiologia da esteatose.

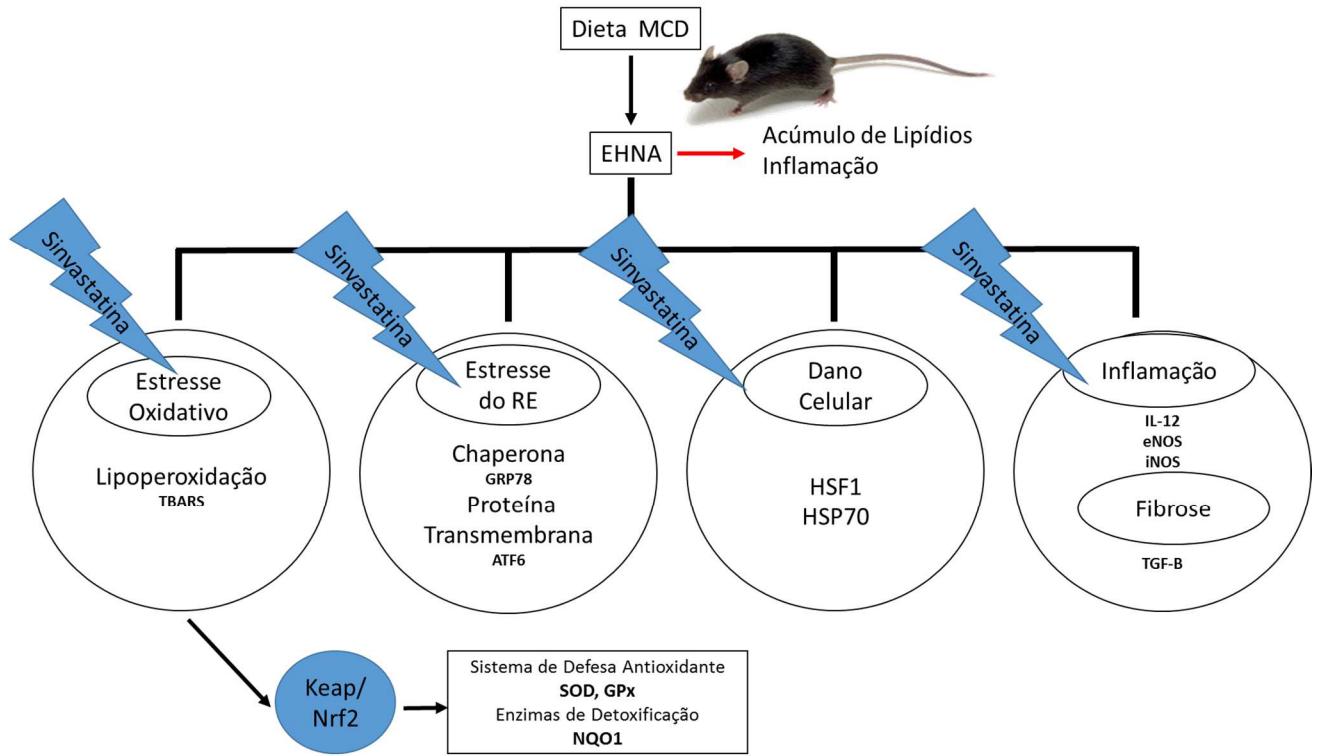
Além disso, os produtos da lipoperoxidação podem ligar-se às proteínas dos hepatócitos, fazendo com que ocorra estresse do RE, aumento do processo inflamatório e de indução da fibrose.

Embora existam evidências sobre o aumento e o envolvimento do estresse oxidativo, outros tipos de estresse e danos também estão envolvidos na EHNA. Nesta tese, abordaremos 2 questões (**Figura 18**) que contemplam a essência deste estudo

- a primeira questão refere-se ao estresse oxidativo e ao estresse do RE presentes no modelo experimental de EHNA induzida por dieta MCD. Acredita-se que estão envolvidos com o agravamento da doença e que a sinvastatina é capaz de reduzi-los, e assim atenuar a doença.

- a segunda questão refere-se à presença de inflamação e fibrose que determina o dano celular no modelo experimental de EHNA induzida por dieta MCD. A sinvastatina pode diminuir o processo inflamatório, reduzir a fibrose e dano celular.

Figura 18. Marco conceitual esquemático.



4 JUSTIFICATIVA

A EHNA, que corresponde a uma percentagem de largo espectro da DHGNA, associa-se a aumento da mortalidade de todas as causas e de causa hepática. O reconhecimento do seu potencial evolutivo e a sua alta prevalência na população mundial são os principais motivos que despertam o interesse da comunidade científica para realizar estudos relacionados a essa doença.

Não existe tratamento específico para EHNA e não há evidências comprobatórias de que pacientes com EHNA tenham maior risco de lesão hepática grave induzida por estatinas.

Muitas evidências sustentam o estresse oxidativo como fator essencial no segundo passo deste processo. As ERO, ou espécies reativas de nitrogênio provenientes das mitocôndrias, do RE e peroxissomas desempenham papel importante na patogênese da EHNA.

Tendo em vista tais considerações, propusemo-nos, por meio deste trabalho, avaliar o uso da sinvastatina em um modelo experimental de EHNA.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da sinvastatina sobre o tecido hepático em camundongos C57BL6 com EHNA, induzida por dieta MCD, na tentativa de elucidar a ação desse fármaco sobre as complicações desse modelo experimental.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 *Objetivos Específicos do artigo I*

Respondido no Artigo - ***Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis*** – Enviado para revista *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

- Avaliar as alterações de integridade hepática dos camundongos com EHNA e dos submetidos à administração de sinvastatina através da análise das enzimas ALT, aspartato aminotransferase (AST), bem como as alterações bioquímicas sistêmicas de colesterol e triglicerídeos.
- Determinar os níveis de lipídios hepáticos através do colesterol e triglicerídeos hepático nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Verificar as características histológicas da EHNA nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Avaliar o dano ao DNA no modelo de EHNA induzida por dieta MCD e a ação da SIM como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o ensaio cometa em tecido hepático.
- Avaliar a LPO no tecido hepático através do TBARS nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.

- Determinar no tecido hepático a atividade enzimática da SOD e GPx nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Quantificar a expressão das proteínas NQO1, KEAP1, Nrf2, GRP78 e ATF6 nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.

5.2.2 Objetivos Específicos do artigo II

Respondido no Artigo - ***Simvastatin treatment attenuates non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline deficient diet in mice*** – Enviado para revista *Protoplasma*.

- Avaliar as alterações de integridade hepática dos camundongos com EHNA e dos submetidos à administração de SIM através da análise das enzimas ALT e AST.
- Avaliar a LPO no tecido hepático através do TBARS nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Verificar a expressão do TGF- β nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Avaliar a expressão proteica de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Verificar a expressão da interleucina 12 (IL-12) nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.
- Quantificar expressão das proteínas HSF1 e HSP70 nos camundongos submetidos a dieta MCD e tratados com SIM.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002; 123(5):1702-4.
2. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010; 55(3): 560-78.
3. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*. 2009; 49(1):306-17.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-23.
5. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 52(1): 79-104.
6. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 28(5): 503-22.
7. Musso G, Molinaro F, Paschetta, Gambino R, Cassader M. Lipid modifiers and NASH: statins, ezetimibe, fibrates, and other agents. In: Farrell GC, McCullough AJ, Day CP editors. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Practical Guide*: Wiley-Blackwell; 2013. p. 293-307.
8. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980; 55:434-8.
9. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology*. 2003; 38(4):1008-17.
10. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis*. 2007; 11(1):1-16.
11. Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;123(5): 1705-25.
12. Law K, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2010; 14(4): 591-604.
13. Schaffner F, Thaler H. Non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis*. 1986; 8: 283–286.

14. Browning DJ, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004; 114(2): 147-52.
15. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(3): 560-78.
16. Iser D, Ryan M. Fatty liver disease--a practical guide for GPs. *Aust Fam Physician.* 2013; 42(7): 444-7.
17. Leevy CM. Fatty Liver: Study of 270 patients with biopsy fatty liver and review of the literature. *Medicine.* 1962; 41: 249-76.
18. Deguti M. Esteato-Hepatite Não Alcoólica: Avaliação Clínica, Histopatológica e Pesquisa de Mutações do Gene HFE. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2000.
19. Schaffner F, Adler M. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med.* 1979; 67: 811-816.
20. Mattos A. Hesteato-hepatite não alcoólica. *J Bras Gastroenterol* 2005; 5:160-165.
21. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology.* 1994; 107(4): 1103-9.
22. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough, AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999; 116(6): 1413-9.
23. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis.* 2010; 28: 155–161.
24. Machado M, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol.* 2013; 58: 1007–1019
25. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Sauver J, Muto A, Okada T, Lindor K. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology.* 2005; 41(1): 64-71.
26. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, et al. The metabolic syndrome as a predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.* 2005; 143(10): 722-728.
27. Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. Hepatology out patient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med.* 2007;7(2): 119-124.
28. Björnsson E, Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1023–1030.

29. Lee JY, Kim KM, Lee SG, Yu E, Lim YS, Lee HC, Chung YH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol.* 2007; 47(2): 239-44.
30. 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; 34: 274-285.
31. Williams CD, Stenger J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 2011; 140: 124-131.
32. Barshop NJ, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28(1):13-24.
33. Giorgio V, Prono F, Graziano F, Nobili V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease old and new concepts on developmet, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatrics.* 2013; 13:40.
34. Rocha R, Cotrim HP, Bittencourt AGV, Barbosa DB, Santos AS, Almeida Ade M, Cunha B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in asymptomatic Brazilian adolescents. *World J Gastroenterol.* 2009; 8: 313–321.
35. Cotrim HP, Parise E, Oliveira C, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva Rde C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil: clinical and histological profile. *Ann Hepatol.* 2011; 10(1): 33–37.
36. Leite NC, Villela-Nogueira CA, Pannain VL, Bottino AC, Rezende GF, Cardoso CR, Salles GF. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalence and correlated factors. *Liver Int.* 2011; 31(5): 700–706.
37. Freitas L, Cotrim H. Atlas Histológico de Esteato-Hepatite Não Alcoólica - NASH. Zambon, 2006.
38. Angelico F, Del Ben M, Conti, R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, et al. Insuline Resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metal.* 2005; 90: 1578-82.
39. Youssef WI, MC Cullough AJ. Statohepatitiis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002; 16: 733-42.
40. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16 (42): 5286-96.
41. Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol.* 1997; 26:13-22.

42. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22 (6): 643-50.
43. Freitas LAR, Alves VAF. Patologia da DHGNA. In: Galizzi, JF, Cotrim, HP, Parise ER, Oliveira, CP. Doença hepática gordurosa não alcoólica – Esteato-hepatite e suas correlações. São Caetano do Sul: Yendis; 2011. p. 187-210.
44. Yeh MM, Raju M, Younes M. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Medscape Drugs, Disease, Procedures*. 2013.
45. Riley NE, Li J, McPhaul LW, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW. Heat shock proteins are presente in mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsy specimens. *Exp Mol. Pathol*. 2003; 74: 168-72.
46. Stsnad P, Stumptener C, Zatloukal K, Denk H. Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. *Histochem Cel Biol*. 2008; 129: 735-49.
47. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta*. 2011; 412: 1297-305.
48. Yamaguchi K, Yang L, McCall, S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007; 45(6): 1366-74.
49. Palma LC, Doença Esteatótica não alcoólica do fígado: comparação das alterações histológicas hepáticas entre modelo murinho e pacientes obesos. [dissertação de mestrado]. Bahia: Universidade Federal da Bahia; 2012.
50. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091): 87-91.
51. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 2557-2562.
52. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2006; 43: (1)163-72.
53. Dela Pena 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; 129(5): 1663-74.
54. Videla A, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli, P, Haim D, Santibanez C Araya AV et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17 (5): 973-9.

55. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82 (24): 8681-5.
56. Hernandez – Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Ver Pathol*. 2011; 6: 425-56.
57. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterolgy*. 2008; 134 (6):1655-69.
58. Monotemático-Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Sociedade Brasileira de Hepatologia
59. El-Zayadi AR. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(26): 4120-6.
60. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002; 346(16): 1221-31
61. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci*. 2008; 115(5): 141-15.
62. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008; 28(4): 370-9.
63. Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev*. 2008; 60(3): 311-57.
64. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010; 26(3): 202-8.
65. Melo, ISV. Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos à dieta cetogênica rica em trienantina. [dissertação de mestrado]. Alagoas: Universidade Federal de Alagoas; 2011.
66. Day CP, James OF. Steatohepatitis:a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998; 114 (4): 842-5.
67. Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010; 30(4): 391-401.
68. Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009; 41(9): 615-25.
69. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003; 37: 917-23.
70. Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009; 16(2): 141-9.

71. Ortiz TH. Efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
72. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* 2009; 50: s74-9.
73. Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Sci.* 2009; 116: 539-64.
74. Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(34): 4539-50.
75. Oliveira CP, Mazo DFC. Doença hepática gordurosa não alcoólica: fisiopatogênia e relação com a terapêutica. In: Parise ER, Mendonça Filho HTF. Esteatose hepática: visão hepatologia e cardiometabólica. São Paulo: Arte de Viver, 2013, p. 25-33 MTS editora 2013.
76. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut.* 2005; 54(7): 987-93.
77. Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES Abdalla DS et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med.* 2002; 6(3): 399-406.
78. Kanuri G, Bergheim I. *In Vitro* and *in Vivo* Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 11963-11980.
79. Fan JG, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009; 8(3): 233-240.
80. Schattenberg JM, Galle PR. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig. Dis.* 2010; 28: 247-254.
81. Almonacid-Urrego CC, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. Non-alcoholic steatohepatitis: what can we learn from animal models? *J Curr Med Chem* 2012; 19(9): 1389-1404.
82. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in NAFLD and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006; 87: 1-16.
83. Ariz U, Mato JM, Lu SC, Martínez Chantar ML. Nonalcoholic steatohepatitis, animal models, and biomarkers: what is new? *Methods Mol Biol.* 2010; 593: 109-36.

84. Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287: G1070–G1077.
85. Sundaresan S, Vijayagopal P, Mills N, Imrhan V, Prasad C. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem*. 2011; 22(10): 789-794.
86. Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Oude Elferink RP, Besselsen DG, Erickson RP, Cherrington NJ. Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 613(1-3): 119-127.
87. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci*. 2014; 14(11): 21833-57.
88. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(19): 2300–2308.
89. Rogers AE, Newberne PM. Alcoholic and nutritional fatty liver and cirrhosis. *Am J Pathol*. 1973; 73 :817-820.
90. Zamin JI, Mattos A, Mattos A, Migon E, Soares E, Perry M. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arq. Gastroenterol* 2009; 46: 69-74.
91. Guo WX, Pye QN, Williamson KS, Stewart CA, Hensley KL, Kotake Y, Floyd RA, Broyles RH. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med*, 2005; 39(5): 641-650.
92. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutri Rev*. 2009; 67(11): 615-623.
93. Zeisel SH. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition*. 2000; 16: 669-71.
94. El-Husseiny OM, El Din G, Abdul-Aziz M, Mabroke RS. Effect of mixed protein schedules combined with choline and betaine on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 2008; 39: 291–300.
95. Vance JE. Secretion of VLDL, but not HDL, by rat hepatocytes is inhibited by the ethanolamine analogue N-onomethylethanolamine. *J Lipid Res* 1991; 32: 1971-82.
96. Fast DG, Vance DE. Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1258: 159-68.
97. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990; 1(5): 228-237.

98. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001, p. 2007–2056.
99. Eikelboom JW, Jonn E, Genest JR J. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999; 131: 363-375.
100. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev*. 1999; 20(5): 738-759.
101. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40(5): 311-320.
102. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998; 338(15): 1042-1050.
103. Benevenga NJ, Steele RD. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annu. Rev. Nutr*. 1984; 4: 157–181.
104. Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC. Methionine Metabolism and Liver Disease. *Annu. Rev. Nutr*. 2008; 28: 273–293.
105. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson E, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 2004; 39(5): 1286-1296.
106. Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, De la Peña A, Hormans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol*. 2004; 41(6): 926-934.
107. Yu J, Ip E, De la Peña A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P et al . COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology*. 2006; 43(4): 826-836.
108. Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Badger TM, Ronis MJ. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294(1): G27-38.
109. Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, Mc-Clain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006; 20(1): 39-47.
110. Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Oude Elferink RP, Besselsen DG, Erickson RP, Cherrington NJ. Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 613(1-3): 119-127.

111. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol.* 2006; 536(1-2): 182-91.
112. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin Resistance. *J. Hepatology.* 2004; 40(1): 47-51.
113. Llesuy, SF. Introducción y especies activas de oxigênio. In: Marroni NP. *Estresse oxidativo e antioxidantes.* Canoas: Ulbra; 2002, p. 21-32.
114. Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2006; 163(1-2): 38-53.
115. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55.
116. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980; 492: 153-68.
117. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal and Diseases. *Biochem J.* 1984; 219(1): 1-14.
118. Southorn P, Powis G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and biological Reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988; 63(4): 381-9.
119. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 312-322.
120. Surh YJ. *Oxidative Stress, Inflammation and Health.* Londres: Taylor & Francis; 2005.
121. Oktyabrsky ON, Smirnova GV: Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc).* 2007; 72(2): 132-45
122. Schnachenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2(2): 121-5.
123. Russel GA. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons. Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals. *J Am Che Soc.* 1957; 79: 3871-3880.
124. Halliwell B, Gutteridge, JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 2 ed., Oxford: Clarendon Press; 1989.

125. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2001; 37: 293-303.
126. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005; 57 Suppl: 108-19.
127. Blair IA. Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metab.* 2006; 7(8): 853-72.
128. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 47-95.
129. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Nova York: Oxford University Press; 2007.
130. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.* 2004; 10(11): 549-57.
131. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011; 16(2): 123-40.
132. Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339(1): 79-88.
133. Yates S, Kensler TW. Keap1 eye on the target: chemoprevention of liver cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(9): 1331-42.
134. Niture Sk, Jain Ak, Jaiswal Ak. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 2009;122(24): 4452-64.
135. Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Kou YR, Yang CM. Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(10): 1410-22.
136. Holland R, Fishbein CJ. Chemistry of the Cysteine Sensors in Kelch-Like ECH Associated Protein. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13(11): 1749-61.
137. Tamiello CS. Efeitos da 3-nitrochalcona sobre células de hepatoma humano (HepG2). Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2013.
138. Scoparo CT. Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade de células de hepatoma humano (HepG2). Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2012.

139. Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences*, 2008; 65 (6): 862-894.
140. Gorman AM, Healy SJ, Jager R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2012; 134 (3): 306–316.
141. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Cir Res.* 2010; 107(5): 579-91.
142. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004; 14(1): 20-28.
143. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med.* 2004; 71(5): 289-97.
144. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Bio Cell.* 1999; 10 (11): 3787-3799.
145. Costa CZ, da Rosa SE, de Camargo MM. The unfolded protein response: how protein folding became a restrictive aspect for innate immunity and B lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2001; 73(5): 436-48.
146. Rosa SEA. Regulação da via UPR no retículo endoplasmático em linfócitos B na imunodeficiência comum variável. *Dissertação (Mestrado em Imunologia)*, Universidade de São Paulo, 2011.
147. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010; 140 (6): 900-917.
148. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(2): 89-102.
149. Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M et al Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Pineal Res.* 2013; 55(3); 221-228.
150. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(7): 1768-1777.
151. Henkel AS, Dewey AM, Anderson KA, Olivares S, Green RM. Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303(1):G54-549.
152. Ritossa F. A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18 (12): 571-573.

153. Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Field MR, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol.* 1995 ;268(6):1387-94.
154. Baba HA, Schmid KW, Schmid C, Blasius S, Heinecke A, Kerber S, et al. Possible relationship between heat shock protein 70, cardiac hemodynamics, and survival in the early period after heart transplantation. *Transplantation.* 1998; 65(6):799-804.
155. Gonzalez B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol.* 2004; 556(2): 369-85.
156. Neuer A, Spandofer SD, Giraldo P, Dieterles, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update.* 2000; 6(2): 149-59.
157. Amici C, Rossi A, Santoro MG. Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cell: an effect associated with the modulation of the heat shock response. *Cancer Res.* 1995; 55(19): 4452-7.
158. Edelman Da, Jiang Y, Tyburski Jg, Wilson Rf, Steffes Cp. Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J Surg Res.* 2007; 140(2): 171-6.
159. Jensen RE, Johnson AE. Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr Biol.* 1999; 9(20): 779-82
160. Benjamin IJ, Mcmillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1998; 83(2):117-32.
161. Feldman DE, Frydman J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10(1): 26-33.
162. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18: 637-706.
163. Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci.* 2006; 11: 2802-27.
164. Bittencourt, A. Efeito de diferentes intensidades de exercícios físicos sobre a expressão de HSP70: complicações no metabolismo da glicose e função celular. Monografia (Escola de Educação Física. Curso de Educação Física: Bacharelado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

165. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 2001; 15(7): 1118-31.
166. Linarelli MCB, Pott JR. Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares *Rev. Ciênc. Méd.* 2008; 17(1): 43-52.
167. Brautbar A, Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 8(5): 253-65.
168. Davidson MH, Toth PP. Comparative effects of lipid lowering therapies. *Prog Cardiovasc Dis.* 2004; 47: 104-73.
169. Portela AS, Montenegro NA, Silva PCD, Simões MOS, Almeida MG. Estatinas x ácido lipóico na prevenção e tratamento das doenças cardio vasculares. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2014; 35(1): 09-15.
170. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *JK Trends Mol Med.* 2008; 14(1): 37-44.
171. Loecker I, Preiser JC. Statins in the critically ill. *Ann Intensive Care.* 2012; 2: 19.
172. Mennickent SC, Bravo MD, Calvo CM, Avello ML. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Revista médica de Chile.* 2008; 136(6): 775-782.
173. Liao JK, Ulrich L. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 89–118.
174. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circ J.* 2010; 74(5): 818–826.
175. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86(5): 484–493.
176. Alberts AW, Chen J, Kuran G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77: 3957-61.
177. Rodríguez-Yáñez M, Agulla J, Rodríguez- González R, Sobrino T, Castillo J. Statins and stroke. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008; 2: 57-166.
178. Chalasani N. Statins and hepatology: focus on patients with fatty liver *Hepatology.* 2005; 41(4): 690-5.
179. Younoszai Z, Li Z, Stepanova M, Erario M, Cable R, Younoszi ZM. Statin use is not associated with liver related mortality. *Ann Hepatol* 2014; 13: 84-90.
180. Finegold J, Manisty C, Goldacre B, Barron A, Francis D. What proportion of symptomatic side effects in patients taking statins are genuinely caused by the

drug? Systematic review of randomized placebo-controlled trials to aid patient choice. *Eur J Preventive Cardiol.* 2014.

181. Eslami L, Merat S, Malekzadeh R, Nasser-Moghaddam S, Aramin H. Statins for non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013.

7 ARTIGOS

7.1 Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis

Artigo enviado para revista Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Dear Dr. Rodrigues,

The Research Article titled "Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis," by Graziella Rodrigues, Andrea Janz Moreira, Silvia Bona, Elizângela Schemitt, Claudio Augusto Marroni, Thienne Rocha Pires, Jaqueline Nascimento Picada and Norma Possa Marroni has been received and assigned the number 973686.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to BioMed Research International.

Best regards,

Noha Elmoemen
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

Simvastatin treatment reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis

Graziella Rodrigues,^{1,2} Andrea Janz Moreira,^{3,2} Silvia Bona,^{1,2} Elizângela Schemitt,^{1,2} Cláudio Augusto Marroni,⁴ Thienne Rocha Pires,⁵ Jaqueline N. Picada,⁵ Norma Possa Marroni,^{1,2,3,5}

¹Post-Graduation Program in Medical Sciences, Medical School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

²Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

³ Post -Graduation Program in Biological Sciences: Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Post-Graduation Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health Lutheran University of Brazil, 92425-900 Canoas, RS, Brazil

Author for correspondence: Norma Possa Marroni, 102, Jose Kanan Aranha, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (fax 55 51 32483202, e-mail nmarroni@terra.com.br).

Abstract:

In this study we evaluated the efficacy of simvastatin in treatment of non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine and choline deficient diet in mice and its possible effect on factors involved in the pathogenesis of the disease including oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. Male C57BL6 mice were fed either a normal diet (control) or a methionine and choline deficient diet for four weeks, and then treated orally with simvastatin (4mg/Kg once a day) for two final weeks. At the end of the experimental period, liver integrity, systemic histology, DNA damage, biomarkers of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress were assessed. Simvastatin treatment was able to significantly reduce hepatic damage enzymes, and hepatic lipids and lower the degree of hepatocellular ballooning, without showing genotoxic effects. Simvastatin caused significant decreases in lipid peroxidation, with some changes in antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase. Simvastatin activates antioxidant enzymes via Nrf2 and inhibits endoplasmic reticulum stress in the liver. In summary, the results provide evidence that in mice with experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine and choline deficient diet, the reduction of liver damage by simvastatin is associated with attenuated oxidative and endoplasmic reticulum stress. However, further studies about simvastatin dosing have to be performed, investigating other molecular mechanisms and potential clinical applications.

1. Introduction

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is an important stage in the development from simple hepatic steatosis to fibrosis and cirrhosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by hepatocellular ballooning degeneration and necroinflammation based on hepatic steatosis [1-6].

NASH is a common chronic liver disease, and it has been one of the important factors leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [7,8].

The pathogenesis of NASH remains poorly understood [9]. Day and James (1998) have proposed the “two-hits” hypothesis for the pathogenesis of NASH based on an animal model that remains a foundation for research in this field [10]. According to this theory, hepatic steatosis is mainly caused by metabolic syndrome (first hit). The second hit includes cellular stresses such as oxidative stress, apoptosis, endoplasmic reticulum (ER) stress and gut-derived lipopolysaccharide (LPS) [11]. Therefore, the classical “two-hits” hypothesis of progression to NASH is now being modified by a “multiple parallel hits” hypothesis [12]. Among the above factors generating the second hit, oxidative stress is thought to be a major contributor to the pathogenesis and progression of steatosis to NASH [13].

Available treatments are not entirely satisfactory and taken together, NAFLD and NASH are multidisciplinary liver diseases that require interventions targeting the cardiometabolic and liver disorders for the effective treatment of patients with these diseases [14].

Statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors) are used worldwide to treat lipid disorders, particularly elevated low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and substantially reduce cardiovascular events and mortality [14].

Although there are case reports of hepatotoxicity related to statins, very few are associated with severe course and liver failure [15]. However, there are accumulating data in the literature suggesting that statins, such as simvastatin (SIM), may also exert anti-inflammatory effects, such as inhibition of cytokine formation, adhesion molecule expression as well as reduction of nitric oxide production [16-18], all of which could be of value in protecting against pathological inflammation and tissue damage. For example, previous studies have shown that SIM protects against tissue damage in models of sepsis, ischaemia-reperfusion, glomerulonephritis, and asthma, and many studies have shown that statins have a potent antioxidant effect [19-23], and their antioxidant properties may be valuable in the fight against oxidative DNA damage [24].

In this study, we evaluated the efficacy of SIM in the treatment of NASH induced by methionine and choline deficient (MCD) diet in mice and its possible effect on factors involved in the pathogenesis of the disease including oxidative stress and ER stress.

2. Materials and methods

2.1. Animals

In this trial, 32 male C57BL/6 mice were used. They were 8 weeks old, weighed 25 grams on average and were obtained from the Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul. The animals were kept in polypropylene cages (47 x 34 x 18 cm), with 4-6 animals in each cage and under standard conditions. They were provided with water and food *ad libitum* and maintained on a 12-hr light/dark cycle (light cycle from 7 a.m. to 7 p.m.) under controlled temperature ($24 \pm 1.0^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2. Diet composition

The MCD diet was manufactured by the Brazilian company PragSolucões®, as described by Newberne & Camargo [25], with modifications as noted in Marcolin *et al.* 2012[26]. Two types of rat chow were manufactured: MCD and control. The control diet was identical to the MCD diet but contained adequate amounts of methionine and choline.

2.3. Experimental procedure

The experimental protocol complied with the norms established by the Ethical and Health Research Committee of the Group of Research and Postgraduate Studies of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, as well as with the Principles for Research Involving Animals [27]. NASH was induced by feeding the animals with the MCD diet *ad libitum* for 4 weeks. The animals in the control group received the same diet, though with the addition of adequate concentrations of methionine and choline.

The animals were randomly divided into four groups (n=8): Control+Vehicle (CO+V): which received the control diet for 4 weeks plus vehicle; Control+SIM 4mg/kg (SIM 4): which received the control diet for 4 weeks plus Simvastatin 4 mg/kg; NASH+Vehicle (NASH+V): which received the MCD diet for 4 weeks plus vehicle; NASH+SIM 4mg/kg (NASH+SIM 4): which received the MCD diet for 4 weeks plus Simvastatin 4mg/kg; SIM was administered by gavage for 2 weeks. The vehicle was composed of sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) 1% and functioned as a carrier for SIM.

2.4. Experimental design

On experimental day 1, the animals were randomly assigned to the groups and given their corresponding diets. They were monitored throughout the experiment. Four weeks later, they were weighed and anaesthetized by inhalatory Isoflurane so that their blood could be sampled from the retro-orbital plexus for liver integrity and biochemical analyses. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, followed by cervical dislocation as described in the AVMA Guidelines on Euthanasia [28]. The liver was removed by medium ventral laparotomy with total hepatectomy, a part of which was prepared for the histological analysis, while the remaining tissue was frozen in liquid nitrogen for triglyceride and cholesterol concentration, comet assay, oxidative stress and reticulum stress analysis.

2.5. Liver integrity analysis

Liver integrity was assessed by measuring blood levels of enzymes aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) with standard laboratory methods at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.6. Biochemical analysis

The systemic biochemical analysis included total cholesterol and triglycerides levels. They were measured using standard laboratory methods at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.7. Hepatic Lipids

In order to measure the hepatic lipid content, frozen liver samples were thawed on ice and homogenized in deionized water. Extraction and isolation of lipids to yield dried lipid extracts were performed using the technique described by Folch et al. [29]. The hepatic cholesterol and triglycerides content of the lipids extracts were then assayed enzymatically by colorimetry.

2.8. Histology

For the histological evaluation, a piece of the liver was trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hr. The obtained blocks were dehydrated in a graded series of ethanol, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The minimum histological criterion for the diagnosis of NASH was the presence of steatosis associated with hepatocellular ballooning involving zone 3 and lobular inflammatory infiltrate. The grading of both necro-inflammatory activity and fibrosis was performed according to the classification proposed by Brunt *et al.* [30].

2.9. Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice *et al.* [31], with minor modifications [32]. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal and consequently for each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (maximum damage, 100 cells x 4).

2.10. Lipid peroxidation, cytosolic superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx)

The livers were homogenized with 9mL of phosphate buffer (KCL 140mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) per gram of tissue. The protein concentration in these liver homogenates was determined using a standard solution of bovine albumin according to Bradford [33]. Liver lipoperoxidation was determined by TBARS [34]. Cytosolic SOD was assayed spectrophotometrically by rate of epinephrine auto-oxidation, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate; the amount of enzyme that results in 50% of the maximum inhibition is defined as 1 Unit SOD/mgprot [35]. GPx analysis was carried out according to Flohé and Gunzler, [36] based on the consumption of NADPH in the reduction of oxidized glutathione and values were expressed in nmol/mgprot.

2.11. Western blot

Western blot analysis was performed in cytosolic and nuclear extracts prepared from liver homogenates as described previously [37]. The supernatant fraction was collected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured by the Bradford assay [33]. Lysate proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes [38,39]. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4 °C with polyclonal anti-NQO1, anti-Keap1, anti-Nrf2, anti-ATF6, anti BIP/GRP78, antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200-1:1.000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. Bound primary antibody was detected, HRP—with anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG or anti- goat IgG antibodies. (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain) [40]. The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer Software (Scion Image, Maryland, MA).

2.12. Statistical analysis

The results were expressed as mean values \pm SD. The data were analyzed using a Student–Newman–Keuls post hoc ANOVA test. Pearson's test (chi-square) was used for correlational analysis. Qualitative variables were subjected to cross-table and the level of significance was 5% ($P < 0.05$). The software used was SPSS 17.0.

3. Results

3.1 Liver integrity

The serum levels of AST and ALT were significantly elevated in the NASH+V group when compared to CO+V and SIM 4 groups, indicating considerable hepatocellular injury. AST and ALT did not show differences in NASH+SIM 4 when compared with NASH+V (Table 1).

TABLE 1: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on liver integrity analysis in C57BL/6 mice.

	AST (mg\dl)	ALT (mg\dl)
CO+V	69.14±13.38	30.75±7.52
SIM 4	74.1±14.50	33.8±7.69
NASH+V	354.0±62.29***	404.0±53.66***
NASH+SIM 4	303.7±42.15 [#]	369.0±39.34 [#]

CO+V: Control plus vehicle (n=8); SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg (n=8); NASH+V: NASH plus vehicle (n=8); NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg (n=8).

Data appear as mean ± SD.

***P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4.

[#]P < .001 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

3.2 Biochemical analyses

The serum levels of TC and TG, were significantly reduced in the NASH+V group when compared with the CO+V and SIM 4 groups, although no significant differences were observed between the NASH+V groups and the NASH+SIM 4 (Table 2).

TABLE 2: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on biochemical analysis in C57BL/6 mice.

	Total Cholesterol (mg\dl)	Triglyceride (mg\dl)
CO+V	129.9±13.70	67.00±11.88
SIM 4	123.1±13.50	64.30±8.73
NASH+V	28.5±7.73***	33.6.5±3.70***
NASH+SIM 4	22.5±4.07 [#]	28.5±2.49 [#]

CO+V: Control plus vehicle (n=8); SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg (n=8); NASH+V: NASH plus vehicle (n=8); NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg (n=8).

Data appear as mean ± SD.

***P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4.

[#]P < .001 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

3.3 Hepatics Lipids

In the NASH+V group, hepatic cholesterol and triglycerides content were significantly elevated as compared with CO + V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups (Table 3).

TABLE 3: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on hepatic lipids in C57BL/6 mice.

	Cholesterol (mg Cholesterol\mg tissue)	Triglyceride (mg Triglyceride \mg tissue)
CO+V	0.19±0.03	1.54±0.45
SIM 4	0.20±0.03	1.30±0.42
NASH+V	0.40±0.10*	2.2±0.35*
NASH+SIM 4	0.20±0.02	1.7±0.43

CO+V: Control plus vehicle (n=8); SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg (n=8); NASH+V: NASH plus vehicle (n=8); NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg (n=8).

Data appear as mean ± SD.

*P < .05 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4.

3.4. Histology

No animal receiving the CO+V diet showed any histological alterations (data not shown). Histological liver changes were observed in animals of the NASH+V group: microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis, inflammation and hepatocellular ballooning (Figures 1a, 1b,

1c). SIM administration markedly attenuated the primary ballooning process (Figure 1d and Table 4).

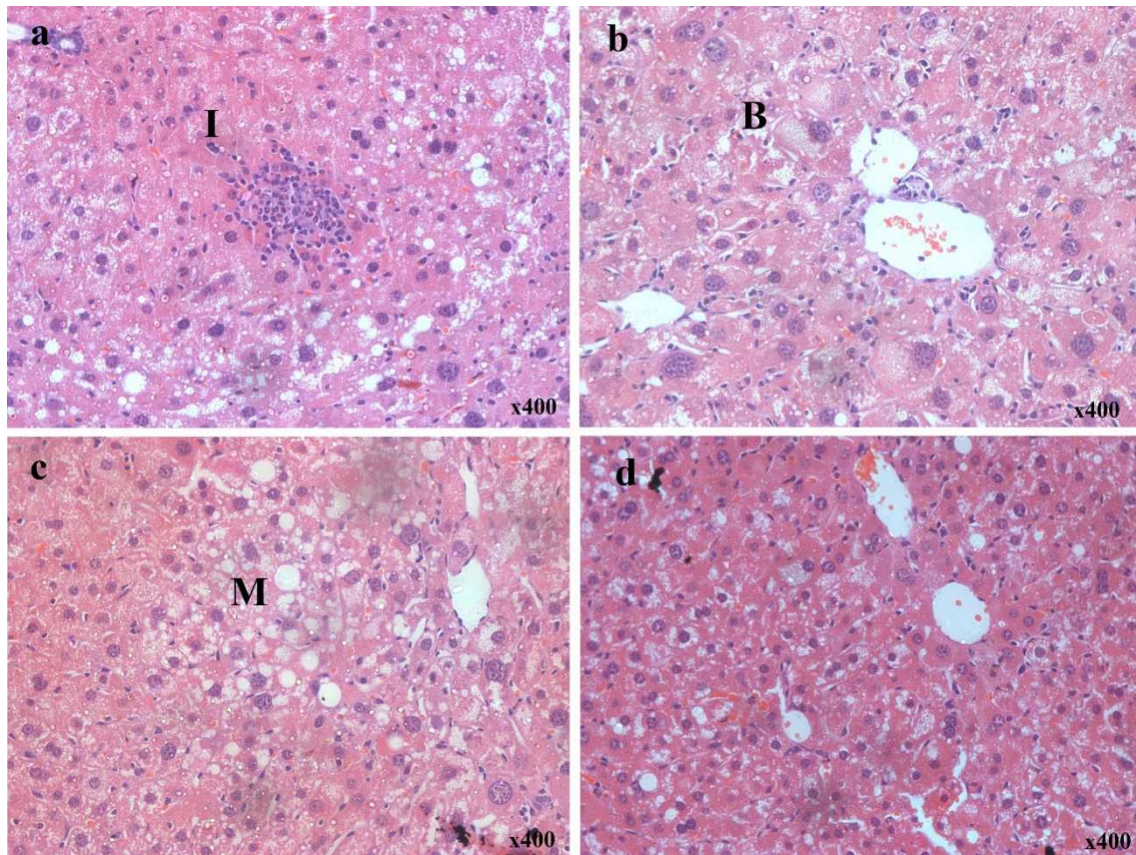


Figure 1: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin. Photomicrograph of liver of NASH+V (a,b,c) and NASH+SIM 4 (d). (H-E, 400X). I: inflammation, B: Ballooning, M: microvesicular steatosis.

TABLE 4: Ballooning in the liver from mice with NASH treated ou not with Simvastatin.

Cross table		Developed the balonization or no		Total
		Without Simvastatin	With Simvastatin	
Ballooning	None	0	5	5
	Few Balloon Cells	7	3	10
	Many Cell prominent ballooning	1	0	1
Total		8	8	16
		value	df	significance
Pearson's test (chi-square)		11.000a	2	.004
Likelihood ratio		14.230	2	.001
Linear by linear association		9.860	1	.002
n		16		16

3.5. Comet assay

Table 5 shows the DNA damage in livers after 4 weeks. There was a significant increase in DI in the NASH+V as compared to the CO+V group, suggesting that mice with NASH exhibited increased DNA damage in liver. Although the DI in NASH+SIM4 was higher than in CO+V, it was not statistically significant. SIM at 4 mg/kg also did not increase DI in comparison to CO+V, suggesting that this dose was not able to induce DNA damage.

TABLE 5: Comet assay in the liver from mice with and without NASH treated with Simvastatin.

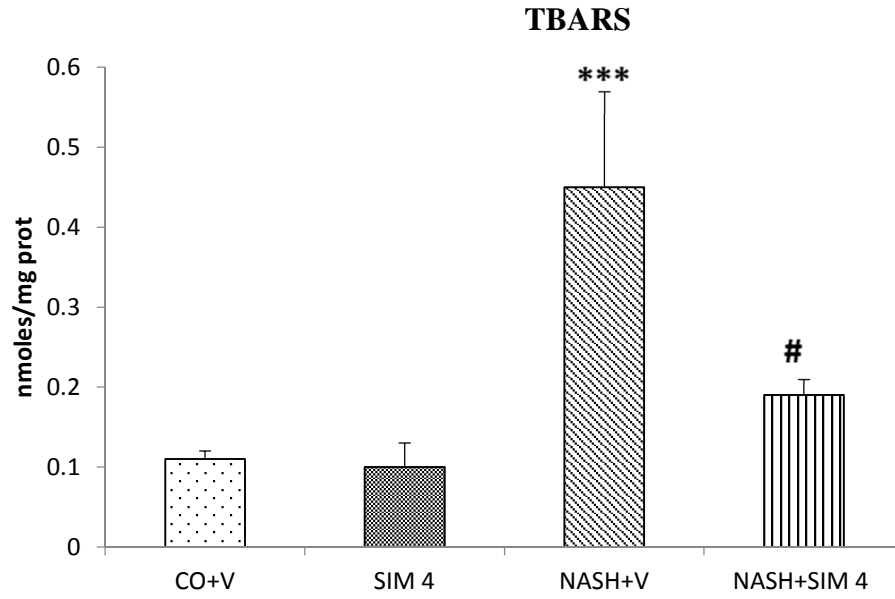
	DI
CO+V	58.5±15.7
SIM 4	61.68±12.34
NASH+V	111.17±16.97*
NASH+SIM 4	85.40±18.82

CO+V: Control plus vehicle (n=8); SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg (n=8); NASH+V: NASH plus vehicle (n=8); NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg (n=8).

DI: Damage index, which can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 x 4); *P<0,05 CO+V vs NASH+V;

3.6. Lipid peroxidation, SOD and GPx activity

The analysis of lipoperoxidation (LPO) through TBARS showed a significant increase (300%) in NASH+V as compared to CO+V group. NASH+SIM 4 showed a significantly decrease (57%) of LPO as compared to NASH+V (Figure 2). Analysis of antioxidant enzyme activities showed that SOD activity was decreased in the livers of the NASH+V group (33%) as compared to CO+V and SIM 4 groups. SOD activity was increased (50.6%) in the treated (NASH+SIM 4) compared to the NASH+V group (Figure 3A). Concerning GPx activity, there was a significant decrease (64%) in NASH+V group as compared to the CO+V and the GPx activity increased (48%) in the treated (NASH+SIM 4) group as compared to NASH+V (Figure 3B).



The data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). ***P < 0.001 against all groups; #P < 0.01 against CO+V and SIM 4.

CO+V: Control plus vehicle; SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg; NASH+V: NASH plus vehicle; NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg.

Figure 2: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on lipoperoxidation in C57BL/6J mice.

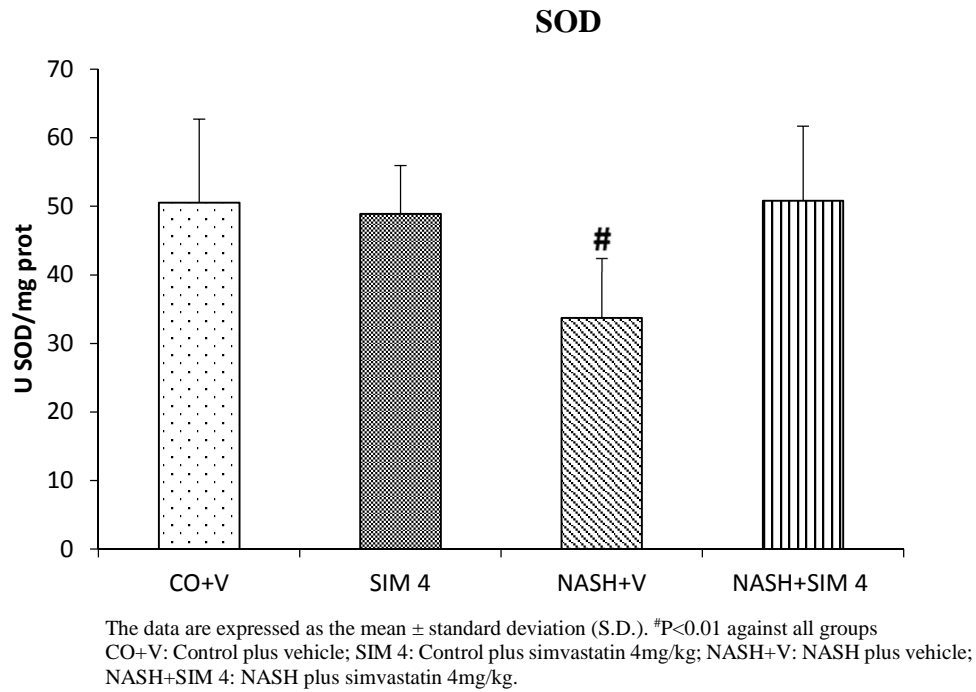


Figure 3A: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on superoxide dismutase in C57BL/6J mice.

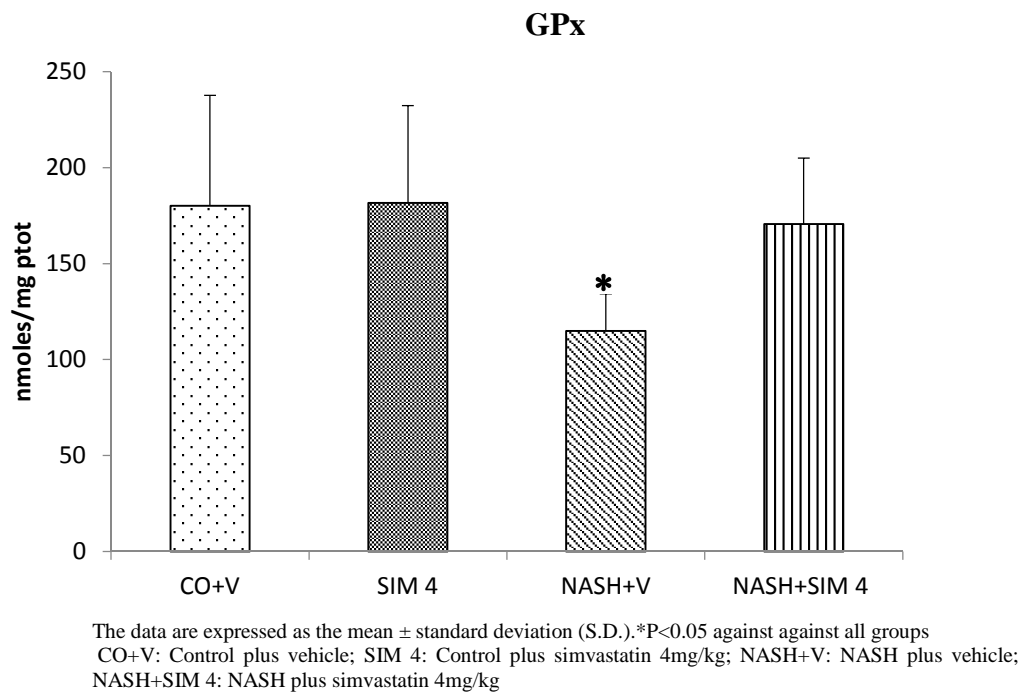
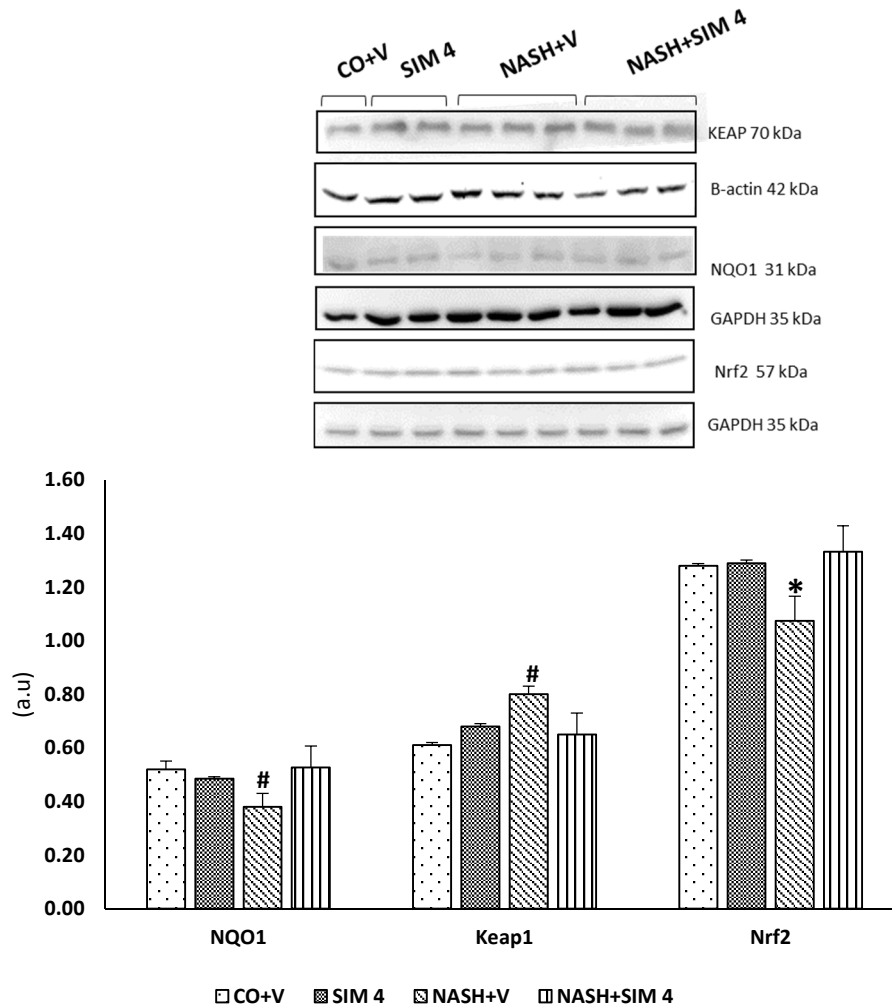


Figure 3B: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on glutathione peroxidase in C57BL/6J mice.

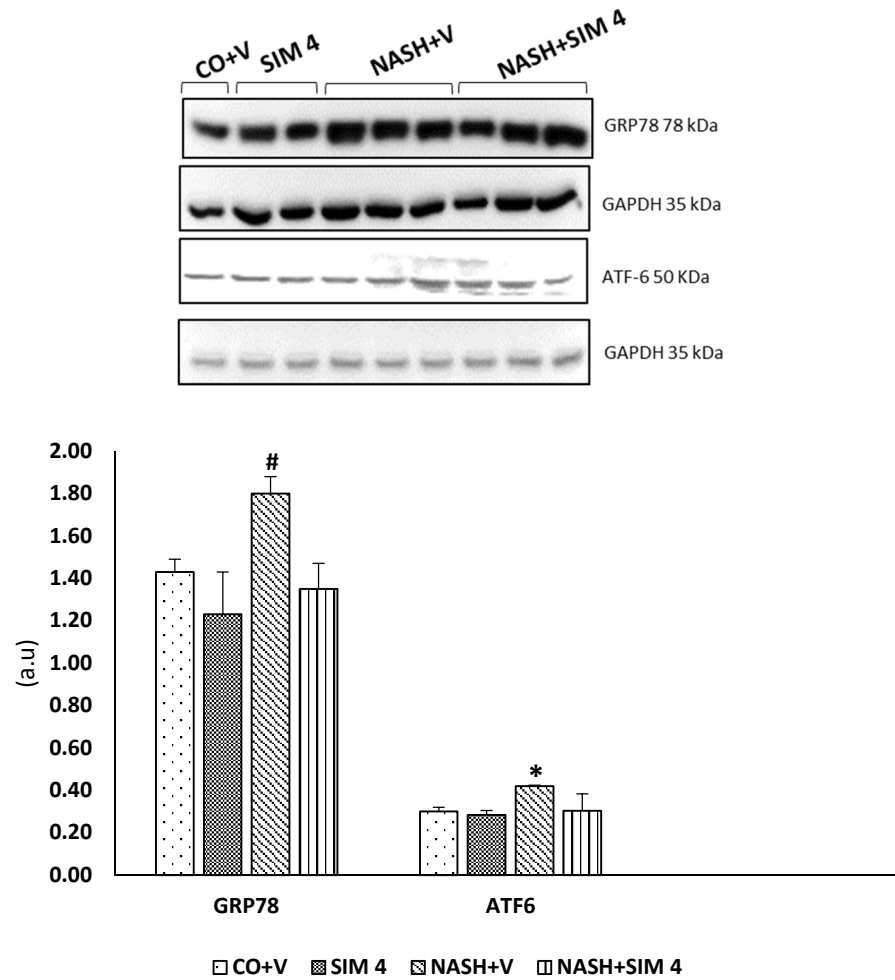
3.7 Western Blot

Nuclear Nrf2 protein was underexpressed in the NASH+V group. However the animals in the NASH+ SIM 4 group overexpressed Nrf2. Expression of NQO1 was reduced in animals with NASH and SIM was able to increase the expression of this protein (Figure 4). Protein markers related to ER stress were also evaluated. NASH +V group increased the activation of endoplasmic reticulum stress markers, such ATF-6 and GRP78. SIM was sufficient to decrease NASH-induced endoplasmic reticulum stress (Figure 5).



The data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). [#]P<0.01 against all groups; ^{*}P<0.05 against all groups
 CO+V: Control plus vehicle; SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg; NASH+V: NASH plus vehicle;
 NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg.

Figure 4: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on NQO1, Keap1 and Nrf2 protein by Western blot analysis.



The data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). [#]P<0.01 against all groups; ^{*}P<0.05 against all groups
 CO+V: Control plus vehicle; SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg; NASH+V: NASH plus vehicle;
 NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg.

Figure 5: Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on GRP78 and ATF6 protein by Western blot analysis.

4. Discussion

Current research has shown that NASH is the most important epidemiological and clinical form of NAFLD. So far, there is no entirely proven treatment for NASH. Statins are an important class of agents to treat dyslipidemia, but there is still reluctance in using this drug in patients with established or suspected chronic liver disease, including NASH.

AST and ALT are enzymes that are sensitive to hepatocellular injury. The release of large quantities of these enzymes in the bloodstream is associated with centrilobular necrosis, degeneration, and reduced performance status of the liver [41]. In the evaluation of hepatocellular damage, aminotransferases alterations were observed in the animals that received the MCD diet. There are reported cases of statin-related hepatotoxicity but although elevated aminotransferases are not uncommon in patients receiving statins, serious liver injury from statins is rarely seen in clinical practice [5]. The use of SIM here did not increase the assessed parameters, suggesting that its use does not cause worsening of liver damage.

The MCD diet is a good model described for NASH induction. It produces steatosis due to a decrease in the export of very-low-density lipoproteins (VLDLs), as choline and methionine are the precursors of the phosphatidylcholine phospholipid lining the VLDL [42]. In the absence of choline, VLDL is not secreted and triacylglycerol (triglyceride) builds up in the liver cytosol. These VLDL fragments are confirmed by our data, which showed a decrease in triglycerides and cholesterol plasma levels along with extensive lipid accumulation in the liver. Accordingly, quantification of the hepatic triglyceride and cholesterol levels showed that MCD diet-induced hepatic lipid accumulation was attenuated by SIM treatment.

Oxidative DNA damage is the most common threat to genomic stability. There is strong evidence implicating the generation of ROS and the corresponding responses to oxidative stress as key factors in the pathogenesis of several human diseases [43]. A significant increase in DNA damage in the liver was observed in the NASH group, suggesting that this disorder can decrease genomic stability in the liver, corroborating a previous study [44]. Most likely, these effects are implicated in the pathogenesis of NASH, especially concerning the generation of ROS leading to injuries by oxidative stress [45]. Studies have shown that geno-protective or genotoxic effects of SIM are dose-dependent [46]. Here, the lowest dosage tested was not able to induce DNA damage evaluated by the comet assay. DI values were not sufficiently lower in the NASH+SIM 4 group than in the NASH group to indicate a protective effect. Furthermore, DI values in the NASH+SIM 4 group were not statistically different from those of the CO+V group, reinforcing that this dosage is not able to induce DNA damage in NASH mice and, conversely, it could be exerting some protective effect.

In the MCD dietary model of NASH, animals develop steatohepatitis, exhibiting features that are histologically similar to the clinicopathological features of human NASH [47,48]. Consistent with our expectation, the administration of the MCD diet to C57BL/6 mice resulted in a classical pathophysiological picture of NASH, with microvesicular and macrovesicular steatosis, indicative of disturbed lipid metabolism, multiple foci of inflammatory cell accumulations in the liver and ballooning. Treatment with SIM led to a marked decrease in the hepatocellular ballooning degree in livers of mice fed the MCD diet. Many studies have considered hepatocellular ballooning as the main histological feature of NASH and as common for the diagnosis of NASH [49,50], and it can even be considered as a prognostic marker [51].

Oxidative stress is involved in the development and progression of NASH [52-55] and high levels of ROS, due to insufficiency of the antioxidant defense system, may lead to disruption of cellular function and oxidative damage to membranes, enhancing their susceptibility to lipid peroxidation [56,57]. Our study showed a significant increase in lipid peroxidation in animals with NASH induced by four-week MCD diet. This damage can be caused by the increase of ROS in the liver tissue. Similar data were reported in other studies of

NASH induced by MCD diet [44,58,59]. SIM administration significantly decreased TBARS levels in hepatic tissue of animals fed the MCD diet. These results are in agreement with previous studies investigating the effects of SIM [60,61]. However, in these studies the dose of SIM and the experimental models are different. On the other hand, Zamin Jr *et al.* [62] used the MCD diet model and observed that SIM (0.5mg/kg) did not show any benefits, and the TBARS results were similar to those of the animals using saline 0.9%.

Oxidative stress is the result of a redox imbalance between the generation of ROS and the compensatory response from the endogenous antioxidant network. The enzyme system, such as SOD and GPx, prevents the accumulation of O₂^{*} and hydrogen peroxide, and is therefore considered the primary line of defense [63]. It has been reported that the levels of these antioxidants parameters are decreased in the livers of patients with NASH [64]. In our study, the MCD diet significantly diminished the antioxidant-associated parameters levels, including SOD and GPx, and SIM reverted this, increasing them. These results indicate that SIM can decrease oxidative damage indirectly by activating endogenous defense elements.

Nuclear factor-erythroid-2- related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that plays a central role in the antioxidant defense cellular system. It binds to the so called antioxidant responsive elements (AREs) and regulates the expression of a number of protective genes in response to oxidative stress and electrophiles. Under basal conditions, Nrf2 is retained in the cytoplasm bound to Keap1 which promotes its proteasomal degradation. Upon exposure to ROS or other inducers, Nrf2 is released from Keap1 and translocates to the nucleus where it stimulates the expression of antioxidant genes such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), that protect the cell from the deleterious effects of ROS [65-69]. However, Nrf2 expression was greatly reduced in animals with NASH. According to Sugimoto *et al.* [69], the loss of Nrf2 leads to rapid onset and exacerbation of steatohepatitis in animal models of NASH. Our study showed that SIM activates antioxidant enzymes via Nrf2. Habeos *et al.* [68] demonstrated that Nrf2, a key regulator of the antioxidant defense, is activated by SIM.

The ER is a cellular organelle essential for cell function and survival. Conditions that interfere with ER function lead to the activation of the unfolded protein response (UPR), a homeostatic signaling network that orchestrates the recovery of ER function, and failure to adapt to ER stress results in apoptosis [40]. The ER stress response has recently been proposed to play a crucial role in both the development of steatosis and progression to NASH [70,71]. The ER stress response is mediated through three endoplasmic reticulum transmembrane receptors, such activating transcription factor 6 (ATF6) and one chaperone, glucose-regulated protein GRP78. In the unstressed state, GRP78 is bound to these transmembrane receptors. However, when unfolded proteins accumulate in the ER, GRP78 preferentially binds to UPR [70].

These markers were induced in animals with NASH due to the use of the MCD diet because this diet is associated with the activation of an ER stress pathway [70-72]. GRP78 has been recently shown to play a central role modulating the sensitivity and duration of the UPR [40, 73]. The ATF6 pathway also plays a role in stress-induced lipid accumulation [71]. SIM plays a role in hepatic protection by inhibiting the ER stress in the liver. The salutary effects of statins suggest that the effects may be independent of cholesterol-lowering activity.

In summary, the results provide evidence that in mice with experimental NASH induced by MCD diet, the reduction in liver damage by SIM is associated with attenuation of oxidative stress and ER stress. However, further research into SIM dosage should be carried out to investigate other molecular mechanisms and potential clinical applications.

Financial Support

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq], Laboratório de Estresse Oxidativo (ULBRA) and Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS).

Conflict of Interest

The authors of this paper declare that they have no conflicts of interest.

References

1. P. Angulo, "Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 346, no. 16, pp. 1221–1231, 2002.
2. E. Vanni, E. Bugianesi, A. Kotronen, S. De Minicis, H. Yki-Järvinen, and G. Svegliati-Baroni, "From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa?" *Digestive and Liver Disease*, vol. 42, no. 5, pp. 320–330, 2010.
3. K. L. Kopec and D. Burns, "Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy," *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 26, no. 5, pp. 565–576, 2011.
4. M. V. Machado and H.J. Cortez-Pinto, "Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal," *Hepatology*, vol. 58, no 5, pp, 1007-1019, 2013.
5. N. Chalasani, Z Younossi, J. E. Lavine et al., "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association," *Hepatology*, vol.55, no.6, pp. 2005-2023, 2012.
6. Q. H. Yang, Y. J. Xu, Y. Z. Liu et al., "Effects of Chaihu-Shugan-San and Shen-Ling-Bai-Zhu-San on p38 MAPK Pathway in Kupffer Cells of nonacoholic Steatohepatitis," *Evidence-based complementary and alternative medicine*, vol. 2014, Article ID 671013, 8 pages, 2014.
7. M. Fuchs, "Non-alcoholic fatty liver disease: the bile acid-activated farnesoid x receptor as an emerging treatment target," *Journal of Lipids*, vol. 2012, Article ID 934396, 8 pages, 2012.
8. Y. Yimin, H. Furumaki, S. Matsuoka et al., "A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein," *Laboratory Investigation*, vol. 92, no. 2, pp. 265–281, 2012.
9. J. C. Cohen, J. D. Horton and H. H. Hobbs, "Human fatty liver disease: old questions and new insights," *Science*, vol. 332, no. 6037, pp. 1519-1523, 2011.
10. C. P. Day and O. F. James, "Steatohepatitis: a tale of two "hits?," *Gastroenterology*, vol. 114, no. 4, pp. 842-845, 1998.

11. A. Takaki, D. Kawai and K. Yamamoto, "Multiple Hitis, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and treatment target in Non- alcoholic Steatohepatitis (NASH)," *International journal of molecular sciences* vol. 14, no. 10, pp. 20704-20728, 2013.
12. H. Tilg and A. R. Moschen, "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits Hypothesis," *Hepatology*, vol. 52, no. 5, pp. 1836-1846, 2010.
13. G. H. Koek, P. R. Liedorp and A. Bast, "The role oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis," *Clinica chimica acta*, vol. 412, no. 15-16, pp. 1297-1305, 2011.
14. K. Nakajima, "Multidisciplinary Pharmacotherapeutic Options for Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *International Journal of Hepatology*, vol. 2012, Article ID 950693, 13 pages, 2012.
15. Z. Younoszai, Z. Li, M. Stepanova, M. Erario, R. Cable and Z.M. Younossi, "Statin use is not associated with liver related mortality," *Annals of Hepatology*, vol. 13, no. 1, pp. 84-90, 2014.
16. C. Weber, W. Erl, K. S Weber and P. C Weber, "HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 30, no. 5, pp.1212-1227, 1997.
17. A. Giusti-Paiva, M. R. Martinez, J. V. Felix et al., "Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats," *Shock*, vol. 21, no. 3, pp. 271-275., 2004.
18. M. Terblanche, Y. Almog, R. S. Rosenson, T.S. Smith and D.G. Hackam, "Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels," *The Lancet infectious diseases*, vol. 7, no. 5, pp. 358-368, 2007.
19. I. Araújo-Filho, D. T. Jacome, A. C. M. Rego, I. M. Azevedo, E. S. T. Egitto and A. C. Medeiros, "Efeito da simvastatina na sepse abdominal de ratos diabéticos," *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, vol. 37, no.1, pp. 39-44, 2010.
20. A. M. Lefer, B. Campbell, Y. K. Shin, R. Scalia, R. Hayward R and D. J. Lefer, "Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts," *Circulation*, vol. 100, no. 2, pp. 178-184, 1999.
21. M. Christensen, A. W. Su, R. W. Snyder, A. Greco, J. H. Lipschutz and M. P. Madaio, "Simvastatin protection against acute immune mediated glomerulonephritis in mice," *Kidney international*, vol. 69, no. 3, pp. 457-463, 2006.
22. A. McKay, B. P. Leung, I. B. McInnes, N. C. Thomson and F. Y. Liew, "A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma," *The Journal of immunology*, vol. 172, no. 5, pp. 2903-2908, 2004.
23. R. Durant, K. Klouche, S. Delbosc et al., "Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin," *Shock*, vol. 22, no. 1, pp. 34-39, 2004.
24. F. Franzoni, A. Quinones-Galvan, F. Regole, E. Ferrannini and F. Glatte, "A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statin," *International Journal of Cardiology*, vol. 90, no. 2-3, pp. 317-321, 2003.

25. P. M Newbere, J. L. V. D. Camargo, A. J. Clark. "Choline Deficiency, Partial Hepatectomy and Liver Tumors in Rats and Mic," *Toxicologic pathology*. Vol. 10: 95-106, 1992.
26. E. Marcolin, B. San-Miguel, D. Vallejo et al., "Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis," *Journal of Nutrition*, vol. 142, no. 10, pp. 1821-1828, 2012.
27. "Guiding principles for research involving animals and human beings," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 283, no. 2, pp. R281-283, 2002.
28. "AVMA releases updated euthanasia guidelines," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 231, pp. 827-8 2007.
29. J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues," *The Journal of biological chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497-509, 1957.
30. E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri and B. R. Bacon, "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions," *The American journal of gastroenterology*, vol. 94, no. 9, pp. 2467-2474, 1999.
31. R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson et al., "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing," *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 35, no. 3, pp. 206-221, 2000.
32. A. Hartmann, E. Agurell and C. Beevers et al., "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, vol. 18, no. 1, pp. 45-51, 2003.
33. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
34. J. A. Buege and S. D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation," *Methods in enzymology*, vol. 52, pp. 302-310, 1978.
35. H. P. Mirsa and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *The Journal of biological chemistry*, vol. 247, no. 10, pp. 3170-3175, 1972.
36. L. Flohé and W. A. Gunzler, "Assays of glutathione peroxidase," *Methods in enzymology*, vol. 105, pp. 114-121, 1984.
37. M. J. Tuñón, B. San-Miguel, I Crespo et al., "Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus," *Journal of pineal research*, vol. 50, no. 1, pp. 38-45, 2011.
38. B. San-Miguel, M. Alvarez, J. M. Culebras, J. González-Gallego and M.J. Tuñón, "N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure," *Apoptosis*, vol. 11, no. 11, pp. 1945-1957, 2006.

39. J. L. Mauriz, V. Molpeceres, M. V. García-Mediavilla, P. González, J. P. Barrio and J. González-Gallego, "Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats," *Journal of pineal research*, vol. 42, no. 3, pp. 222-230, 2007.
40. M.J. Tuñón, B. San-Miguel, I Crespo et al., "Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin.," *Journal of pineal research*, vol.55, n. 3, pp. 221-228, 2013.
41. M. G. Rajesh and M. S. Latha, "Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formula tion," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 91, no. 1, pp. 99–104, 2004.
42. I. Pereira, C. Oliveira, V. Debas et al., "Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) modulates the expression of proteins involved in de novo lipogenesis and lipid exportation in experimental nonalcoholic steatohepatitis (NASH)," *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, vol. 3, pp. 48-58, 2013.
43. R. Vercelino, J. Tieppo, A. Dias et al. "N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome," *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, vol. 102, no. 4, pp. 370-376, 2008.
44. E. Marcolin, L. F. Forgiarini, G. Rodrigues at al., "Quercetin decreases liver damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis," *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, vol. 112, no. 6, pp. 85-91, 2013.
45. M. A. Schults, P. W. Nagle, S. S. Rensen et al., "Decreased nucleotide excision repair in steatotic livers associates with myeloperoxidase-immunoreactivity," *Mutation research*, vol. 735, no. 1-2, pp. 75-81, 2011.
46. T. N. Coetsee, P. J. Pretorius, G. Terre'Blanche and J. J. Bergh, "Investigating the potential neuroprotective effects of statins on DNA damage in mouse striatum," *Food and chemical toxicology*, vol. 46, no. 9, pp. 3186-3192, 2008.
47. I. A. Leclercq, G. C Farrell, L. Field, D.R. Bell, F. J. Gonzalez and G.R. Robertson, "CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis," *The Journal of clinical investigation*, vol. 105, no. 8, pp. 1067 -1075, 2000.
48. T. Ota, T. Takamura, S. Kurita et al., "Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 1, pp. 283-293, 2007.
49. E. Cortez-Pinto, A. Baptista, M. E. Camilo, A. Valente, A. Saragoca and M. Moura de Carneiro, "Non-alcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients," *Digestive diseases and sciences*, vol. 41, no. 1, pp. 172-179, 1996.
50. I. Doycheva and R. Loomba, "Effect of Metformin on Ballooning Degeneration in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)," *Advances in therapy*, vol. 31, no.1, pp. 30-43, 2014.
51. C. A. Matteoni, Z. M. Younossi, T. Gramlich, N. Boparai, Y. C. Liu and A. J. McCullough, "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity," *Gastroenterology*, vol. 116, no. 6, pp. 1413-1419, 1999.

52. S. A. Harrison, S. Kadakia, K. A. Lang, S. Schenker, "Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium," *The American journal of gastroenterology*, vol. 97, n. 11, pp. 2714-2724, 2002.
53. E. Cortez-Pinto, M. C. de Moura and C. P. Day, "Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice," *Journal of Hepatology*, vol. 44, no. 1, pp. 197-208, 2006.
54. S. A. Al-Busafi, B. Mamatha, P. Wong, P. Ghali, M. Deschenes, "Antioxidant Therapy in Nonalcoholic Steatohepatitis," *Hepatitis Research and Treatment*, vol. 2012, Article ID 947575, 8 pages, 2012.
55. Z. Tariq, C. J. Green and L. Hodson, "Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)?" *Liver international*, 2014.
56. G. Rodrigues, F. Di Naso, M. Porawski et al., "Treatment with Aqueous Extract from Croton cajucara Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 902351, 7 pages, 2012.
57. J. W. Baynes, "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes," *Diabetes*, vol. 40, no. 4, pp. 405-412, 1991.
58. A. K. Min, M. K. Kim, H. S. Kim et al., "Alpha-lipoic acid attenuates methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in C57BL/6 mice," *Life sciences*, vol. 90, no. 2012, pp. 200-205, 2012.
59. H. J. Hur, H. J. Yang, J. T. Hwang et al., "Dandelion leaf extract protects against liver injury induced by methionine- and choline-deficient diet in mice," *Journal of medicinal food*, vol. 16, no. 1, pp. 26-33, 2013.
60. N. Bernardes, J. O. Brito, T. G. Fernandes et al., "Pleiotropic effects of simvastatin in physically trained ovariectomized rats," *Brazilian journal of medical and biological research*, vol. 46, no. 5, pp. 447-453, 2013.
61. A. M. Abbas and H. F. Sakr, "Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet," *Journal of physiology and biochemistry*, vol. 69, no. 4, pp. 737-50, 2013.
62. J. R. Zamin, A. A. Mattos, A. Z. Mattos, G. Coral, D. Santos and C. Rhoden, "The vitamin E reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis," *Arquivos de gastroenterologia*, vol. 47, no. 1, pp. 86-92, 2010.
63. B. Halliwell and J. C. M. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge, JMC [eds.]. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4rd ed, Oxford University Press, New York, 2007, p.187-267.
64. F. Marra, A. Gastaldelli, G. S. Baroni, G. Tell and C. Tiribelli, "Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis," *Trends in molecular medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 272-28, 2007.
65. K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi et al., "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 236, no. 2, pp. 313-322, 1997.

66. K. Itoh, K. I. Tong and M. Yamamoto, "Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1, pathway in regulation of adaptive response to electrophiles," *Free radical biology and medicine*, vol. 36, no. 10, pp. 1208-1313, 2004.
67. M. Kobayashi, L. Li, N. Iwamoto et al., "The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds," *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 2, pp. 493-502, 2009.
68. I. G. Habeos, P. G. Ziros, D. Chartoumpekis, A. Psyrogiannis, V. Kyriazopoulou and A. G. Papavassiliou, "Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver," *Journal of molecular medicine*, vol. 86, no. 11, pp. 1279-1285, 2008.
69. R. Shimozono, Y. Asaoka, Y. Yoshizawa et al., "Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model," *Molecular pharmacology*, vol. 84, no. 1, pp. 62-70, 2013.
70. X. Q. Zhang, C. F. Xu, C. H. Yu, W. X. Chen and Y. M. Li, "Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease," *World Journal of gastroenterology*, vol. 20, no. 7, pp. 1768-1776, 2014.
71. A. S. Henkel, A. M. Dewey, K. A. Anderson, S. Olivares and R. M. Green, "Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 303, no. 1, pp. G54-59, 2012.
72. S. M. Rahman, J. M. Schroeder-Gloeckler, R. C. Janssen et al., "CCAAT/enhancing binding protein beta deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis," *Hepatology*, vol. 45, no. 5, pp. 1108-1117, 2007.
73. B. M. Gardner and P. Walter, "Unfolded proteins are IRE1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response," *Science*, vol. 30, no. 6051, pp. 1891-1894, 2011.

7.2 Simvastatin treatment attenuates non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline deficient diet in mice

Artigo enviado para revista Protoplasma.

Dear Mrs Rodrigues,

Re: SIMVASTATIN TREATMENT ATTENUATES NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS INDUCED BY METHIONINE-CHOLINE DEFICIENT DIET IN MICE

Thank you for approving the changes that the Editor made to your submission or updating your submission according to the requested changes.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://prot.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Protoplasma

Simvastatin treatment attenuates non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-choline deficient diet in mice

**Graziella Rodrigues,^{1,3} Andrea Janz Moreira,^{2,3} Silvia Bona,^{1,3} Elizângela Schemitt,^{1,3}
Cláudio Augusto Marroni,⁴ Norma Possa Marroni,^{1,2,3,5}**

¹ Post-Graduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre - RS - Brazil.

² Post Graduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Rua Sarmiento Leite, 500 - Porto Alegre - RS - Brazil

³ Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos, 2400 - Porto Alegre - RS - Brazil.

⁴ Post-Graduate Program in Hepatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁵ Graduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil - Av. Farroupilha, 8001- Canoas - RS - Brazil.

Corresponding author:

Dr. Norma Possa Marroni

Rua José Kanan Aranha, 102 - Porto Alegre - RS - Brazil

CEP: 91760470

Phone: (55) (51) 99643011

Fax: (55) (51) 32483202

Email: nmarroni@terra.com.br

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered one of the most frequent liver diseases in the world. It occurs in both genders, at any age, including children and teenagers. The available treatments are not entirely satisfactory. In this study we evaluated the efficacy of simvastatin in treatment of NASH induced by methionine-choline deficient diet in mice and its possible effect on factors involved in the pathogenesis of the disease including oxidative stress, fibrosis, inflammation and cell damage. Male C57BL6 mice were fed either a normal diet (control) or a methionine and choline deficient diet for four weeks, and then treated orally with simvastatin (4mg/Kg once a day) for two additional weeks. Simvastatin treatment was able to significantly reduce hepatic damage enzymes and lipid peroxidation. Simvastatin decreased expression of TGF- β , iNOS, IL-12 and HSF1 and increased eNOS and HSP70 expression. In summary, the findings suggest that the attenuation of oxidative stress, fibrotic inflammation and cell damage pathways contributes to the beneficial effects of simvastatin in this model, but such effects should be further confirmed in long-term clinical trials for NASH.

Keywords: Non-alcoholic steatohepatitis, simvastatin, fibrosis and inflammation

Keywords: Non-alcoholic steatohepatitis, simvastatin, fibrosis and inflammation

Introduction

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is the most important epidemiological and clinical form of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and may be associated with fibrosis and progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Fuchs, 2012; Yimin et al. 2012).

Both biologically active lipid peroxidation products and cytokines act together to trigger the diverse hepatic lesions of NASH by inducing hepatic inflammation and fibrosis that lead eventually to end-stage liver disease (Schwabe and Brenner, 2006; Marcolin et al. 2013).

The pathophysiology of NASH is still not fully understood, and available treatments are not entirely satisfactory. However, therapies that limit hepatic injury and the related occurrence of inflammation and fibrosis are particularly appealing for this condition (Marcolin et al. 2012).

Statins, among the most commonly prescribed drugs worldwide, are cholesterol-lowering agents and have been shown to act through cholesterol-dependent and -independent mechanisms and are able to affect several tissue functions and modulate specific signal transduction pathways that could account for statin pleiotropic effects (Gazzerro et al. 2012). Although there are case reports of hepatotoxicity related to statins, very few are associated with severe course and liver failure (Younoszai et al. 2014). There are accumulating data in the literature suggesting that statins, such as simvastatin (SIM), may also exert anti-inflammatory effects, such as inhibition of cytokine formation, adhesion molecule expression as well as reduction of nitric oxide production (Weber et al. 1997; Giusti-Paiva et al. 2004; Terblanche et al. 2007), all of which could be of value in protecting against pathological inflammation and tissue damage (Dold et al. 2009). According to Wang et al. (2013) most studies demonstrated that SIM not only reduced circulating low-density lipoprotein cholesterol but also decreased hepatic lipid deposition in patients with NASH. However, it was still controversial whether it improved hepatic inflammation and fibrosis.

The methionine-choline-deficient (MCD) diet impairs the synthesis of phosphatidylcholine, an essential part of the phospholipid component of very low-density lipoprotein (VLDL) (Yao and Vance, 1988; Gyamfi et al. 2009), contributing to early hepatic lipid accumulation and peroxidation followed by inflammation and fibrosis (George et al. 2003; Vetalainen et al. 2007; Barakat et al. 2012).

In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of SIM on experimental model of NASH, using a MCD diet.

2 Materials and methods

2.1 Animals

In this trial, 20 male C57BL/6 mice were used. They were 8 weeks old, weighed 25 grams on average and were obtained from the Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul. The animals were kept in polypropylene cages (47 x 34 x 18 cm), with 4-6 animals in each cage and under standard conditions. They were provided with water and food *ad libitum* and maintained on a 12-hr light/dark cycle (light cycle from 7 a.m. to 7 p.m.) under controlled temperature ($24 \pm 1.0^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2 Diet composition

Mice were fed either a MCD diet (Supplemental Table 2) or a control diet, which was identical to the MCD diet but supplemented with DL-methionine (3 g/kg) and choline chloride (2 g/kg). Diets were prepared by PragSoluções Comércio e Serviços Ltda and stored at $4\text{-}10^\circ\text{C}$ until used.

2.3 Experimental procedure

The experimental protocol complied with the norms established by the Ethical and Health Research Committee of the Group of Research and Postgraduate Studies of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, as well as with the Principles for Research Involving Animals.

NASH was induced by feeding the animals with the MCD diet *ad libitum* for 4 weeks. The animals in the control group received the same diet, though with the addition of adequate concentrations of methionine and choline. The animals were randomly divided into four groups ($n=5$): Control+Vehicle (CO+V): which received the control diet for 4 weeks plus vehicle; Control+SIM 4mg/kg (SIM 4): which received the control diet for 4 weeks plus Simvastatin 4 mg/kg; NASH+Vehicle (NASH+V): which received the MCD diet for 4 weeks plus vehicle; NASH+SIM 4mg/kg (NASH+SIM 4): which received the MCD diet for 4 weeks plus Simvastatin 4mg/kg; SIM was administered by gavage for 2 weeks. The vehicle was composed of sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) 1% and functioned as a carrier for SIM.

2.4 Experimental design.

On experimental day 1, the animals were randomly assigned to the groups and given their corresponding diets. They were monitored throughout the experiment. Four weeks later,

they were weighed and anaesthetized by inhalatory Isoflurane. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, followed by cervical dislocation as described in the AVMA Guidelines on Euthanasia. Liver samples were obtained for molecular analysis.

2.5 Biochemical markers of lipid peroxidation and liver injury.

Lipoperoxidation was measured in liver using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay (Buege and Aust, 1978). Serum levels of enzymes aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were determined by kinetic UV test. They were measured using routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre by enzymatic method (automated – Siemens Advia 1800 Chemistry system).

2.6 Western Blot

Western blot analysis was performed in cytosolic and nuclear extracts prepared from liver homogenates as described previously (Tuñón et al. 2011). The supernatant fraction was collected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured by Bradford (1976). Lysate proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (San-Miguel et al. 2006, Mauriz et al. 2007). The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-TGF- β (SC31609/ 25kDa), anti-eNOS (SC8311/ 130kDa), anti-iNOS (SC7271/ 120kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200-1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. Anti-IL-12 (74151 / 70kDa), anti-HSF1 (H4163/75kDa), anti-HSP70 (H5147/ 73 and 72kDa) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) antibody at 1:5,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. Anti- β -actin (A5060/ 42kDa) antibody (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) antibody at 1:2,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1hr at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4,000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain) (Tuñón et al. 2013). The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer Software (Scion Image, Maryland, MA).

2.7 Statistical analysis

Means and standard deviations (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). In the case of significance, Student–Newman–Keuls test was applied. P values < 0.05 were deemed significant. All analyses were carried out using SPSS 18.0.

3. Results

3.1 Effects of simvastatin treatment on liver injury in the MCD diet-induced model of NASH.

Body weight was significantly lower and ALT and AST serum levels and liver TBARS concentration were significantly higher in the NASH+V group as compared to CO groups, indicating considerable hepatocellular injury and lipoperoxidation. Serum transaminase activities and TBARS concentration in the liver were also significantly lower in NASH+SIM 4 mice compared to the NASH group, but no significant effects were observed on body weight (Table 1).

3.2 TGF- β expression in the model of NASH by MCD diet and the effect of Simvastatin.

TGF- β is the most potent profibrotic cytokine, we investigated its expression. TGF- β was significantly overexpressed in the NASH+V group compared to the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups (Figure 1). Simvastatin inhibited expression of TGF- β in the MCD diet-induced model of NASH.

3.3 eNOS and iNOS expression in the model of NASH by MCD diet and the effect of Simvastatin.

Hepatic expression of eNOS in NASH+V was gradually decreased compared to the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups. However, hepatic expression of iNOS increased in NASH+V compared to the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups (Figure 2).

3.4 IL-12 expression in the model of NASH by MCD diet and the effect of Simvastatin.

The IL-12 expression in liver was greater in the NASH+V group than in the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups (Figure 3). Simvastatin decreased the hepatic expression of IL-12 in the MCD diet-induced model of NASH.

3.5 HSP70 and HSF-1 expression in the model of NASH by MCD diet and the effect of Simvastatin.

HSP70 expression in NASH+V was reduced compared to the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups. Nuclear hepatic expression of HSF1 increased in NASH+V compared to the CO+V, SIM 4 and NASH+SIM 4 groups (Figure 4). Simvastatin increased the hepatic expressions of HSP70 and reduced the HSF1 expression in the MCD diet-induced model of NASH.

4 Discussion

In this study, we demonstrated that SIM attenuates oxidative stress, fibrosis, inflammation and cell damage in C57BL/6 mice with NASH. SIM decreased TGF- β , iNOS, IL-12 and HSF1 expression in the liver of MCD diet-fed mice. It also restored the eNOS and HSP70 expressions in these animals. The use of a diet deficient in such essential amino acids as methionine and choline is a well accepted model for inducing NASH which recapitulates many of the features of this disease in humans (Marcolin et al. 2013).

Blood levels of liver enzymes (AST and ALT) were significantly higher in NASH mice than in controls animals, similarly to others studies (Min et al. 2012; Park et al. 2013; Xin et al. 2014). As animals treated with SIM had lower ALT and AST serum levels, a hepatoprotective effect is suggested. It is also important to note that no significant differences in enzyme levels were observed between the CO+V and SIM 4 groups, indicating an absence of adverse effects due to SIM administration.

Increased reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of liver fibrosis by inducing HSC proliferation (Galli et al. 2005). In this study, TBARS liver concentration indicated the presence of a marked oxidative stress in animals with NASH, in accordance with previous studies. This effect was partially abrogated by SIM treatment, confirming its antioxidant properties.

Liver fibrosis, as a wound-healing response to chronic liver injury, is characterized by excessive extracellular matrix protein deposition (De Minicis et al. 2012). The most important clinical challenge in NASH is the progression to liver fibrosis, which often leads to liver failure (Csak et al. 2011). The effects of MCD diet on development of fibrosis were evaluated by quantifying TGF- β expression. TGF- β is an important fibrogenic factor for hepatic stellate cells (HSC). We observed that SIM treatment was able to reduce the TGF- β expression. Statins have

also shown anti-fibrotic functions in a variety of mammalian cell lines or tissues through interference with the Rho/ROCK/CCN2/-ECM cascade (Watts et al. 2005). The correlation between Rho/ROCK pathway and fibrogenic signaling pathway has gained more attentions in recent years (Li et al. 2014).

Nitric oxide (NO) is generated constitutively from sinusoidal endothelial cells mediated by endothelial NO synthase (eNOS) under normal physiological conditions (Leung et al. 2008). During inflammation, inducible NO synthase (iNOS) plays a major role in NO production contributing to tissue damage (Yoneda et al. 2009). We also studied the behavior of the inflammatory mediator nitric oxide (NO), evaluating eNOS and iNOS expression in cytoplasmic extract of livers. Our results demonstrated that eNOS expression decreased significantly and iNOS expression increased significantly in the NASH+V group, a typical feature of the inflammation process. Enhanced expression of iNOS generates oxidative stress and leads to proinflammatory state and the reduction of eNOS affects hepatic microcirculation (Leung et al. 2008; Leung et al. 2011). However, SIM-treated animals showed increased eNOS expression. Statins affect eNOS expression and activity mainly through three mechanisms (Laufs et al. 1998): (i) statins increase eNOS expression by prolonging eNOS mRNA half-life rather than by inducing *eNOS* gene transcription; (ii) statins reduce caveolin-1 abundance. Caveolin-1 is an integral membrane protein and binds to eNOS in caveolae, there by inhibiting NO production directly; (iii) statins can activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase Akt pathway (Laufs and Liao, 1998; Plenz et al. 1998; Kureishi et al. 2000; Wang et al. 2008). Statins restore endothelial NO production by several mechanisms including up-regulation of eNOS protein expression and blocking ROS formation.

We also studied the involvement of the inflammatory mediator. In liver, Kupffer cells are resident macrophages. They are an important source of both inflammatory and anti-inflammatory mediators (Valatas et al. 2004). Research has shown that amounts of inflammatory cytokines and biologically toxic mediators from activated Kupffer cells have been strongly implicated in the pathogenesis of hepatic injury, including interleukin-12 (IL-12) (Yang et al. 2014). The present study demonstrates that MCD diet increased IL-12 expression, while treatment with SIM decreased it. Our results are in accordance with Maina et al. (2012), who demonstrated the importance of M1 responses in the development of NASH by showing that a prevalent liver expression of M1 markers correlates with increased hepatic inflammation in C57BL/6 mice with MCD-induced NASH.

Another interesting finding from our investigation was a significant over expression of nuclear HSF1 and reduction of cytoplasmic HSP70 expression in liver tissue with NASH. HSF1

is the main regulator of the heat shock response, which is involved in protecting cells and organisms from heat, ischemia, inflammation, oxidative stress and other noxious conditions (Sorger, 1991; Pirkkala et al. 2001; Chuma et al. 2014). HSF1 is the major transcription factor regulating induction of HSP70 in response to heat shock response. The chaperone Hsp70 regulates a diverse set of signaling pathways through its interaction with proteins (Manucha et al. 2011). HSP70 has strong cytoprotective effects and functions as a molecular chaperone in protein folding, transport, and degradation (Gupta et al. 2010). Many studies have associated reduced expression of HSP70 with disease progression or severity of liver damage (Boonjaraspinyo et al. 2012; Di Naso et al. 2014). Although the pathway that is avoiding the induction of HSP70 was not elucidated, we believe that the decreased expression of HSP70 can contribute as a stimulus to maintain the activation of nuclear factor HSF1 (Shi et al. 1998; Morimoto, 2011; Westerheide et al. 2012). Meanwhile, in NASH+SIM4 group a significant increase in HSP70 expression was observed, as well as a reduction in the HSF-1 expression. SIM plays role in hepatic protection by enhanced the HSP70, restoring the regulatory function of HSF1-HSP70. A significant increase in HSP70 protein expression was shown in NASH+SIM 4 group. Accumulating evidence suggests that statins have biological effects beyond reducing cholesterol synthesis. Uchiyama et al. (2006), reported that SIM increases eNOS, HSP70 mRNA and protein expression in vascular endothelial cells

The findings suggest that attenuation of oxidative stress, fibrosis inflammation and cell damage pathways contribute to the beneficial effects of SIM in mice with MCD diet-induced steatohepatitis but the beneficial effects of SIM should be further confirmed in long-term clinical trials for NASH.

Financial Support

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Laboratório de Estresse Oxidativo (ULBRA) and Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS).

Conflict of Interest

The authors of this paper declare that they have no conflicts of interest.

References

- AVMA (2007) AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). pp 1-39.
- Barakat H, Hamza AH (2012) Glycine Alleviates Liver Injury Induced by Deficiency in Methionine and or Choline in Rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16: 728-36.
- Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewkes S, Laummaunwai P, Pinlaor S, Loilome W, et al. (2012) Down-regulated expression of HSP70 in correlation with clinicopathology of cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 18: 227-37.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310.
- Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, et al. (2014) Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis* 2: 272-81.
- Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, et al. (2011) Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and Toll-like receptor 4 expression attenuates non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300:433-41.
- De Minicis S, Marzioni M, Saccomanno S, Rychlicki C, Agostinelli L, Trozzi L, Svegliati-Baroni G (2012) Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis leading to liver cancer. *Transl Gastrointest Cancer* 1:88-94.

- Di Naso FC, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, Motin CC, et al. (2014) Obesity depresses the anti-inflammatory hsp70 pathway contributing to the progression of NAFDL in obese patients. *Journal of Hepatology*, 60: S163.
- Dold S, Laschke, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius (2009) Simvastatin protects against cholestasis- induced liver injury. *Br J Pharmacol* 156: 466-474.
- Fuchs M (2012) Non-alcoholic fatty liver disease: the bile acid-activated farnesoid x receptor as an emerging treatment target. *Journal of Lipids*: 8 pages.
- Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzani R, et al. (2005) Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2 mediated mechanism. *Hepatology* 41: 1074-84.
- Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, et al. (2012) Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev* 64: 102-46.
- George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G (2003) Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 39:756-64.
- Giusti-Paiva A, Martinez MR, Felix JV, et al. (2004) Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. *Shock* 21:271–275.
- Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A (2010) HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol* 8: e1000410.
- Gyamfi MAY. Tanaka Y, He L, Klaassen CD, Wan YJY (2009) Hepatic effects of a methionine choline-deficient die in hepatocyte RXR α -null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 234: 166-178.

- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 6: 1004–1010.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129–1135.
- Laufs U, Liao JK (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* 273: 24266–24271.
- Leung TM, Tipoe GL, Liong EC, Lau TY, Fung ML et al. (2008) Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis. *Int J Exp Pathol* 89: 241-250.
- Li C, Wei L, Mohanraj L, Cai Q, Anscher MS, Oh Y (2014) Multiple Mechanisms for Anti-Fibrotic Functions of Statins on Radiotherapy Induced Fibrosis. *Journal of Cancer Research Updates* 3: 73-80.
- Maina V, Sutti S, Locatelli I, Vidali M, Mombelo C, Bozzola C, Albano E (2012) Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. *Clin Sci* 11:545-53.
- Manucha W, Kurbán F, Mazzei L, Benardón MA, Bocanegra V, Tosi MR, et al. (2011) eNOS/Hsp70 interaction on rosuvastatin cytoprotective effect in neonatal obstructive nephropathy. *Eur J Pharmacol* 649: 487-49.
- Marcolin E, San-Miguel B, Vallejo D et al. (2012) Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Nutrition* 142:1821-1828.
- Marcolin E, Forgiarini LF, Rodrigues G, Tieppo J, et al. (2013) Quercetin decreases liver damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Basic and clinical pharmacology and toxicology* 112: 85-91.

- Morimoto RI (2011) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 91-99.
- Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González, Barrio JP, González-Gallego J (2007) Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 42: 222-230.
- Min AK, Kim MK, Kim HS, Seo HY, Lee KU, Kim JG, et al. (2012) Alpha-lipoic acid attenuates methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Life Sci.* 2012;90:200-205.
- Park HJ, Han JM, Kim HG, Choi MK, Lee JS, Lee HW, Son CG (2013) Chunggan_extract (CGX), methionine-and choline-deficient (MCD) diet-induced hepatosteatosis and oxidative stress in C57BL/6 mice. *Hum Exp Toxicol.* 2: 1258-69.
- Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15: 1118–1131.
- Plenz GA, Hofnagel O, Robenek H (2004) Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. *Circulation* 109:e7–e8.
- San-Miguel B, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ (2006) N-acetylcysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 11: 1945-1957.
- Schwabe RF, Brenner DA (2006) Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:583-9.
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 12: 654–666.
- Sorger PK (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell.* 65: 363–366.

- Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG (2007) Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis* 7:358–368.
- Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, et al. (2011) Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 50: 38-45.
- Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Alvarez M, et al. (2013) Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 55, 221-228.
- Vetelainen R, van Vliet A, van Gulik TM (2007) Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22: 1526-1533.
- Valatas V, Kolios G, Manousou P, Xidakis C, Notas G, et al. (2004) Secretion of inflammatory mediators by isolated rat Kupffer cells: the effect of octreotide *Regul Pept* 120: 215–225.
- Xin HG, Zhang BB, Wu ZQ, Hang XF, Xu WS, Ni W, et al. (2014) Treatment with baicalein attenuates methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Eur J Pharmacol.*
- Watts KL, Sampson EM, Schultz GS, Spiteri MA (2005) Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 290-300.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK (2008) Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *J Trends Mol Med.* 14: 37-44.
- Wang W, Zhao C, Zhou J, Zhen Z, Wang Y, et al. (2013) Simvastatin Ameliorates Liver Fibrosis via Mediating Nitric Oxide Synthase in Rats with Non-Alcoholic Steatohepatitis-Related Liver Fibrosis. *PLoS ONE* 8(10): e76538.

- Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 30:1212–1217.
- Westerheide SD, Raynes R, Powell C, Xue B, Uversky VN. (2012) HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder *Curr Protein Pept Sci* 13: 86-103.
- Yang QH, Xu YJ, Liu YZ, Liang YJ, Feng G, Zhang YP (2014) Effects of Chaihu-Shugan-San and Shen-Ling-Bai-Zhu-San on p38 MAPK Pathway in Kupffer Cells of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014: 671013.
- Yao ZM, Vance DE (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 263: 2998-3004.
- Yimin Y, Furumaki H, Matsuoka S, et al. (2012) A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. *Laboratory Investigation* 92: 265–281.
- Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Tomeno W, et al. (2009) Influence of inducible nitric oxide synthase polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 39: 963-971.
- Younoszai Y, Li Z, Stepanova, Erario M Cable R, Younossi ZM (2014) Statin use is not associated with liver related mortality. *Annals of Hepatology* 13: 84-90, 2014.

LEGENDS TABLES AND FIGURES

Table 1 Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on body weight, serum transaminase activity and liver TBARS concentration in C57BL/6 mice.

****P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

***P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4.

**P < .001 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

#P < .05 NASH+SIM 4 versus NASH+V

& P < .01 NASH+SIM 4 versus NASH+V

\$ P < .01 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

Fig 1 Western blot (WB) analysis. a) Cytoplasmic hepatic tumor growth factor-beta (TGF- β) and β -actin antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation

****P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

**P < .001 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

Fig 2 Western blot (WB) analysis. a) Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and β -actin antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation

‡P < .01 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

****P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

Fig 3 Western blot (WB) analysis. a) Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with interleukin 12 (IL-12) and β -actin antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation

****P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

Fig 4 Western blot (WB) analysis. a) Cytoplasmic and nuclear fractions were analyzed by WB with heat-shock protein (HSP70) and heat shock factor 1 (HSF-1) and β -actin antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation

****P < .001 NASH+V versus CO+V, SIM 4, NASH+SIM 4

**P < .001 NASH+SIM 4 versus CO+V, SIM 4

Table 1 Effect of a MCD diet and treatment with simvastatin on body weight, serum transaminase activity and liver TBARS concentration in C57BL/6 mice.

	Body weight (g)	AST (mg\dl)	ALT (mg\dl)	TBARS (nmoles/mg prot)
CO+V	23.82±1.62	63.20±9.81	27.40±3.78	0.11±0.01
SIM 4	23.64±0.64	66.2±9.34	30.4±6.31	0.12±0.03
NASH+V	14.3±1.04 ***	351.6±39.67***	437.0±32.11***	0.54±0.10*****
NASH+SIM 4	14.5±0.83**	302.0±40.58**#	373.0±42.82**&	0.21±0.03 ^{\$}

CO+V: Control plus vehicle (n=5); SIM 4: Control plus simvastatin 4mg/kg (n=5); NASH+V: NASH plus vehicle (n=5); NASH+SIM 4: NASH plus simvastatin 4mg/kg (n=5)

Data appear as mean ± SD.

Figure 1

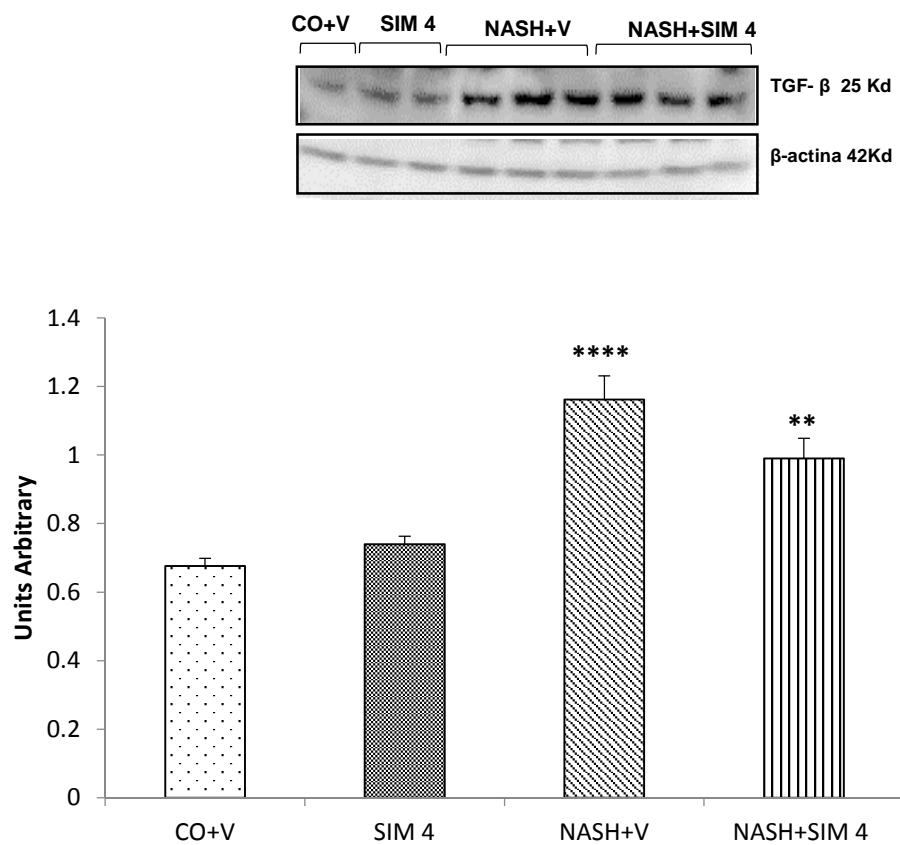


Figure 2

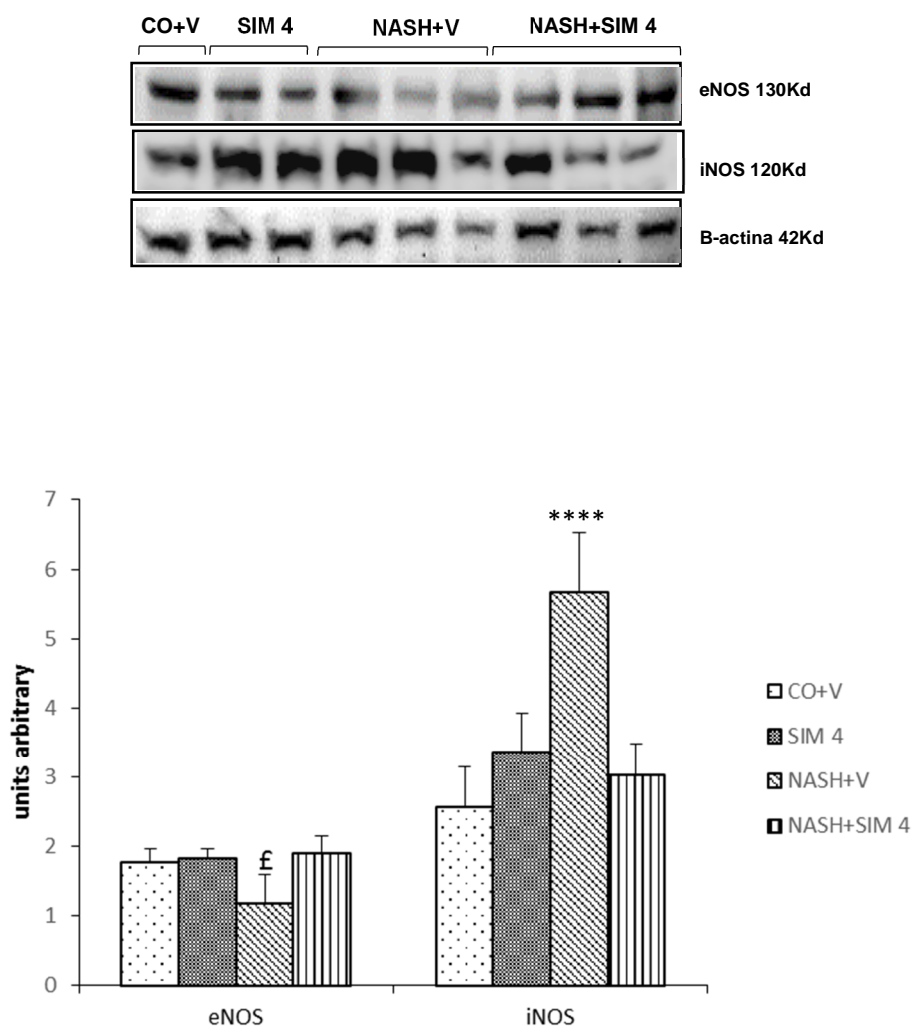


Figure 3

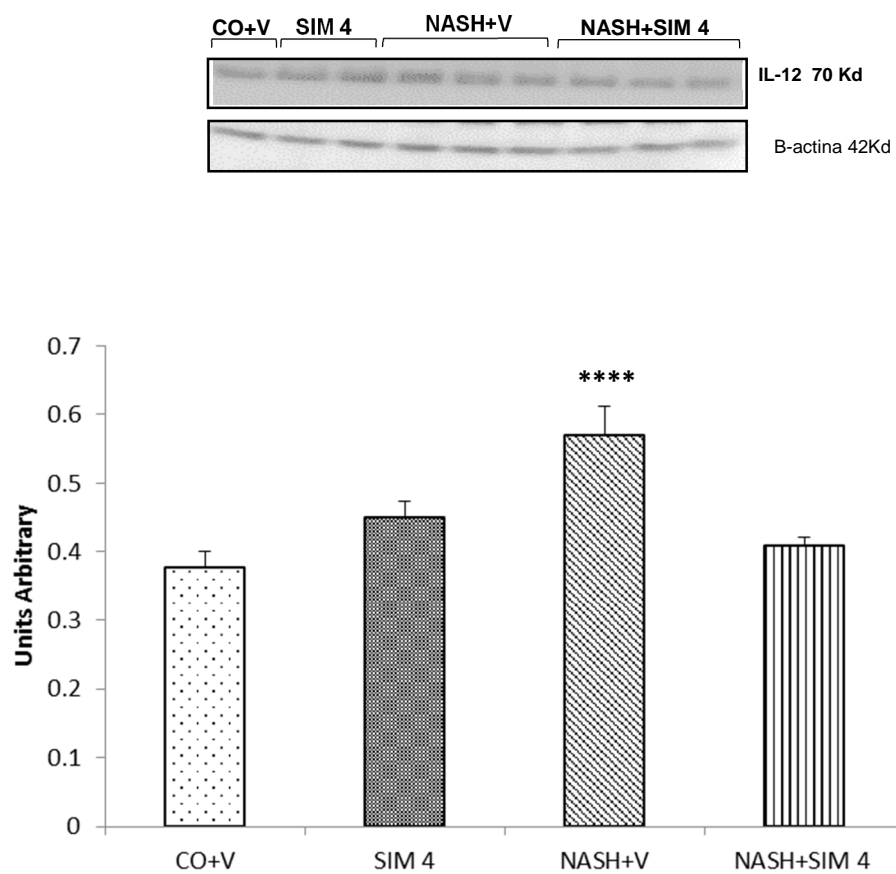
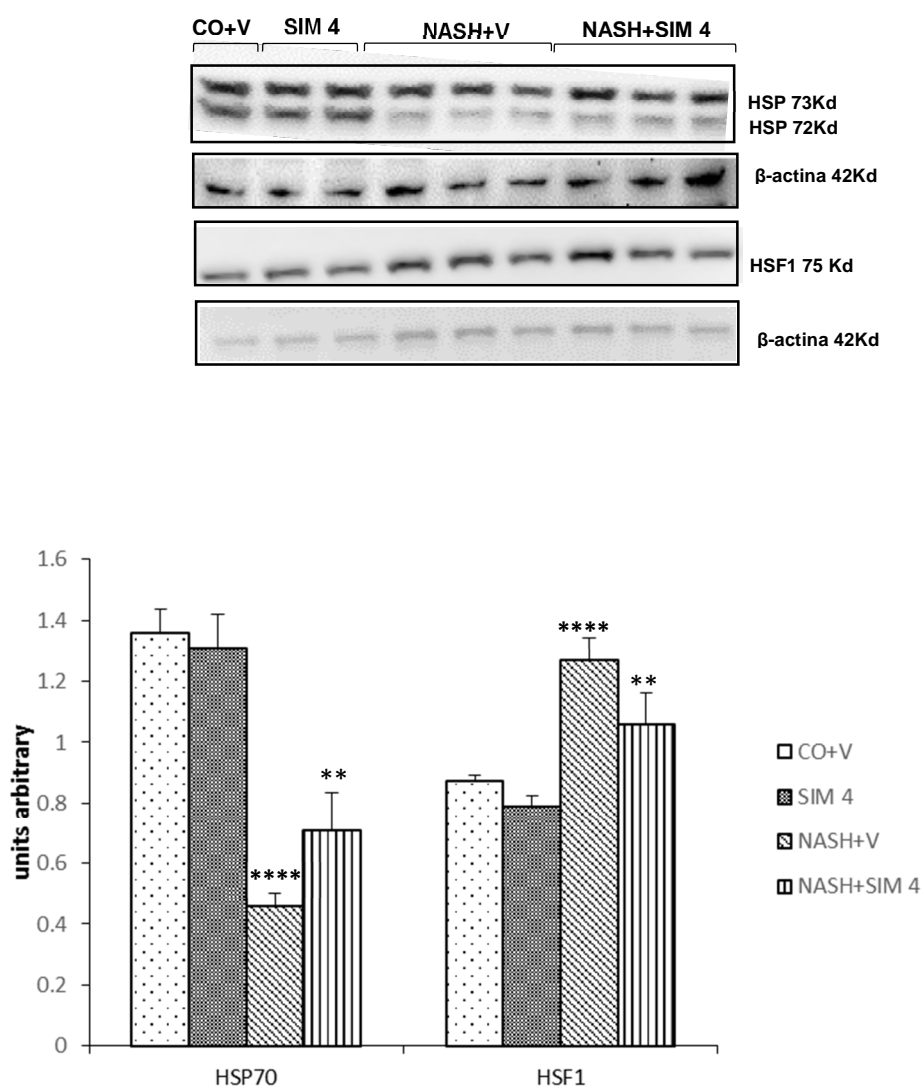


Figure 4



8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental de EHNA, pela indução de dieta MCD, é reconhecido como capaz de reproduzir as alterações histológicas observadas na EHNA em humanos. A disponibilidade de um modelo animal para estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da EHNA é de suma importância pois permite o melhor entendimento da fisiopatologia da doença. As terapias atualmente utilizadas não se mostram eficazes para o tratamento da EHNA, razão pela qual o uso de modelos experimentais é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas

8.1 Conclusões

Artigo I

- diminuiu os níveis séricos das enzimas que avaliam a integridade hepática AST e ALT.
- diminuiu os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos.
- diminuiu o colesterol e triglicerídeos hepático.
- diminuiu a balonização hepática evidenciado na microscopia.
- a dose empregada não foi capaz de induzir dano ao DNA.
- diminuiu a lipoperoxidação.
- restabeleceu os níveis das enzimas antioxidantes.
- ativou a expressão do Nrf2, além de aumentar a expressão da enzima NQO1.
- reduziu a expressão das proteínas marcadoras do estresse do RE.

Artigo 2

- diminuiu os níveis séricos das enzimas que avaliam a integridade hepática AST e ALT.

- diminuiu a lipoperoxidação.

- reduziu a fibrose através da diminuição na expressão da citocina TGF- β .

- restaurou a função endotelial e diminuiu a expressão da iNOS.

- diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória IL-12.

- Diminuiu o dano celular

Devido às evidências apresentadas nos resultados deste trabalho, podemos ressaltar a eficiência deste modelo para o desenvolvimento da EHNA e sugerir que a sinvastatina possa ser uma possível nova indicação terapêutica.

8.2 Perspectivas Futuras

O prosseguimento dos estudos com a sinvastatina avaliando sua ação em outros modelos experimentais de EHNA e sua interação com diferentes marcadores inflamatórios e fibrogênicos poderá aproximar ainda mais as relações entre a bancada experimental e o leito hospital, desenvolvendo a translacionalidade.

ANEXOS

- Composição da dieta deficiente em metionina e colina

Ingredient:

Sucrose

Corn Starch

Corn Oil

Alphacel Non-Nutritive Bulk

AIN 76 Mineral Mix (composition below)

Calcium Phosphate Dibasic

Sodium Chloride

Potassium Citrate Monohydrate

Potassium Sulfate

Magnesium Oxide

Manganese Carbonate (43-48% Mn)

Ferric Citrate (16-17% Fe)

Zinc Carbonate (70% ZnO)

Cupric Carbonate (53-55% Cu)

Potassium Iodate

Sodium Selenite

Chromium Potassium Sulfate

Sucrose, finely powdered

Dicalcium Phosphate

L-Alanine

L-Arginine Hydrochloride

L-Asparagine Monohydrate

L-Aspartic Acid

L-Cystine

L-Glutamic Acid

Glycine

L-Histidine Hydrochloride

L-Isoleucine

L-Leucine

L-Lysine Hydrochloride

L-Phenylalanine

L-Proline

L-Serine

L-Threonine

L-Tryptophan

L-Tyrosine

L-Valine

DL-alpha-Tocopherol Acetate (250 u/gm)

Vitamin A Palmitate (250,000 u/gm)

Vitamin D3 (400,000 u/gm)

Ethoxyquin

Vitamin Mix

Biotin

D-Calcium Pantothenate

Inositol

Menadione

Niacin

p-Aminobenzoic Acid

Pyridoxine Hydrochloride

Riboflavin

Thiamine Hydrochloride

Vitamin B12 (0.1% trit.)

Ascorbic acid

Corn Starch

Methionine/Choline Control Diet Composition: This diet has the same formulation as the Methionine/Choline Deficient diet except we add 2 g/kg choline chloride and 3 g/kg DL-Methionine at the expense of sucrose

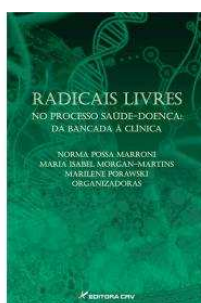
- Produção Bibliográfica durante a vigência do doutorado



- Bona S, Moreira AJ, Rodrigues G, da Silveira TR, Cerski CT, Marroni CA, Marroni NP. Diethylnitrosamine induced cirrhosis in wistar rats: an Experimental feasibility study **2014. Artigo submetido em 2014.**

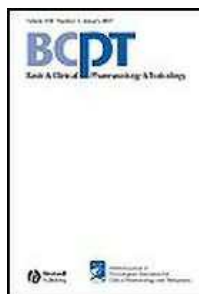


- Moreira AJ, Rodrigues G, Bona S, Cerski CT, Marroni CA, Mauriz JL, González-Gallego, Marroni NP, Oxidative Stress and Cell Damage in a Model of Precancerous Lesions and Advanced Hepatocellular Carcinoma in Rats. **Artigo submetido em 2014**



- Marcolin E, Tieppo J, Rodrigues G, Marroni CA, Marroni NP. Esteato-Hepatite não alcoólica induzida por dieta deficiente de metionina e colina (MCD). In: Norma Possa Marroni, Maria Isabel Morgan Martins, Marilene Porawski. (Orgs.). RADICAIS LIVRES NO PROCESSO SAÚDE-DOENÇA: da bancada à clínica. 1 ed. Curitiba – PR: CRV, 2013, v.1, p. 81-88.

- Rodrigues G, Di Nasi FC, Nunes ML, Silveira KC, Porawski M, Marroni NP. Diabetes Mellitus. In: Norma Possa Marroni, Maria Isabel Morgan Martins, Marilene Porawski. (Orgs.). RADICAIS LIVRES NO PROCESSO SAÚDE-DOENÇA: da bancada à clínica. 1 ed. Curitiba – PR: CRV, 2013, v.1, p. 101-108.



- Marcolin E, Forgiarini LF, Rodrigues G, Tieppo J, Borghetti GS, Bassani VL, Picada JN, Marroni NP. Quercetin decreases liver damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 112(6) 2013.



- Ludwig L, Valiati VH, Palazzo RP, Jardim LB, da Rosa DP, Bona S, Rodrigues G, Marroni NP, Prá D, Maluf SW. Chromosome instability and oxidative stress markers in patients with ataxia telangiectasia and their parents Biomed Res Int. 2013; 2013.

Journal of Biomedicine and Biotechnology

- Rodrigues GR, Di Naso FC, Porawski M, Marcolin E, Kretzmann NA, Ferraz Ade B, Richter MF, Marroni CA, Marroni NP. Treatment with aqueous extract from Croton cajucara Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012.



- Di Naso FC, Rodrigues G, Simões Dias A, Porawski M, Fillmann H, Marroni NP. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes. J Diabetes Complications. 26(5) 2012.



- De Oliveira NC, Sarmiento MS, Nunes EA, Porto CM, Rosa DP, Bona SR, Rodrigues G, Marroni NP, Pereira P, Picada JN, Ferraz AB, Thiesen FV, Da Silva J. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. Food and Chemical Toxicology 50 (5) 2012.



- Grezzana Filho TJM, Mendonça TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NAP, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning. Analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 26 (3) 2011.



- Fillmann H, Tieppo J, Kretzmann NA, Rodrigues G, Picada JN, Panés J, Marroni NP. Superoxide dismutase Ameliorates the Bowel Alterations Induced by diabetes Mellitus – An Experimental Study. Free Radicals and Antioxidants. Vol. 1 (3) 2011.



- De David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, Gonzáles-Gallego J, Tuñon MJ, Marroni NP. Role of Quercetin in Preventing Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats. Toxicologic Pathology Vol. 39 (6) 2011.