



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Júlio César Fraulob Aquino

**Rosuvastatina, resistência à insulina, adiposidade, inflamação e
esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta
hiperlipídica**

Rio de Janeiro

2011

Júlio César Fraulob Aquino

Rosuvastatina, resistência à insulina, adiposidade, inflamação e esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A657 Aquino, Júlio César Fraulob.
Rosuvastatina, resistência à insulina, adiposidade, inflamação e esteatose
hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica/
Júlio César Fraulob Aquino.- 2011.
98 f.

Orientador : Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda..
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-
graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hiperglicemia - Teses. 2. Resistência à insulina- Teses. 3.
Obesidade- Teses. 4. Síndrome metabólica - Teses. 5.
Esteatose - Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório -
Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia
Roberto Alcântara Gomes. III. Título.
CDU 616.153.455.01

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.


Assinatura

Data

Júlio César Fraulob Aquino

**Rosuvastatina, resistência à insulina, adiposidade, inflamação e esteatose
hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Avaliada em 30 de dezembro de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a Dra. Glorimar Rosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Avany Fernandes Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

A minha amada esposa
À minha família
Aos meus amigos
E ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, excelente educação, sustento e estímulo para que eu conquistasse meus sonhos. Obrigado, pois sou o que sou porque fui muito bem educado. A minha irmã, Aline Mabel, por me fortalecer, pelas palavras de carinho e ânimo e por ser um exemplo na minha vida. Ao meu irmão Arino Jean, que mesmo distante me acompanhou e com suas lindas palavras me estimulou nos meus momentos de maior aflição, sempre acreditou em mim e me motiva na busca de meus ideais. Amo vocês!!!

A minha linda e amada esposa, Andrea Priscilla, pela dedicação e apoio durante todos os momentos em que realizava este trabalho e durante as atividades de nossa vida. Obrigado pelas palavras de incentivo que me deu enquanto eu caminhava no deserto. Por crescer a cada dia ao meu lado e estimular o meu caminhar. Amo-te muito!

Aos meus tios, pelo amor, amparo e por acreditarem nos meus sonhos, além do estímulo ao estudo e muitos momentos de alegria e incentivo que me proporcionaram. Devo muito a vocês!

A minha amiga Ana Rosa, amiga do peito, que me dá forças, abre as portas, me anima, puxa e caminha junto comigo firme nesta jornada.

Ao meu grande amigo Geraldo e irmão do peito, por sua amizade, pelas palavras de incentivo, repreensão e ensino. Pelos momentos de conversa, aconselhamento e por me ajudar a pensar na vida de forma mais séria. Por sempre me estimular acabar o quanto antes o doutorado!

Ao amigo Rodrigo Neto, pelas alegrias de dividirmos as contas, ir ao supermercado e por excelentes momentos de risadas e por ser uma pessoa tranquila de viver.

A minha amiga gaúcha Eliete, sempre amiga, paciente, que me incentivou sempre na realização dos experimentos. Por suas excelentes palavras de animo! Obrigado por poder contar com você.

A Vanessa Mello e Bianca Gregório, pela amizade e carinho demonstrados e auxílios em diversos momentos deste projeto.

Ao amigo Victor Motta, agora mestrando, pelo carinho e atenção. Por ser prestativo e sempre tão solícito.

Aos meus amigos de tarefas de projeto, Leonardo Mendonça e Cláudia Mansano, que proporcionaram muitas noites mal-dormidas e ótimos resultados.

A minha amiga Sandra Barbosa, que a todo o momento me acompanhou, estimulou, repreendeu e compartilhou comigo de alegrias e angústias, frustrações e conquistas.

Aos técnicos e amigos Angélica Figueiredo e William Lannes, pelos cortes e auxílio técnico, além de bons momentos de descontração.

À Thatiany de Souza Marinho pela amizade e por tantos momentos de alegria e de trabalho juntos. Pelo cuidado que tem com os amigos e por muitos momentos de arrumação.

A Prof^a Dr^a Márcia Barbosa Águila, que abriu as portas à iniciação científica e me deu oportunidade de poder aprofundar os meus conhecimentos.

Ao Prof^o Dr^o Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por servir de exemplo como professor, pela orientação do meu mestrado, acreditar na minha capacidade e me orientar no meu trabalho de doutorado, por me repreender em diversos momentos e pelos muitos ensinamentos. Além de dar a oportunidade de concretizar mais uma das etapas de minha vida.

Ao meu professor Aramuru, que ainda jovem me fez pensar, desenvolver o pensamento crítico, agradeço a ele meu fascínio pela matemática e física.

A minha professora Jupira, que ainda na antiga 8^a série me ensinou a ler biografias de pensadores como Galileu-Galilei, John Locke e Nicolau Copérnico e com isso que me fizeram sonhar com ciência.

Aos meus amigos do ECO, por ouvirem e compartilharem comigo meus muitos momentos e pelas palavras de animo, importantes para a realização desse projeto.

Aos membros da família LMMC, que fizeram ou que fazem parte deste corpo: Isabele Bringhenti, Thiago Torres Alessandra Pinheiro, Antônio Ludjero, Diana de Freitas Moraes, Nayara Peixoto, Jéssica Texeira, Marcela Anjos, Fernanda Ornelas, Thereza Bargut, D'angelo Magliano, Débora Silva, Ana Volpato, Fernanda Amorim, Mariana Catta-Preta, Aline Schultz, Liliane, Francielle, André, Flávia, Tatiane Faria, Caroline Fernandes, Karla Pires, Lyana Parente e Daniele Bezerra que a todo o momento auxiliam e de forma alegre me apoiaram em todo meu trabalho, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste e muitas vezes me aturaram.

Enfim, a todos aqueles do grupo LMMC, é um grande prazer fazer parte desta equipe! É muito bom compartilhar das minhas alegrias com vocês! Vocês sempre farão parte da minha vida!

Às agências de fomento (CAPES, FAPERJ e CNPQ) pelo suporte financeiro deste trabalho.

E não vos conformeis com este século, mas transformai-vos pela renovação da vossa mente, para que experimenteis qual seja a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.

Romanos 12:2

RESUMO

AQUINO, Júlio César Fraulob. *Rosuvastatina, resistência à insulina, adiposidade, inflamação e esteatose hepática em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica*. 2011. 98f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) em 2011 - Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da rosuvastatina (ST) e darosiglitazona sobre a resistência à insulina (RI), morfologia do fígado e do tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HF). O tratamento com rosuvastatina resultou em uma acentuada melhoria na sensibilidade à insulina caracterizada pela melhor depuração da glicose durante o teste de tolerância à insulina e uma redução do índice HOMA-IR em 70% ($P = 0,0008$). O grupo tratado com rosuvastatina apresentou redução no ganho massa corporal (-8%, $P < 0,01$) e menor depósito de gordura visceral (-60%, $P < 0,01$) em comparação com o grupo HF não tratado. Em comparação com camundongos HF, animais do grupo HF+ST reduziram significativamente a massa hepática e a esteatose hepática (-6%; $P < 0,05$ e -21; $P < 0,01$, respectivamente). O grupo HF+ST, reduziu os níveis de triglicerídeos hepáticos em 58% comparado com o grupo HF ($P < 0,01$). Além disso, a expressão de SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis) foi reduzido em 50% no fígado dos animais HF + ST ($P < 0,01$) em comparação com o grupo HF. Os níveis de resistina foram menores no grupo HF + ST comparado com o grupo HF (44% a menos, $P < 0,01$). Em conclusão, demonstramos que camundongos alimentados com dieta HF tratados com rosuvastatina melhoram a sensibilidade à insulina, com redução da esteatose hepática. Além disso, ST reduziu o ganho de massa corporal, melhorou os níveis circulantes de colesterol e triglicerídeo plasmático, com menor conteúdo de hepático de triglicerídeo, que foi concomitante com menor resistina e aumento da adiponectina.

Palavras-chave: Rosuvastatina. Tiazolidinediona. Obesidade. NAFLD. SREBP-1c. Resistência à insulín. Camundongo.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effects of rosuvastatin (ST) and rosiglitazone on insulin resistance (IR) and liver and adipose tissue morphologies in mice fed a high-fat (HF) diet. Our data show that treatment with rosuvastatin resulted in a marked improvement in insulin sensitivity characterised by enhanced glucose clearance during insulin tolerance and a decrease in the HOMA-IR index level by 70% ($P=0.0008$). The group of mice treated with rosuvastatin exhibited reduced body mass gain (-8%; $P<0.01$) and visceral fat pad thickness (-60%; $P<0.01$) compared with the untreated HF group. In comparison with HF mice, HF+ST mice showed a significant reduction in hepatomegaly and liver steatosis (-6%; $P<0.05$ and -21%; $P<0.01$, respectively). In HF+ST mice, the hepatic triglyceride levels were reduced by 58% compared with the HF group ($P<0.01$). In addition, the expression of SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) was decreased by 50% in the livers of HF+ST mice ($P<0.01$) compared with the HF mice. The levels of resistin were lower in the HF+ST group compared with the HF group (44% less, $P<0.01$). In conclusion, we demonstrated that rosuvastatin-treated mice fed HF has been improving in insulin sensitivity, with decreased steatosis found in HF mice. Furthermore, ST reduced body mass gain, improved the circulating levels of plasma cholesterol and triglycerides and reduced hepatic triglycerides, which was concomitant with lower resistin and increased total adiponectin.

Keywords: Rosuvastatin. Thiazolidinediones. Obesity. NAFLD. SREBP-1c. Insulin resistance. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos sítios primários de resistência à insulina.....	20
Figura 2 - Vias de sinalização intracelular da insulina.....	23
Figura 3 - Vias de sinalização da insulina no fígado.....	24
Figura 4 - Ação dos fatores lipogênicos na resistência à insulina.....	26
Figura 5 - Representação esquemática do modelo “two hit” na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica	28
Figura 6 - Genes PPAR-alvo no metabolismo de ácidos graxos.....	30
Figura 7 - Metabolismo de ácidos graxos e adiposidade.....	32
Figura 8 - Evolução de massa corporal.....	54
Figura 9 - Vista ventro abdominal do camundongo dissecado mostrando os depósitos de gordura.....	56
Figura 10 - Curva do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI).....	62
Figura 11 - Massa do fígado.....	63
Figura 12 - Densidade de volume de esteatose hepática.....	65
Figura 13 - Fotomicrografias da morfologia do fígado.....	65
Figura 14 - Fotomicrografias da Imunomarcagem para SREBP-1c no fígado após tratamento.....	66
Figura 15 - Densidade ótica integral das bandas de western blotting para SREBP-1c.....	67
Figura 16 - Densidade ótica integral das bandas de western blotting para PPAR- α	68
Figura 17 - Razão entre a Densidade ótica integral das bandas de western blotting de SREBP-1c e PPAR- α	69
Figura 18 - Densidade ótica integral das bandas de western blotting para GLUT2.....	70
Figura 19 - Densidade ótica integral das bandas de western blotting para PPAR- γ	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizadas para a síndrome metabólica.....	33
Tabela 2 -	Novo critério para Diagnóstico Clínico da Síndrome Metabólica.....	35
Tabela 3 -	Composição e conteúdo energético das dietas padrão (Co) e hiperlipídica (HF).....	45
Tabela 4 -	Composição corporal e metabolismo energético.....	55
Tabela 5 -	Metabolismo das adipocitocinas.....	58
Tabela 6 -	Metabolismo de carboidratos, perfil lipídico e análise bioquímica.....	60
Tabela 7 -	Massa e metabolismo hepático.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ADE	Alta densidade energética
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AG	Ácido graxo
AGL	Ácidos graxos livres
AGS	Ácidos graxos saturados
AGT	Ácidos graxos trans
AHA/NHLBI	American Heart Association /National Heart, Lung and Blood Institute
Akt	Proteína quinase B
ALT	Alanina amino transferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
AUC	Área sob a curva
ATPIII	National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
CC	Circunferência da cintura
AST	Aspartato amino transferase
CT	Colesterol total
DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNL	lipogênese de novo
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
EMA	European Medicines Agency
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase alcalina
FAS	Ácido graxo sintetase
FFA	Ácidos graxos livres
FDA	Food and Drug Administration do Estados Unidos
GLUT	Transportador de glicose
GKS-3	Glicogênio sintase quinase-3
GPJ	Glicose plasmática de jejum
H	Homen
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Alta densidade energética
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima-A redutase
HOMA-IR	Homeostasis model assessment-insulin resistance
IDF	International Diabetes Federation (IDF)
IL-6	Interleucina 6

IMC	Índice de massa corporal
IR	Receptor de insulina
IRS	substratos do receptor de insulina
JNK	Quinase c-Jun-NH2-terminal
LDL	Lipoproteína de baixadensidade
M	Mulher
MC	Massa corporal
MEC	Matriz extracelular
mTOR	Rapamicina em mamíferos
NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
Ob-R	Receptor da leptina
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistêmica
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PPAR- α	Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR – peroxissome proliferator-activated receptor)
PPAR- γ	Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPAR – peroxissome proliferator -activated receptor)
PTPase	Proteínas tirosina fosfatases
RXR	Ácido retinóico
SC	Controle
SM	Síndrome metabólica
SREBP-1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TG	Triglicerídeo
TGF	Tampão gelatina-fosfato
TITI	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TZDs	Tiazolidinedionas
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Lipoproteína de muito baixadensidade
WHO	World Health Organization
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Resistência à insulina	19
1.2	Alterações hepáticas na resistência à insulina	23
1.3	Obesidade e inflamação	31
1.4	Síndrome metabólica	33
1.5	Rosuvastatina	38
1.6	Rosiglitazona	40
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	Animais e dieta	44
3.2	Massa corporal e Ingestão alimentar	46
3.3	Teste oral de tolerância à glicose – TOTG	46
3.4	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina – TITI	47
3.5	Eutanásia e obtenção do material para análise bioquímica	47
3.6	Radioimunoensaio para insulina e HOMA-IR	48
3.7	Adipocitocinas	48
3.8	Morfometria dos adipócitos	49
3.9	Análise bioquímica	49
3.10	Estereologia e Triglicerídeo hepático	49
3.11	Imunohistoquímica	51
3.12	Western Blot	51
3.13	Análise estatística	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Ingestão de energia, massa corporal e depósitos de gordura	53
4.2	Adipocitocinas	57
4.3	Análise bioquímica	59
4.4	Metabolismo de Carboidratos	59
4.5	TOTG e TITI	61
4.6	Fígado: Biometria, Esteatose e Triglicerídeo	63
4.7	Imunohistoquímica	66
4.8	Western Blot	67
5	DISCUSSÃO	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed a high-fat diet	96
	APÊNDICE B – A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies	97
	ANEXO – Comitê de ética em pesquisa	98

INTRODUÇÃO

A Obesidade já é considerada pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como uma epidemia global, com mais de um bilhão de adultos com excesso de peso, onde pelo menos trezentos milhões deles são clinicamente obesos (WHO, 2003). A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, resultando da interação de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais. O ambiente moderno é um potente estímulo para a obesidade e a diminuição dos níveis de atividade física e o aumento da ingestão calórica são os fatores determinantes ambientais mais fortes (Samaras *et al.*, 1999). No Brasil e em diversas populações do mundo tem aumentado significativamente a prevalência da obesidade (Coutinho *et al.*, 2008), associada ao aumento da obesidade abdominal, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia, descritas como fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV).

As DCV são as maiores causas de morte no mundo e lideram os orçamentos destinados a programas de saúde. No ano de 2002, foram responsáveis por quase 17 milhões de mortes, o que representou cerca de 30% do número total de óbitos no mundo. Mais de 1/3 destas mortes ocorrem de forma prematura em adultos de meia idade (Walt, 2004).

Este fato coincide com o aumento da prevalência global de obesidade, concomitante ao declínio da mortalidade por doenças infectocontagiosas, fenômeno designado por transição nutricional (Popkin, 2001). Pode-se afirmar que as tendências de transição nutricional ocorrida neste século em diferentes países do mundo convergem para uma dieta mais rica em gorduras (particularmente as de origem animal), açúcares e alimentos refinados, reduzida em carboidratos complexos e fibras, atualmente conhecida como “dieta ocidental” (Monteiro *et al.*, 1995; Monteiro *et al.*, 2011). Aliando esse fator com o declínio progressivo da atividade física dos indivíduos, percebem-se alterações concomitantes na composição corporal, principalmente o aumento da gordura (Samaras *et al.*, 1999).

A maioria dos indivíduos com sobrepeso e obesidade desenvolve esteatose hepática, o que corresponde ao acúmulo de lipídios (principalmente triacilglicerol) no fígado levando a uma condição conhecida como doença não alcoólica do fígado

gorduroso (NAFLD), esteatose hepática (Aguila *et al.*, 2010). Atualmente, estima-se que sua prevalência é cerca de 70% nos indivíduos obesos e diabéticos, enquanto que a prevalência da esteatose hepática é de 15% a 25% na população em geral (Begrache *et al.*, 2006). Além disso, o acúmulo de gordura visceral tem um papel na patogênese e prognóstico da NAFLD (Eguchi *et al.*, 2011), uma vez que está associada a um perfil de risco cardiovascular aumentado (Targher *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011).

NAFLD representa a consequência metabólica hepática relativa à supernutrição e uma ingestão errônea na composição da dieta (Liu *et al.*, 2010). A proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) desempenha um papel único na expressão de genes envolvidos na síntese de triglicerídeos hepáticos e pode também desempenhar um papel importante na patogênese da NAFLD. Embora os mecanismos precisos que levam à ativação do promotor SREBP-1c ainda não tenham sido esclarecidos, é certo que SREBP-1c é fortemente induzido por ácidos graxos saturados (AGS), possivelmente através de sua capacidade de promover a inflamação (Shimano, 2009). Síntese de ácidos graxos é aumentada na NAFLD com o acúmulo de ácidos graxos. A expressão de SREBP-1c é significativamente maior na NAFLD e quase cinco vezes maior do que em indivíduos controles saudáveis (Kohjima *et al.*, 2008).

Dietas com alto teor de gordura (HF) representam a maior causa de incidência da obesidade no mundo. A perda de peso induzida por dieta e modificações no estilo de vida, inclusive com exercícios físicos e mudanças qualitativas na dieta, tem mostrado ter efeitos benéficos sobre a NAFLD e podem ajudar no manejo da resistência à insulina (Marques *et al.*, 2010). No entanto, estudos tem mostrado que apenas uma pequena porcentagem dos pacientes com NAFLD podem implementar essas medidas de forma eficiente (Ratziu *et al.*, 2008).

Portanto, a correção da resistência à insulina é um alvo terapêutico relevante nesta condição, e o tratamento farmacológico parece ser nestes casos uma abordagem eficaz (Souza-Mello *et al.*, 2010). Neste estudo, avaliamos o efeito da rosuvastatina em monoterapia na melhora da resistência à insulina da esteatose hepática associada à rosiglitazona como parâmetro comparativo por representar um dos principais agentes sensibilizadores de insulina.

Um dos avanços mais significativos na terapia medicamentosa para as DCV durante o século XX foi o desenvolvimento da classe de drogas estatina. As

estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das dislipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana. A Rosuvastatina (ST) é uma estatina, um inibidor competitivo da 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase, cujo efeito resultante é o bloqueio da conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol, desta forma, atua limitando a ação da enzima HMG-CoA, que está associada com a biossíntese de colesterol.

A Rosuvastatina também age aumentando a expressão dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) na superfície das células. A Rosuvastatina tem maior eficácia na redução do colesterol LDL em comparação com outras estatinas, em suas doses comparáveis (Vijan e Hayward, 2004), e se mostrou um agente hipolipemiante altamente eficaz em pacientes com síndrome metabólica (Ginsberg, 2006), desta forma, reduzindo o risco de doença cardiovascular (Deedwania *et al.*, 2006) e, além de reduzir potentemente os níveis de colesterol, exerce uma variedade de efeitos pleiotrópicos que podem resultar em muitos benefícios clínicos.

Os efeitos pleiotrópicos incluem melhoria e restabelecimento da função endotelial e redução na pressão arterial sistólica (PAS) (Neto-Ferreira *et al.*, 2011), relaxamento do músculo sanguíneo (Mukai *et al.*, 2003), atenuação da hipertrofia do cardiomiócito (Nishikimi *et al.*, 2002; Davignon, 2004; Bezerra *et al.*, 2008), atenuação da perda de cardiomiócito e glomérulos (Bezerra e Mandarim-de-Lacerda, 2005), inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos (Vincent *et al.*, 2002), diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6, liberada pelo tecido adiposo (van Harmelen *et al.*, 2003) e aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e inflamação, e diminuição da resposta trombogênica (Liao, 2005; Liao e Laufs, 2005).

Além destes, as estatinas possuem efeitos extra-hepáticos benéficos no sistema imune, sistema nervoso central e ósseo. Muitos destes efeitos pleiotrópicos são mediados pela inibição de isoprenóides, os quais servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular (Campo e Carvalho, 2007; Tousoulis *et al.*, 2007).

Estudos recentes têm mostrado que as estatinas podem ter efeitos adicionais, com melhora da sensibilidade à insulina hepática em modelos animais (Naples *et al.*,

2008) e humanos (Rizos *et al.*, 2010); e apesar dessas constatações, o uso das estatinas como uma estratégia no tratamento da resistência à insulina e da esteatose hepática têm sido pouco investigada.

A Rosiglitazona (GZ) é uma classe de tiazolidinedionas (TZDs), que são sensibilizadores de insulina, medicamentos usados para o tratamento de diabetes tipo 2 (DM2). No nível molecular, as TZDs são ligantes altamente específicos do receptor ativado por proliferadores do peroxissomal gama (PPAR- γ) (Staels e Fruchart, 2005; Kawai *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que o uso de rosiglitazona em pacientes com diabetes tipo 2 mal controlados com NAFLD resultou em uma melhora na função hepática. Um importante estudo (FLIRT) sugeriu que as TZDs poderiam ser úteis para o tratamento de esteatohepatite não alcoólica (NASH) em pacientes com sobrepeso ou obesos, onde se verificou melhora da esteatose e redução das aminotransferases, sem, contudo haver uma melhora significativa nos parâmetros histológicos de lesão, levando, contudo a um aumento de peso (Ratziu *et al.*, 2008).

Apesar do interesse potencial de TZDs para o tratamento da NAFLD, é importante notar que a lesão do fígado tem sido relatada em alguns pacientes tratados com rosiglitazona (Henriksen e Ring-Larsen, 2008). Curiosamente, a rosiglitazona exacerba lesões hepáticas pré-existentes em diferentes de modelos de roedores com diabetes tipo 2 e NAFLD (Pan *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006; Garcia-Ruiz *et al.*, 2007). De fato, o tratamento com rosiglitazona está associado a um maior aumento na incidência de insuficiência cardíaca grave (Nissen e Wolski, 2007; Mannucci *et al.*, 2010).

Recentemente, a European Medicines Agency(EMA) recomendou a suspensão da droga rosiglitazona e a Food and Drug Administration do Estados Unidos (FDA) recomendou um pacote de medidas para determinar a segurança da rosiglitazona e para restringir ainda mais a sua utilização (Cohen, 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro de medicamentos contendo o princípio-ativo rosiglitazona em todas suas apresentações farmacêuticas e associações, por considerar que os riscos superam os benefícios. A medida foi publicada na edição Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de Setembro de 2010, página 31, do Diário Oficial da União. Portanto, toda orientação de uso em longo prazo necessitaria, por questões de segurança, de ser acompanhado.

No presente estudo, foi utilizado um modelo de camundongo da linhagem C57BL/6 alimentado com dieta hiperlipídica, que mimetiza a dieta das populações ocidentais, e que manifesta rapidamente a resistência à insulina e os sinais e sintomas associados (Fraulob *et al.*, 2010), para avaliar a resposta fisiológica e molecular do fígado e do tecido adiposo após o tratamento com rosuvastatina isoladamente em comparação com a rosiglitazona e da rosuvastatina em combinação com a rosiglitazona, com foco na resistência à insulina, adiposidade e na esteatose hepática.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Resistência à insulina

Por definição, resistência à insulina é um estado de reduzida resposta a níveis normais de insulina. Ela aparece como um fator central e determinante da associação da obesidade com o DM2, configurando a SM (Reaven, 1988).

A insulina é o maior hormônio anabólico, cuja ação é importante para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos e homeostase da glicose. Ela é secretada pelas células beta-pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glicose e aminoácidos circulantes, o que ocorre principalmente no período pós-prandial (Chen *et al.*, 1987). A insulina normalmente controla a homeostase da glicose em diferentes sítios, reduzindo a produção hepática de glicose (promovendo menores taxas de glicogenólise e gliconeogênese), estimulando a captação de glicose nos tecidos periféricos, aumentando a síntese hepática de lipídios e suprimindo a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (DeFronzo, 1988; Petersen e Shulman, 2006a). Defeitos na secreção e ação da insulina conduzem a múltiplas alterações metabólicas tais como hiperglicemia, aumento da produção hepática de glicose e dislipidemia (Muio e Newgard, 2008).

A resistência à insulina parece ser uma característica pancreática precoce. A literatura documenta que esse estado de resistência à insulina pode ter início anos antes do diagnóstico de DM2 (Harris e Eastman, 2000). A hipertrofia das ilhotas e hipersecreção de insulina surge na tentativa de compensar o estado de resistência e promover valores normais de glicemia num primeiro momento. Entretanto, esse trabalho exaustivo promove deterioração progressiva das ilhotas de maneira que 50% da função das ilhotas pancreáticas já estão perdidas no momento do diagnóstico de hiperglicemia, momento onde a intolerância oral à glicose já está instalada (Taylor, 1999; Reifsnyder e Leiter, 2002; Yoon *et al.*, 2003).

Atualmente há uma tendência de uma visão lipocêntrica da resistência à insulina (Robertson, 2009). Nesse contexto, o aumento dos depósitos de tecido adiposo e das taxas lipólise, atrelados ao sobrepeso, fazem com que os AGL circulantes sejam desviados e armazenados em órgãos sensíveis à insulina, tais

como o fígado, o pâncreas e o músculo esquelético (Unger e Orci, 2000). Esse acúmulo ectópico de lipídios está envolvido na gênese da resistência à insulina e no comprometimento da função das células beta-pancreáticas, efeito conhecido como lipotoxicidade (Savage *et al.*, 2005). A figura 1 ilustra o acúmulo de tecido adiposo visceral e deposição de gordura ectópica e seus efeitos sobre os sítios primários de resistência à insulina.

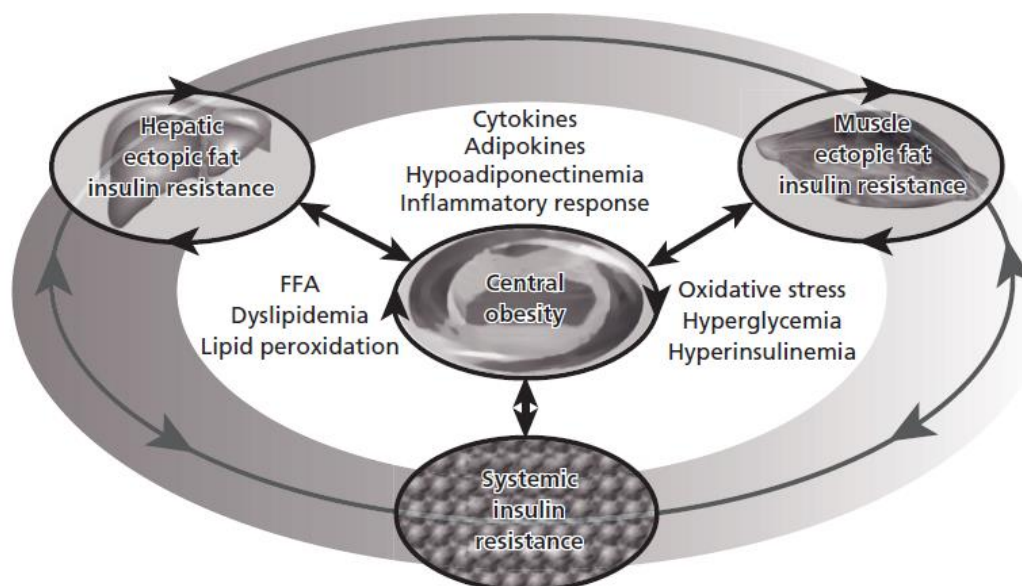


Figura 1 - Representação esquemática dos sítios primários de resistência à insulina. O ganho de peso provoca acúmulo de tecido adiposo e deposição de gordura ectópica no fígado e músculo esquelético. No curso da obesidade, especialmente quando a gordura é acumulada centralmente, vários graus de resistência à insulina desenvolvem-se gradualmente em todos esses tecidos, devido a um perfil adverso de circulação de adipocinas e ácidos graxos livres (FFA), em combinação com as respostas ao estresse oxidativo e pro-inflamatórias. Em resposta, a secreção de insulina pelas células β é estimulada, causando hiperinsulinemia crônica que, por sua vez, favorece o ganho de peso adicional. Assim, a obesidade promove diminuição da sensibilidade à insulina combinada com aumento da secreção de insulina e vice-versa, formando ciclos viciosos co-existentes que de forma constante progridem dentro de cada tecido resistente à insulina e respondem com feedback uns aos outros ao nível sistêmico. Neste estado de obesidade relacionada com a resistência à insulina pode levar ao diabetes tipo 2 e esteatose hepática em indivíduos geneticamente predispostos. (Adaptado de Kopelman *et al.*, 2010)

Já está descrito na literatura que os ácidos graxos competem com a glicose como substrato para oxidação tanto no músculo cardíaco quanto em músculo liso de roedores, o que levou à especulação de que a oxidação de ácidos graxos é responsável pela resistência à insulina nos casos de sobrepeso (Randle *et al.*,

1963). Contudo, recentemente, estudos ajudaram a elucidar que níveis elevados de ácidos graxos livres (AGL) circulantes reduzem os níveis intramusculares de glicose-6-fosfato. Essa observação sugere que o aumento das concentrações plasmáticas de AGL produz resistência à insulina por meio da inibição do transporte de glicose ou da atividade da hexoquinase II, sendo a redução da produção de glicogênio muscular e da oxidação da glicose apenas eventos secundários. Devido ao fato de que a glicose intracelular é um metabólito intermediário entre o transporte da glicose e a ação da hexoquinase II, a redução da glicose intracelular prediz um defeito no transporte desta, ao passo que o seu acúmulo intracelular sugere um defeito da enzima hexoquinase II. Estudos *In vivo* revelam que na resistência à insulina induzida por ácidos graxos em humanos ocorre uma redução das concentrações intracelulares de glicose na presença de níveis elevados de AGL na circulação, confirmando um defeito no transporte da glicose (Roden *et al.*, 1996; Dresner *et al.*, 1999).

Em condições fisiológicas normais, a insulina estimula a translocação do transportador de glicose (GLUT) a partir de um reservatório intracelular para a membrana plasmática. A translocação do GLUT é um processo complexo que envolve a liberação do GLUT do seu reservatório intracelular, trânsito pelo meio intracelular, reconhecimento e fusão com a membrana plasmática. Por conseguinte, existem vários passos que podem estar comprometidos nos estados de resistência à insulina (Petersen e Shulman, 2006b; Sesti, 2006).

A insulina desempenha suas ações nos órgãos alvos por meio da fosforilação de um receptor transmembrana, o receptor de insulina (IR). A ligação da insulina à subunidade alfa (extracelular) do IR ativa resíduos de tirosina presentes na subunidade beta (transmembrana) do mesmo, conduzindo à auto-fosforilação do receptor. Isso resulta na ativação da tirosino-quinase intrínseca, a qual catalisa a fosforilação de tirosinas presentes em substratos do receptor de insulina (IRS), tais como o IRS-1 e IRS-2. Estes substratos interagem com a PI3K, a qual estimula o principal efetor: a proteína quinase B (Akt), uma quinase serina/treonina que estimula a captação de glicose por meio da translocação do GLUT para a membrana plasmática (Saltiel e Kahn, 2001; Sesti *et al.*, 2001; Sesti, 2006). Diferentes tecidos expressam diferentes subtipos de GLUT, o tecido adiposo e a musculatura esquelética expressam o GLUT4, ao passo que o fígado e o pâncreas expressam o GLUT2 (Thorens *et al.*, 1990).

Na vigência de resistência à insulina pode haver defeitos no IR, manifestados por um prejuízo na interação da insulina com o seu receptor ou por uma redução do número de receptores disponíveis. Contudo, são mais frequentes defeitos na sinalização da insulina a nível pós-receptor (Sesti *et al.*, 2001; Petersen e Shulman, 2006b). Nesse contexto, a fosforilação inadequada do IR após a ligação da insulina na sua subunidade extracelular foi detectada na musculatura esquelética de indivíduos obesos com ou sem DM2 e em indivíduos não obesos e portadores de DM2 (Goodyear *et al.*, 1995), no tecido adiposo de indivíduos obesos portadores ou não de DM2 (Sinha *et al.*, 1987) e no fígado de pacientes obesos e portadores de DM2 (Caro *et al.*, 1986). Em conjunto, essas observações permitem inferir que defeitos na fosforilação do IR e do IRS-1 e na ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) desempenham papel crucial no desenvolvimento da resistência à insulina (Sesti *et al.*, 2001; Sesti, 2006).

Outros defeitos na sinalização da insulina descritos em indivíduos obesos portadores de DM2 englobam concentrações reduzidas de GLUT-4 nos adipócitos (Shepherd e Kahn, 1999). Porém na musculatura esquelética, as concentrações de GLUT-4 são normais, sendo relatado um prejuízo na função de distribuição desse transportador de glicose (Zierath *et al.*, 1996). O prejuízo na captação de glicose pode também ser resultante do aumento de proteínas que inibem a sinalização da insulina. As proteínas tirosina fosfatases (PTPases) agem como reguladores negativos da cascata de sinalização da insulina. Estudos recentes mostram que uma das principais funções da PTPase 1B (PTP 1B) é suprimir a ação da insulina. Indivíduos obesos apresentam aumento da expressão de PTP 1B no tecido adiposo e musculatura esquelética. Todavia, uma perda ponderal de 10% resulta em aumento da sensibilidade à insulina concomitante à redução da atividade e níveis de PTP 1B (Ahmad *et al.*, 1997a; Ahmad *et al.*, 1997b).

O perfil pró-inflamatório do indivíduo obeso também apresenta correlação com a patogenia da resistência à insulina. O tecido adiposo em excesso secreta citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). O aumento dessas adipocinas vem sendo relacionado à alteração na fosforilação do IRS-1, caracterizado pelo aumento da fosforilação dos resíduos de serina em proteínas chaves como Akt, alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e quinase c-Jun-NH₂-terminal (JNK), comprometendo a sinalização adequada da insulina e translocação do GLUT para a membrana

(Hotamisligil *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 2001). A figura 2 ilustra a cascata de sinalização da insulina na musculatura esquelética.

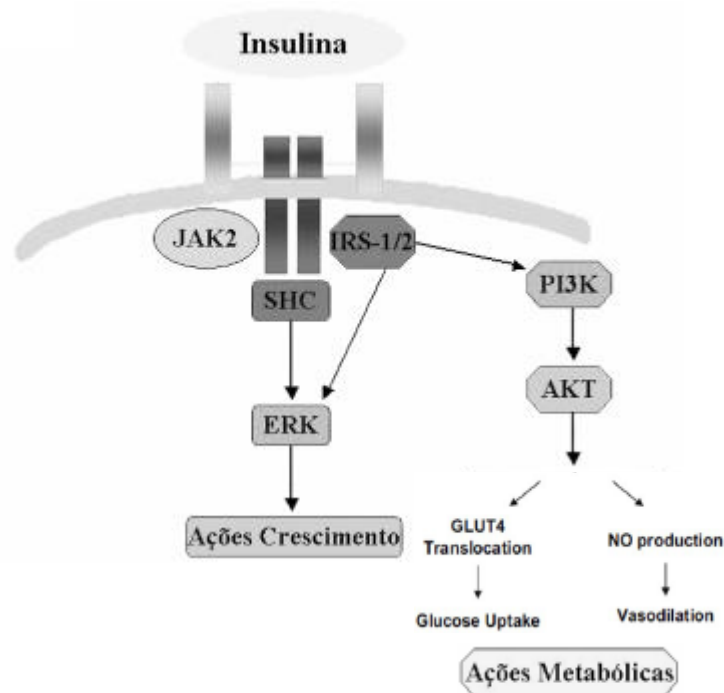


Figura 2 – Vias de sinalização intracelular da insulina. A ligação da insulina ao seu receptor transmembrana leva à fosforilação do IRS-1. Esse passo é crucial para ativar a PI3K, a qual ativa a Akt, agente efetor do estímulo da translocação do GLUT4 para a membrana a fim de permitir a internalização celular da glicose. Abreviações: IRS-1, substrato do receptor de insulina 1; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; Akt, proteína quinase B; GLUT4, transportador de glicose 4. Adaptado de Carvalho-Filho, 2007. (Adaptado de Carvalho-Filho *et al.*, 2007)

1.2 Alterações hepáticas na resistência à insulina

A insulina inibe a produção hepática de glicose por meio do bloqueio da gliconeogênese e da glicogenólise e estimula o acúmulo do glicogênio, ativando a glicogênese. Esta ocorre devido a um aumento da atividade da enzima glicogênio-sintetase, secundário à inativação da enzima glicogênio sintase quinase-3 (GKS-3) pela Akt (Cross *et al.*, 1995). A insulina também ativa a proteína fosfatase 1, via PI3K, a qual desfosforila a glicogênio-sintetase (Brady *et al.*, 1997).

A transcrição de alguns genes pode ser influenciada pela insulina. Nesse sentido, a via de sinalização da Akt inibe a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave para a gliconeogênese. O aumento da transcrição de genes codificadores de enzimas glicolíticas como a glicoquinase e a piruvato quinase é também atribuído à ação da insulina (Pilkis e Granner, 1992; Sutherland *et al.*, 1996). A figura 3 ilustra a influência da insulina sobre o metabolismo hepático.

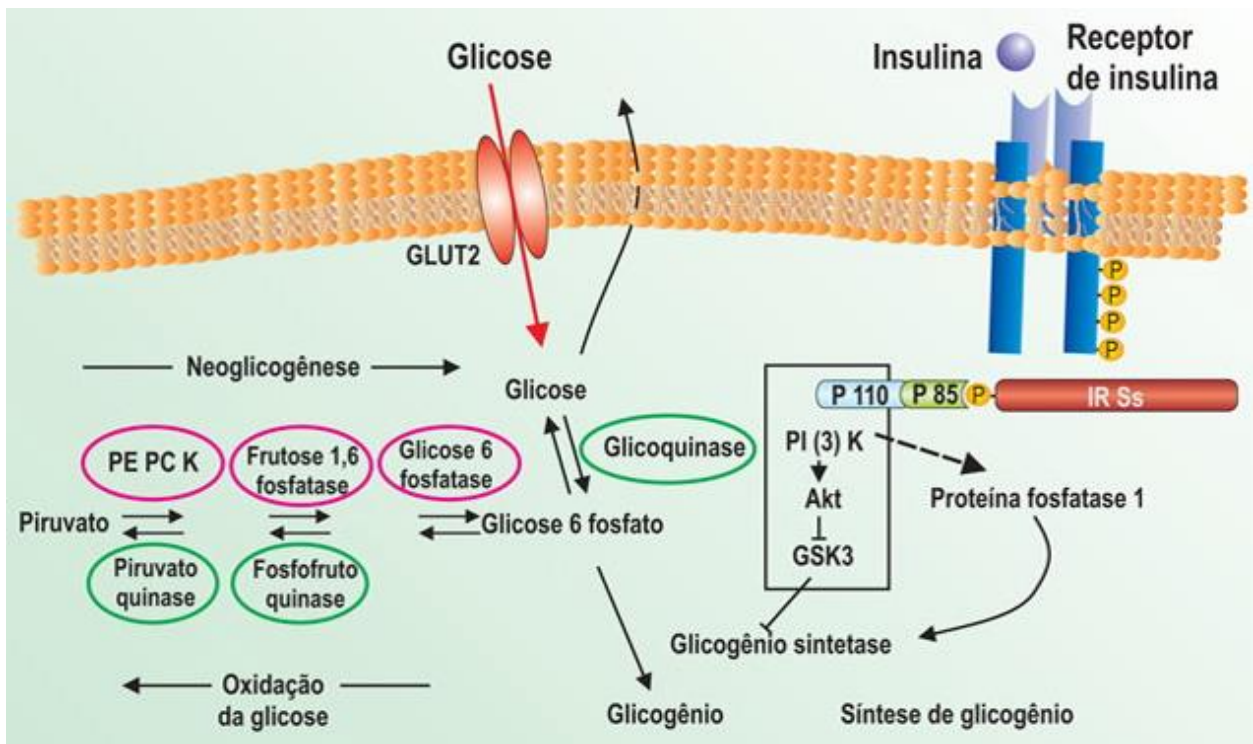


Figura 3 – Vias de sinalização da insulina no fígado. A insulina estimula a utilização e armazenamento de glicose como glicogênio e inibe a síntese dessa hexose e sua liberação. A insulina estimula a expressão de genes da via glicolítica enquanto inibe a codificação daqueles que codificam enzimas da via da gliconeogênese. A insulina também estimula a síntese de glicogênio através da inibição da GSK3 e proteína fosfatase 1. Abreviações: GSK3, glicogênio sintase quinase 3. (Adaptado de Cross *et al.*, 1995).

A insulina também exerce importante papel na inibição da lipólise no tecido adiposo. Contudo, na vigência de resistência à insulina essa propriedade é perdida. Logo, o excesso de tecido adiposo é acompanhado por incremento das taxas de lipólise e maior disponibilidade de AGL na veia porta (Despres e Lemieux, 2006). Em situações normais, o excesso de AGL é canalizado para a mitocôndria onde ocorre a beta oxidação. Contudo, nos estados de resistência à insulina, a carga excessiva de AGL é direcionada à lipogênese (esterificação), conduzindo ao acúmulo de

triglicerídeos no interior do fígado, órgão que não é destinado a essa função, configurando a condição patológica conhecida como esteatose hepática (Holness *et al.*, 1999; Festi *et al.*, 2004; Duvnjak *et al.*, 2007). A maioria dos indivíduos com sobrepeso e obesidade associado à resistência à insulina desenvolvem esteatose hepática, o que corresponde ao acúmulo de lipídios (principalmente triacilglicerol) no fígado levando a uma condição conhecida como doença não alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD) (esteatose hepática) (Aguila *et al.*, 2010).

As evidências indicam que a esteatose hepática da resistência à insulina é causada pelo acúmulo de SREBP-1c, que está elevado em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. A homeostase de lipídios em células de vertebrados é regulada por uma família de fatores de transcrição designada SREBP-1c - proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis. SREBPs ativam diretamente a expressão de aproximadamente 30 genes que se dedicam à síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicérides e fosfolipídios, assim como a de NADPH, um co-fator necessário para a síntese dessas moléculas (Horton *et al.*, 1998; Foretz *et al.*, 1999; Shimomura *et al.*, 1999b; Shimomura *et al.*, 1999c). No fígado, três SREBPs regulam a produção de lipídios. SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, entre eles a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA em malonil-CoA, e a ácido graxo-sintetase (FAS), que converte a malonil-CoA em palmitato. Uma ação clássica da insulina é estimular a síntese de ácidos graxos no fígado em períodos de excesso de carboidratos. Várias evidências sugerem que esses efeitos da insulina são mediados pelo aumento de SREBP-1c (Shimomura *et al.*, 1999a; Shimomura *et al.*, 1999b; Shimomura *et al.*, 1999c). *In vivo*, a quantidade total de SREBP-1c no fígado é reduzida pelo jejum, que suprime a secreção de insulina, e aumenta com a realimentação (Horton *et al.*, 1998; Shimomura *et al.*, 1999c). De forma semelhante, os níveis de mRNA de SREBP-1c diminuem em animais com diabetes induzido por estreptozotocina e aumentam após tratamento com insulina. A hiperexpressão de SREBP-1c no fígado de animais transgênicos previne a redução do mRNA das enzimas lipogênicas. Muitos indivíduos com obesidade e resistência à insulina apresentam esteatose hepática. Alguns estudos associam a esteatose hepática resultante da resistência à insulina com o aumento dos níveis de SREBP-1 em resposta à hiperinsulinemia. Em indivíduos sensíveis à insulina, ela estimula a produção de SREBP-1c em períodos de pósprandiais, quando há excesso de

carboidrato circulante e níveis maiores de insulinemia (Brown e Goldstein, 1997; Shimomura *et al.*, 1999a; Shimomura *et al.*, 1999c; Sakakura *et al.*, 2001). De maneira semelhante, os níveis de SREBP-1c estão elevados no fígado de camundongos *ob/ob* (Shimomura *et al.*, 1999a; Shimomura *et al.*, 1999c). Apesar da presença de resistência à insulina nos tecidos periféricos, a insulina continua a ativar a transcrição de SREBP-1c no fígado desses camundongos. Logo, a expressão de SREBP-1c é proporcional à insulinemia, sendo maior nos casos de resistência à insulina, os quais vêm sendo associados ao aumento da lipogênese hepática, além da redução da oxidação mitocondrial de ácidos graxos (Shimomura *et al.*, 2000; Smith e Adams, 2011). Figura 4 esquematiza a ação dos fatores lipogênicos.

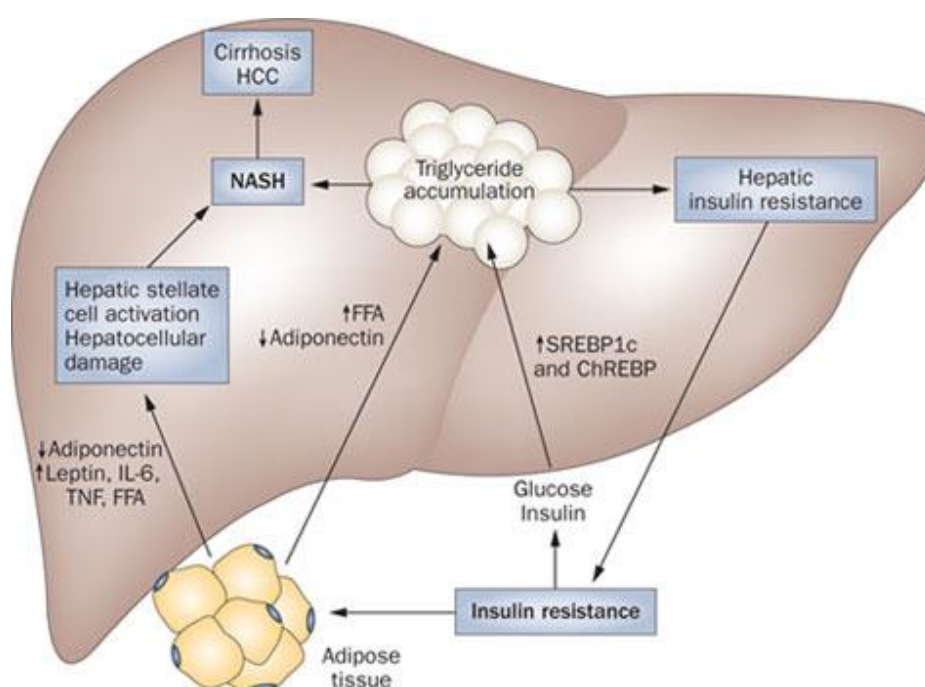


Figura 4 - Resistência à insulina promove o acúmulo de triglicerídeos hepáticos pelo aumentando na lipólise do adiposo periférico e influxo de ácidos graxos livres, assim como super-regulando os níveis hepáticos de fatores de transcrição lipogênicos SREBP-1c e ChREBP. Abreviações: ChREBP, proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos; FFA, ácidos graxos livres; IL-6, interleucina 6; HCC, carcinoma hepatocelular; NASH, esteatohepatite não alcoólica, SREBP-1c, proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis; TNF, tumor fator de necrose. (Adaptado de Smith e Adams, 2011)

A NAFLD é a doença hepática mais comum nos países ocidentais (Erickson, 2009). Ela vem sendo apontada como a manifestação hepática da SM e já acomete 25% da população dos países onde a obesidade é mais prevalente (Marchesini *et*

al., 2001). Embora inicialmente tenha característica benigna, ela representa o ponto de partida de doenças mais graves como NASH, cirrose hepática e hepatocarcinoma (Brunt, 1999; Brunt *et al.*, 1999; Brunt, 2005). O padrão ouro para seu diagnóstico é o acometimento de mais de 5-10% do peso do tecido ou como percentual de hepatócitos afetados em biópsia hepática. Seus principais fatores de risco incluem obesidade central e resistência à insulina, além do DM, dislipidemia e utilização de determinados fármacos. A esteatose hepática ocorre sempre que o *input* de ácidos graxos (captação, síntese ou esterificação) excede o *output* (oxidação e secreção de lipoproteína de muito baixadensidade(VLDL)), resultando no acúmulo principalmente de triglicerídeos nos hepatócitos (Brunt, 1999; Neuschwander-Tetri e Caldwell, 2003; Festi *et al.*, 2004; Abdelmalek e Diehl, 2007b, a).

Dentre as causas mais frequentes do aumento do *input* figuram: o consumo de dietas hiperlipídicas, o aumento da lipogênese *de novo* e da esterificação de ácidos graxos (AG). Por outro lado, a redução do *output* ocorre por meio da menor secreção de VLDL e/ou da beta-oxidação. As repercussões da esteatose são sistêmicas, visto que a oxidação de AG nas mitocôndrias de hepatócitos provém uma gama de substratos energéticos essenciais ao metabolismo e esta via metabólica se encontra reduzida na esteatose (Koteish e Diehl, 2001; Diehl, 2005).

Os fatores que provocam a progressão da NAFLD, esteatose isolada, para a NASH, caracterizada pela presença de fibrose e necrose, continuam obscuros (Kirsch *et al.*, 2003). Baseado na teoria dos “*Two Hits*”, o “*first hit*” consiste no desenvolvimento da esteatose hepática, a qual uma vez estabelecida promove adaptações de rotas sinalizadoras celulares frente aos níveis elevados de estresse oxidativo. Dessa forma a célula sobrevive nesse meio adverso, mas fica mais propensa ao desenvolvimento do “*second hit*” que a partir de apoptose e/ou necrose aliada à inflamação conduz à NASH (Brunt, 1999; Festi *et al.*, 2004). A Figura 5 esquematiza a teoria dos two hits para a esteatohepatite.

O desenvolvimento da esteatose, *first hit*, encontra-se intimamente relacionado à obesidade centrípeta à medida que 76% dos portadores são obesos (Marceau *et al.*, 1999; Akbar e Kawther, 2006). A literatura postula que o tecido adiposo abdominal é a maior fonte de AGL.

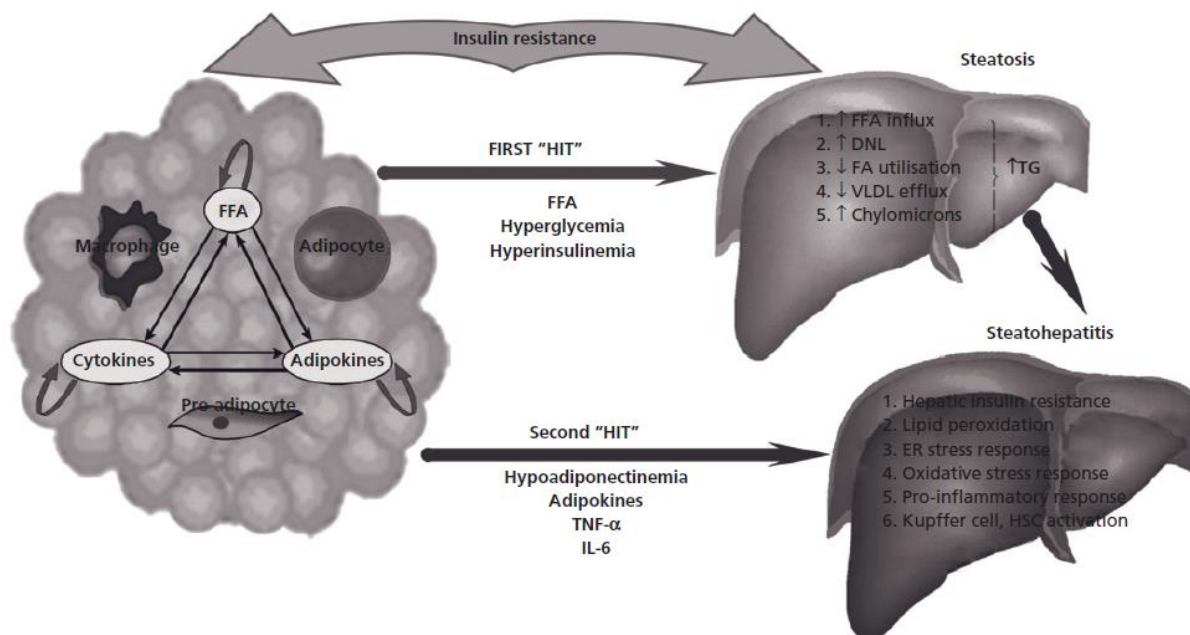


Figura 5 – Representação esquemática do modelo *two hit* na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). O "*first hit*" induz esteatose e aumenta a suscetibilidade do fígado para o "*second hit*". A esteatose hepática resultada principalmente de um amplificado influxo de ácidos graxos livres (FFA), devido à um aumento da liberação de ácidos graxos livres dos depósitos de gordura da insulino resistentes (reduzida inibição da lipólise pela insulina). No fígado este influxo de FFA é combinada com o aumento da lipogênese de novo (DNL), prejudicada oxidação de ácidos graxos e suprimido efluxo VLDL, que são causados pela subjacente hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência hepática à insulina. A Gordura na dieta também pode contribuir para o conteúdo hepático de triglicerídeos totais (TG) através da entrega de quilomícrons a partir do intestino.

O *second hit* causa a progressão para esteatohepatite (NASH) e é promovido pelos níveis plasmáticos elevados de TNF- α e IL-6, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia. As adipocinas circulantes na obesidade, em combinação com a esteatose, induzem resistência hepática à insulina, a peroxidação lipídica hepática, as respostas ao estresse oxidativo e do estresse ao retículo endoplasmático (ER) e ativação de células de Kupffer e células estreladas hepáticas (HSC). A ativação de células estreladas já caracteriza a NASH. O resultado final é o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório crônico no fígado com esteatose hepática caracterizada por lesão celular, inflamação, apoptose e fibrose (Adaptado de Kopelman *et al.*, 2010).

Animais com sobrepeso induzido por dieta HF cursam com resistência à insulina, a qual possui efeitos distintos sobre o tecido adiposo e hepático. No primeiro, ela estimula a lipólise, com conseqüente aumento do transporte de AGL para o fígado pela veia porta e aumento do *input* de AG. Por outro lado, no fígado, a hiperinsulinemia inibe a β -oxidação, reduzindo o *output*. Ambas as ações favorecem o acúmulo de gordura nos hepatócitos, condição que promove resistência hepática à ação da insulina. A perda da capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose agrava a resistência global à insulina e exacerba a manifestação dos componentes da SM como obesidade, dislipidemia e HAS (Festi *et al.*, 2004; Adams e Angulo, 2005; Brunt, 2005).

A alta ingestão de AGS pode atuar como o *second hit*, acelerando a progressão da NAFLD para NASH à medida que promove aumento da injúria hepática, ativação de células estreladas, ativação da caspase 3 (efetora) e fibrose periportal (Carmiel-Haggai *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). A NASH cursa com alteração da composição da matriz extracelular (MEC) caracterizada pelo aumento da síntese em detrimento à degradação desta. As células estreladas são as mais importantes no tecido hepático para a síntese de MEC e são ativadas por dietas HF, espécies reativas de oxigênio, triglicerídeos, VLDL e citocinas inflamatórias. Com o desenvolvimento da cirrose, por exemplo, há aumento do número de células estreladas no fígado, as quais na presença de injúria hepática apresentam ativação de mecanismos pré e pós-transcricionais que promovem a deposição de colágeno tipo I e fibrose (Lu *et al.*, 1998; Lieber *et al.*, 2004; Carmiel-Haggai *et al.*, 2005).

A literatura documenta outras evidências de que a qualidade do lipídio da dieta é primordial à patogênese da esteatose hepática. Dietas ricas em ácidos graxos trans (AGT) promovem o acúmulo de triglicerídeos principalmente no fígado de roedores após 8 semanas de administração, ao passo que dieta similar com o predomínio de AGS eleva preferencialmente os triglicerídeos plasmáticos no mesmo modelo. Uma explicação plausível é a oxidação mais lenta dos isômeros trans em comparação aos isômeros cis de ácidos graxos, o que juntamente com anormalidades do metabolismo lipídico impostas por dietas HF aumentam a relação AG esterificados/AG oxidados (Aguila *et al.*, 2003b; Colandré *et al.*, 2003). Além do aumento da ingestão energética, o elevado estresse oxidativo hepático encontra-se relacionado ao ganho ponderal, resistência à insulina e ao agravamento da SM em roedores alimentados com dietas HF, predispondo à esteatose hepática (Milagro *et al.*, 2006). Alterações funcionais e estruturais de mitocôndrias hepáticas, comprometendo a beta-oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias, aumento da peroxidação lipídica em peroxissomos e microssomos e o consequente aumento do estresse oxidativo já foram relatadas em animais portadores de esteatose microvesicular (Natarajan *et al.*, 2006). A redução das taxas de beta-oxidação favorece o acúmulo de ácidos graxos e a ocorrência de esteatose hepática, ao passo que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio favorece a progressão da NAFLD para NASH (Angulo e Lindor, 2001; Caldwell *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008).

Outro mecanismo proposto para progressão da NAFLD para NASH é o aumento da liberação de TNF- α pelo excesso de tecido adiposo visceral. Esta adipocina promove redução da expressão do PPAR- α , receptor nuclear que ativa a transcrição de genes implicados na formação de enzimas ligadas a oxidação lipídica. A redução da atividade do PPAR- α além de reduzir a oxidação lipídica, ativa a apoptose e aumenta o estresse oxidativo, ambos apontados como cruciais para a progressão para a NASH (Bishop-Bailey, 2000; Koteish e Diehl, 2001; Svegliati-Baroni *et al.*, 2006). A figura 6 ilustra as vias metabólicas regulada pelo PPAR- α nos hepatócitos.

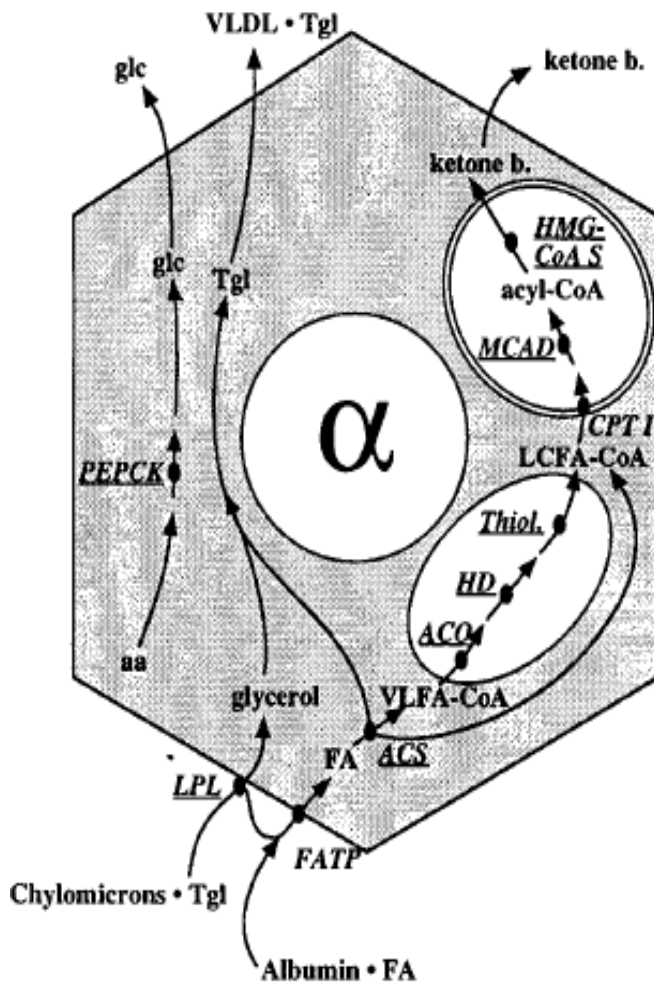


Figura 6 Genes PPAR-alvo no metabolismo de ácidos graxos. As vias metabólicas regulamentadas pelo PPAR- α nos hepatócitos estão resumidas. O rótulo α no interior dos núcleos indica o fato de que os hepatócitos expressam predominantemente PPAR- α . Genes até agora descritos como alvos PPAR direto são sublinhados. Por razões de clareza, o caminho lipogênico, a apolipoproteína e o citocromo P450 CYP foram omitidos nos hepatócitos. ACC, acetil-CoA carboxilase; aa, aminoácidos; CPT I, carnitina palmitoil transferase I; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; FA, ácidos graxos, FAS, sintase de ácido graxo; GDH, glicerol-fosfato desidrogenase; glc, glicose; b, cetona, corpos cetônicos; Tgl, triglicérides; VLDL, very-lipoproteína de baixa densidade; Além do núcleo celular (α), áreas brancas simbolizam os compartimentos peroxissomal (única linha) e mitocondrial (linha dupla). (Lemberger *et al.*, 1996)

Outra adipocina que sofre alteração na presença de obesidade e resistência à insulina é a adiponectina. A literatura documenta hipoadiponectinemia em estados de resistência à insulina, a qual se relaciona diretamente à redução da beta-oxidação (Jarrar *et al.*, 2008; Tasci *et al.*, 2008). O tratamento de camundongos

ob/ob com adiponectina aumenta a oxidação hepática de AGL, uma vez que o restabelecimento da adiponectinemia normal promove redução das concentrações de TNF- α por meio da inibição da expressão e secreção desta citocina inflamatória (Xu *et al.*, 2003; Polyzos *et al.*, 2009).

1.3 Obesidade e inflamação

A ligação entre obesidade e inflamação foi proposta pela primeira vez em mais de uma década atrás com a conclusão de que as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , estavam superexpressos na obesidade. Estudos posteriores demonstraram que os níveis plasmáticos de outros mediadores inflamatórios (IL-6) também são elevados. O tecido adiposo é capaz de expressar muitas destas moléculas pró-inflamatórias, com presença de infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco, demonstrando desta forma ser uma fonte potencial de produção de citocinas (Pittas *et al.*, 2004; Ritchie e Connell, 2007).

Atualmente tem-se como hipótese que o tecido adiposo venha a ser o maior órgão endócrino no corpo, sendo secretor de um grande número de substâncias biologicamente importantes denominadas adipocinas. As mais bem caracterizadas adipocinas são a adiponectina, leptina, TNF- α e a IL-6 (Hutley e Prins, 2005).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão elevada de gordura está associada com estresse oxidativo e ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB), um fator de transcrição pró-inflamatório (Mohanty *et al.*, 2002). É descrito que uma dieta rica em frutas e fibras, não estimula o processo de inflamação de forma significativa, quando comparado a uma dieta com elevado teor de gordura (Dandona *et al.*, 2005).

Desta forma, o estado pró-inflamatório da obesidade e da síndrome metabólica é originado pela excessiva ingestão calórica. Esse estado pró-inflamatório induz resistência à insulina, levando às manifestações clínicas e bioquímicas da síndrome metabólica (Dandona *et al.*, 2005). A Figura 7 ilustra as modificações no metabolismo de ácidos graxos e adiposidade em indivíduos magros e obesos.

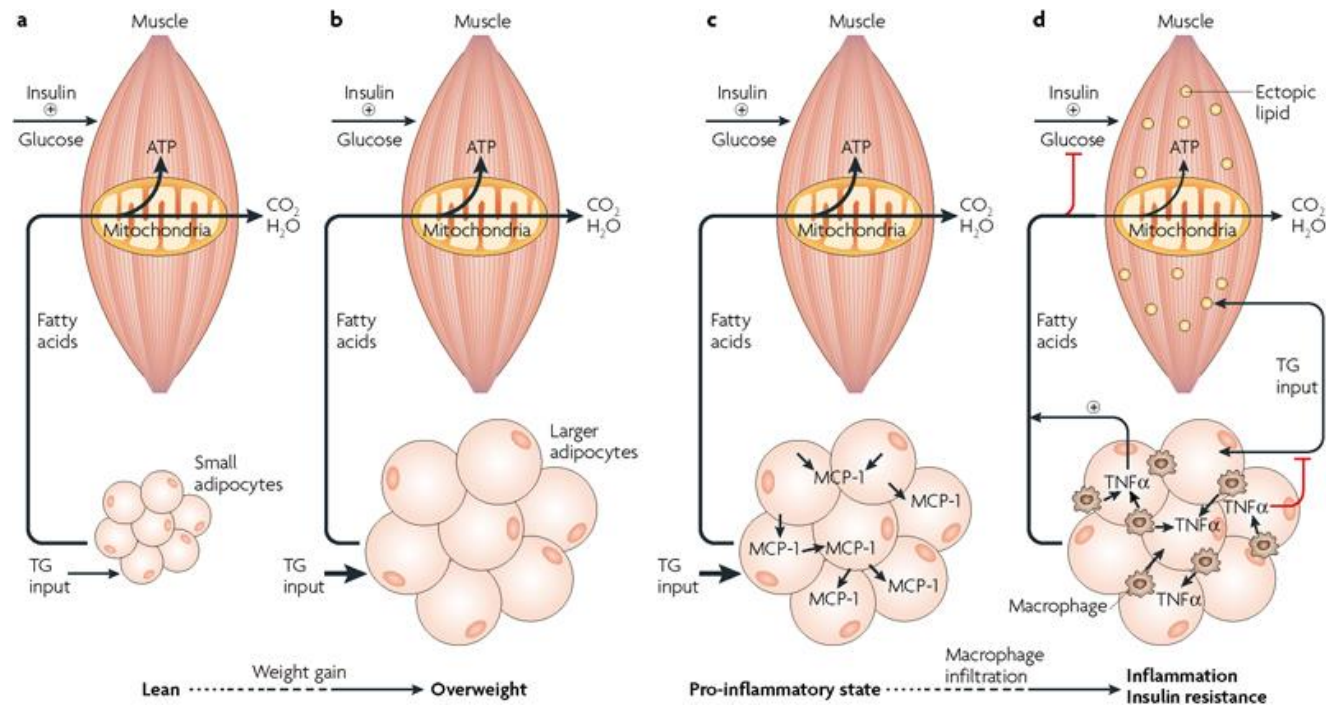


Figura 7 Metabolismo de ácidos graxos e adiposidade **a)** Em magros, adipócitos pequenos eficientemente armazenam ácidos graxos como triglicerídeos (entrada de TG, seta), que podem ser mobilizados e utilizados para gerar ATP através da via-oxidação mitocondrial no músculo durante os períodos de necessidade calórica. A captação de glicose estimulada por insulina nessas condições é normal. **b)** A ingestão calórica em excesso leva a uma sobrecarga metabólica, com aumento da entrada de TG e aumento dos adipócitos. No entanto, em indivíduos não diabéticos com sobrepeso, o armazenamento TG pelas células adiposas e a β -oxidação no músculo pode frequentemente ser mantida para prevenir a resistência à insulina. **c)** Na maior sobrecarga com TG, ocorre hipertrofia dos adipócitos e aumento da secreção de quimioatrativos por macrófagos, incluindo a secreção de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1; setas), que recruta os macrófagos adicionais. **d)** O recrutamento de macrófagos por sua vez resulta em um estado pró-inflamatório no tecido adiposo de obesos. Macrófagos infiltrados secretam grandes quantidades de fator de necrose tumoral- α (TNF), o que resulta em um estado inflamatório crônico, com deposição de TG prejudicada e aumento da lipólise (seta e sinal de mais). O excesso de TG circulante e de ácidos graxos livres resultam no acúmulo ativo de lipídios no músculo (pontos amarelos), interrompendo funções como fosforilação oxidativa mitocondrial e transporte de glicose insulino estimulada, desencadeando assim a resistência à insulina (Guilherme *et al.*, 2008).

1.4 Síndrome metabólica

Atualmente, diferentes conceitos para definição da síndrome metabólica, dos parâmetros clínicos para o rastreamento e dos valores de corte têm sido propostos por diferentes organizações (*World Health Organization (WHO)*, *The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*, *The National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)*, *The American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)*, *The International Diabetes Federation (IDF)* e *The American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI)*) para identificar os indivíduos com síndrome metabólica, estando às principais características utilizadas neste diagnóstico resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizadas para a síndrome metabólica (Ritchie e Connell, 2007).

WHO (1999)	EGIR (1999)	ATPIII (2001)	IDF (2005)
Diabetes, glicose jejum alterada, intolerância à glicose ou resistência à insulina (hiperinsulinemia definida pelo mecanismo do clamp euglicêmico), acrescido de dois ou mais dos fatores seguintes:	Resistência à insulina considerando os valores de insulina em jejum, além de dois ou mais dos seguintes fatores:	Três ou mais dos seguintes fatores:	Obesidade central (valores étnicos específicos), bem como quaisquer de duas dos seguintes fatores:
IMC >30 kg/m ² ou relação cintura/quadril >0.9 (H) ou >0.85 (M)	Obesidade central com CC ≥94 cm (H) ou ≥80 cm (M)	CC ≥102 cm (H) ou ≥88 cm (M)	TG >150 mg/dl ou sob tratamento específico
TG >150 mg/dl ou HDL-c <35 (H) ou <38 mg/dl (M)	TG >176 mg/dl ou HDL-c <38 mg/dl	TG >150 mg/dl	HDL-c <40 (H) ou <50 mg/dl (M) ou sob tratamento específico
PAS >130/90 mmHg	PAS ≥140/90 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥135/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥130/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva
Excreção de albumina >20µg/min	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥ 90 mg/dl ou diagnóstico prévio de diabetes tipo 2

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistêmica; H, homens; M, Mulher; GPJ, glicose plasmática de jejum; TG, triglicérideo; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; CC, circunferência da cintura.

Embora seja claro que *In vivo* a resistência à insulina é a alteração chave associada com o processo aterogênico, pró-trombótico e ao perfil inflamatório que tem sido chamado por alguns de "síndrome metabólica", por outros de "síndrome X" ou de "síndrome da resistência à insulina", é cada vez mais reconhecido que a forma mais prevalente da presente constelação de alterações metabólicas associadas à resistência a insulina é encontrada em pacientes com obesidade abdominal, especialmente com um excesso de tecido adiposo intra-abdominal ou de tecido adiposo visceral (Ritchie e Connell, 2007; Despres *et al.*, 2008).

Apesar das características comuns entre as definições, existem parâmetros específicos em que se diferem. A WHO e a EGIR exigem inicialmente classificações como a medição da resistência à insulina, que são parâmetros utilizados principalmente no campo da pesquisa, com o uso de mecanismos para a determinação da resistência à insulina como o teste oral de tolerância à glicose e o teste de hiperinsulinemia, com *clamp* euglicêmico. Os critérios da ATP III foram desenvolvidos para ser aplicado no ambulatório, entretanto, em contraste com outras definições, este não têm critérios de diagnóstico obrigatórios. Desta forma, foram utilizados como base para posterior elaboração de critérios do IDF e do AHA/NHLBI. A IDF tem a obesidade central como critério de classificação, enquanto que a AACE não tem definido parâmetros para este diagnóstico.

As recentes diretrizes para a síndrome metabólica da AHA/NHLBI reconhecem que um risco aumentado para doença cardiovascular e diabetes está associado a valores superiores aos limites de circunferência da cintura, de 94 cm nos homens e 80 cm nas mulheres, e identifica esses pontos de corte como opcional para os indivíduos ou populações com resistência à insulina.

Recentemente, as organizações reunidas (International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity) determinaram novos pontos de corte dos parâmetros clínicos que estão resumidas na tabela 2 (Alberti *et al.*, 2009).

Tabela 2. Novo critério para Diagnóstico Clínico da Síndrome Metabólica (Alberti *et al.*, 2009).

Medidas	Pontes de cortes
Circunferência de cintura aumentada	Definições específicos para cada população e país
Triglicerídeo elevado (tratamento com drogas para hipertrigliceridemia é um indicador alternativo)	≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)
HDL-C baixo (tratamento com drogas para HDL-C baixo é um indicador alternativo)	<40 mg/dL (1.0 mmol/L) homem; <50 mg/dL (1.3 mmol/L) Mulheres
HAS (tratamento com drogas anti-hipertensivas em pacientes com história de HAS)	Sistólica ≥ 130 and/or Diastólica ≥ 85 mm Hg
Glicose de jejum elevada (tratamento com drogas para hiperglicemia é um indicador alternativo)	≥ 100 mg/dL

* Recomenda-se que os pontos de corte IDF sejam usados para os não-europeus e que também os pontos de corte IDF ou AHA/NHLBI sejam usado para pessoas de origem europeia até que mais dados estejam disponíveis.

As drogas mais comumente usadas para triglicerídeo elevados e HDL-C reduzidos são os fibratos e o ácido nicotínico. Um paciente usando uma dessas drogas pode se presumir que tenha níveis altos de triglicerídeos ou HDL-C baixo. Uso de alta dose de ácidos graxos n-3 presume triglicerídeos elevados.

A maioria dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 terá a síndrome metabólica pelos critérios propostos.*

Em virtude da prevalência crescente de obesidade e das suas doenças associadas na população mundial e dos gastos públicos que o manejo dessas alterações metabólicas representa, a comunidade científica vem buscando modelos experimentais que mimetizem o fenótipo humano e sejam adequados para testar terapias potenciais para o controle da SM (Fraulob *et al.*, 2010). Devido ao fato de que em humanos fatores ambientais são fatores cruciais para o desenvolvimento dos caracteres da SM, a manipulação de dietas é a ferramenta mais utilizada para antecipar a manifestação destes em modelos animais (Thigpen *et al.*, 2004).

Essa padronização dos ingredientes utilizados no que se refere à quantidade e qualidade dos nutrientes foi possível pela publicação de um documento que estabeleceu o requerimento de macronutrientes e micronutrientes para roedores nas diferentes fases da vida. Inicialmente a AIN-76 determinou as formulações adequadas para roedores mantidos em laboratório (Bieri, 1979). Contudo, alguns

detalhes passaram a ser questionados no final da década de 80 e em 1993 foi publicada a AIN-93, com algumas correções e que está em voga até os dias atuais (Reeves, 1989; Reeves *et al.*, 1993a; Reeves *et al.*, 1993b).

Dessa forma, a AIN-93 G é uma formulação destinada a roedores na fase da gestação, lactação e nos três primeiros meses de vida (período de intenso crescimento e desenvolvimento). Por outro lado, a AIN-93M é direcionada aos roedores em fase de manutenção, ou seja, a partir dos 3 meses de idade, período onde a taxa de crescimento nesses animais reduz drasticamente (Reeves *et al.*, 1993a).

Cabe ressaltar que qualidade dos nutrientes purificados é similar em qualquer lugar do mundo, o que permite ao pesquisador obter resultados diferentes manipulando intencionalmente um nutriente de cada vez. No que concerne aos diferentes componentes da SM, a obesidade é mais facilmente obtida a partir da manipulação do lipídio da dieta (Buettner *et al.*, 2006). Alguns laboratórios utilizam a adição de gordura a rações comerciais. Essa prática é inadequada, pois promove diluição dos demais nutrientes (proteínas, vitaminas, minerais e fibras), o que pode resultar em importante viés no estudo (Ghibaudi *et al.*, 2002).

No caso de dietas feitas a partir de ingredientes purificados, a quantidade de lipídio deve ser considerada. Dietas *low-fat* apresentam cerca de 10% da energia derivada de lipídios na sua composição, dietas *high-fat*, têm 30-50% da energia advinda de lipídios e dietas hiperlipídicas, *very high-fat* apresentam mais que 50% da energia derivada de lipídios (Ghibaudi *et al.*, 2002).

Tanto as dietas *high-fat* quando as *very high-fat* são utilizadas para induzir obesidade (Buettner *et al.*, 2006). Contudo, se algum tratamento for testado no animal obeso deve ser considerado o fato de que as alterações promovidas pela dieta *very high-fat* são mais difíceis de reverter que as alterações impostas pela dieta *high-fat*, a qual apresenta um aumento mais discreto das calorias advindas da ingestão de lipídios (Gadja *et al.*, 2007).

Outro fator importante para o estudo da SM em roedores é escolher a fonte de lipídio predominante na dieta hiperlipídica que seja mais adequada (Buettner *et al.*, 2006). Nesse sentido, a utilização de AGS como fonte predominante de lipídios vem sendo associada não somente à obesidade, mas também ao desenvolvimento de resistência à insulina, intolerância à glicose e desordens no metabolismo de lipoproteínas, sendo mais plausível para o estudo da SM (Ikemoto *et al.*, 1996;

Storlien *et al.*, 2000; Storlien *et al.*, 2001). A linhagem de animal utilizada também influencia no resultado do estudo. Camundongos C57BL/6 emergem como um modelo ao estudo da SM em roedores visando comparações com humanos. Eles apresentam vulnerabilidade genética e sofrem forte influência de fatores ambientais no desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e DM2 (Surwit *et al.*, 1988; Surwit *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 2004).

Outros fatores importantes são o desenvolvimento gradual das alterações metabólicas e a deposição seletiva de gordura no mesentério, consistente com o fato de que a obesidade visceral é um fator de risco independente para o diabetes em humanos (Surwit *et al.*, 1988; Rebuffe-Scrive *et al.*, 1993). Merece destaque também o fato de que as alterações metabólicas nesses camundongos são totalmente dependentes do estímulo. Portanto, cessando a dieta hiperlipídica ocorre reversão total dos caracteres da SM (Parekh *et al.*, 1998). Esse fato é importante pois garante os efeitos benéficos observados em experimentos visando o tratamento da SM com drogas podem ser creditados à ação da droga, desde que o estímulo da dieta hiperlipídica seja mantido durante o tratamento.

A utilização do excesso lipídios em detrimento ao aumento do conteúdo de sacarose na dieta também vem sendo estudada de forma substancial. A literatura documenta que a ingestão de gordura é mais importante que a ingestão energética total na gênese da obesidade e no DM2 em camundongos C57BL/6 (Surwit *et al.*, 1995; Petro *et al.*, 2004). Esses animais apresentam predisposição a estocar o excesso de gordura dietética no tecido adiposo, causando aumento da massa corporal (Surwit *et al.*, 1995). A massa de gordura epididimária foi 86% maior em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparados com animais alimentados com dieta rica em sacarose (Black *et al.*, 1998).

Uma limitação da utilização do camundongo C57BL/6 para o estudo da SM é justamente a HAS. Esses animais desenvolvem aumentos muito discretos da pressão arterial, os quais muitas vezes não são detectáveis por métodos simples de aferição. A fim de obter níveis pressóricos mais elevados, deve-se adicionar sódio na dieta, o que constituiria outro modelo com repercussões muitas vezes não desejadas de acordo com o objetivo do estudo (Mills *et al.*, 1993; Mattson, 2001; Costa *et al.*, 2011).

1.5 Rosuvastatina

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol (Ginsberg, 2006).

Mevastatina foi o primeiro inibidor de HMG-CoA redutase descoberto em 1976, originalmente isolado como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinium* (Liao e Laufs, 2005), sendo sua afinidade pelo sítio enzimático cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA. Em 1987 lovastatina (ou mevinolina) foi isolada de culturas de *Aspergillus terreuse Monascus ruber*, com estrutura semelhante à mevastatina e foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico, enquanto que a mevastatina foi abandonada devido a problemas na morfologia intestinal de cachorros e toxicidade hepatocelular verificada em ratos. Outras drogas foram retiradas devido à incidência de casos de rbdomiólise fatal, relacionados a dano severo da musculatura esquelética com alteração das células musculares, liberação de mioglobina e, frequentemente, acompanhado de problemas renais (Wierzbicki *et al.*, 2003). A maioria dos casos foi observada em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais associadas ao uso de genfibrosil, fármaco da classe dos fibratos empregado no tratamento da hipertrigliceridemia (Bakri *et al.*, 2003).

Rosuvastatina (AstraZeneca), aprovada em agosto de 2003 pelo FDA, faz parte da nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras. Rosuvastatina é um novo membro da família estatina com maior eficácia na redução do colesterol LDL do que outras estatinas em doses comparáveis. (Rosenson, 2003; Kendrach e Kelly-Freeman, 2004). Rosuvastatina mostrou ter um maior número de interações ao se ligar com a HMG-CoA redutase, em comparação com outras estatinas. Este aumento nas interações pela droga leva a uma forte inibição da enzima e, portanto, resulta em uma maior eficácia terapêutica (Istvan, 2001). Além do benefício de ter uma alta afinidade pela HMG-CoA redutase, a rosuvastatina

também possui uma meia-vida relativamente longa e um alto grau de seletividade pelas células do fígado (principal local de síntese do colesterol) em comparação com células não hepáticas (McTaggart, 2003).

Atualmente, diversos dados da literatura mostram que as estatinas não só promovem diminuição de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol, como também conduzem à diminuição dos níveis de triglicerídeos (Ballantyne *et al.*, 2003; Jakobisiak e Golab, 2003; Wierzbicki *et al.*, 2003; Averna *et al.*, 2011). De forma geral, as estatinas causam redução dos níveis de triglicerídeos, mas este efeito parece ser observado apenas em pacientes hipertrigliceridêmicos. Os valores praticamente constantes obtidos da relação triglicerídeos/LDL-colesterol, nestes estudos, mostram que quanto maior a atividade de estatina para diminuir o LDL-colesterol, maior será o efeito na diminuição dos níveis de triglicerídeos (Mukai *et al.*, 2003).

As estatinas são bem toleradas com boa margem de segurança durante a utilização prolongada. Os efeitos colaterais não são frequentes, mas um dos mais sérios está relacionado à ação hepatotóxica, com possível aumento das enzimas aspartato e alanina transaminases. As miopatias, com evolução a rabdomiólises e insuficiência renal, são raras, mas são efeitos graves associados ao uso de estatinas. Parece que o uso concomitante de estatinas com eritromicina, ciclosporina, niacina e fibratos aumenta o risco de miopatias em 10-30% dos pacientes (Bakri *et al.*, 2003; Wierzbicki *et al.*, 2003).

As estatinas exercem muitos efeitos independentes da diminuição do colesterol sérico, conhecidos como pleiotrópicos (Liao e Laufs, 2005). Muitos destes efeitos pleiotrópicos são mediados pela inibição de isoprenóides, os quais servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular. Investigações recentes têm mostrado diversos efeitos importantes das estatinas, como ação antineoplásica (Jakobisiak e Golab, 2003), inibição da reabsorção óssea (Staal *et al.*, 2003), aumento da disponibilidade de óxido nítrico endotelial (Kalinowski *et al.*, 2002), relaxamento do músculo sanguíneo (Mukai *et al.*, 2003), atenuação da hipertrofia do miócito cardíaco induzida pelo endotélio (Nishikimi *et al.*, 2002; Davignon, 2004), inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos (Vincent *et al.*, 2002), diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6, liberada pelo tecido adiposo (van Harmelen *et al.*, 2003; Liao e Laufs, 2005).

Estudos recentes têm mostrado que as estatinas podem ter efeitos adicionais, com melhora da sensibilidade à insulina hepática em modelos animais (Naples *et al.*, 2008) e humanos (Rizos *et al.*, 2010); e apesar dessas constatações, o uso das estatinas como uma estratégia no tratamento da resistência à insulina e da esteatose hepática têm sido pouco investigada.

1.6 Rosiglitazona

As tiazolidinedionas, glitazonas, são drogas sensibilizadoras da ação da insulina e já representavam 21% das prescrições para pacientes com DM tipo 2 nos EUA e 5% na Europa (Yki-Jarvinen, 2005). Apresentam, como característica de sua estrutura química, um anel diona, que confere a atividade anti-hiperglicêmica que, entretanto, depende da presença da insulina (Furnsinn e Waldhausl, 2002).

As glitazonas têm como mecanismo de ação uma ligação aos receptores nucleares PPARs (Receptor ativador de proliferação peroxissomal) do tipo γ . Após a ligação, há uma mudança conformacional no receptor, que permite a ligação com receptor do ácido retinóico (RXR) e recrutamento de um ou mais co-ativadores (Yki-Jarvinen, 2004). Esses receptores se expressam em diversos tecidos, principalmente no tecido adiposo, mas também nas células endoteliais vasculares, macrófagos e células beta pancreáticas e nos hepatócitos (Vamecq e Latruffe, 1999; Yki-Jarvinen, 2004). Dessa forma, essas substâncias têm sido utilizadas no tratamento do DM2 com o objetivo de melhorar a RI por efeitos diretos no tecido adiposo (aumento da captação de ácidos graxos e glicose) (Gurnell *et al.*, 2003) e indiretos, por alterar a secreção de adipocitocinas (diminuição de TNF- α e aumento da adiponectina) (Abbasi *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2006), e consequente melhora da sensibilidade à insulina em outros tecidos. Além dos efeitos no metabolismo da glicose, demonstra uma potente ação anti-inflamatória (Mohanty *et al.*, 2004; Sharabi *et al.*, 2007; Qurashi *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de ação do PPAR- γ independe de ligação direta com regiões responsivas do DNA e resultaria em repressão à transcrição genética. Este mecanismo de ação estaria associado à atividade anti-inflamatória e potencialmente anti-aterogênica do PPAR- γ através da repressão da transcrição do NF- κ B. Este fator

é responsável pela transcrição de diferentes citocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases e outras proteínas que participam do processo aterosclerótico (Zhang e Young, 2002).

Além do PPAR- γ , outros receptores PPARs foram descritos: α , β e δ . O receptor PPAR- α é expresso predominantemente no fígado e também pode ser encontrado em músculo, coração, endotélio e nos rins. Tem como principais ligantes endógenos os ácidos graxos livres, e exógenos os fibratos. Os receptores PPAR- α são responsáveis pela oxidação de ácidos graxos livres e pela transcrição de fatores com atividade anti-inflamatória e de genes regulatórios das lipoproteínas (aumenta a transcrição de apoA I e apoA II e diminui a transcrição de apoC III). As ações nas lipoproteínas resultam em aumento do HDL e maior *clearance* de triglicerídeos exógenos (quilomicrons) e endógenos (VLDL) por maior atividade da lipase lipoproteica. O receptor PPAR- γ é expresso no fígado, músculo, intestino e tecido adiposo, sua ação fisiológica é menos estabelecida e seria mais relacionada ao metabolismo lipídico atuando na oxidação dos ácidos graxos (Willson *et al.*, 2000). Vários fatores interferem na expressão e ativação de receptores PPARs, dos quais o mais importante é a alimentação. No período de jejum haveria maior atividade do PPAR- α em relação ao PPAR- γ . No período absorptivo, há maior atividade PPAR- γ .

Usualmente, consideramos que as glitazonas melhoram a resistência insulínica porque interferem em diferentes mecanismos no tecido adiposo, músculo e fígado. O efeito das glitazonas no remodelamento do tecido adiposo resulta em melhora da sensibilidade à insulina, já que interfere na liberação de sinais que agem no tecido muscular e no fígado, dos quais os mais estudados são os AGL, o TNF α e a adiponectina (Martens *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2004). As glitazonas diminuem os AGL em cerca de 25%, diminuem a secreção de TNF- α e aumentam a concentração sérica de adiponectina, como recentemente observado por diferentes estudos duplo cegos e controlados com placebo e pioglitazona e/ou rosiglitazona em pacientes submetidos ao *clamp* insulínico euglicêmico (Martens *et al.*, 2002). A melhora da resistência insulínica é evidenciada nos diferentes trabalhos pela diminuição do índice HOMA (*Homeostasis Model of Assessment*) e QUICKI (*Quick Insulin Sensivity Index*) em pacientes com DM2 (McGarry, 2002), como também pela diminuição da insulinemia plasmática (Miyazaki *et al.*, 2004).

As glitazonas estimulam a diferenciação de adipócitos pequenos, que apresentam como característica maior sensibilidade à insulina e a apoptose dos

adipócitos maiores, que são os principais responsáveis pela liberação de ácidos graxos livres, secreção de TNF- α e IL-6 (Larsen *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2004; Ceriello *et al.*, 2005). A diminuição da liberação de AGL tem efeitos benéficos na secreção e na sensibilidade à insulina. As glitazonas vão redirecionar a captação dos AGL para o tecido adiposo porque há estímulo de proteínas como a P2, que se ligam aos AGL e a FATP/CD36 (*Fatty acid translocase*) que transportam AGL e colesterol para o adipócito (Tan *et al.*, 2004).

No adipócito, o aumento de AGL e a maior atividade da glicerol-quinase também induzida pelas glitazonas (rosiglitazona) resultará em maior formação de triglicerídeos (Moller, 2001). Desta forma, ocorre uma redistribuição do depósito corporal de triglicerídeos, que passa a ser direcionado para o tecido adiposo, com diminuição da gordura visceral e aumento da gordura subcutânea (Larsen *et al.*, 2003). Outros trabalhos demonstraram que, apesar do aumento de peso em pacientes com DM2 em uso de pioglitazona (como monoterapia ou associação com sulfoniluréia) por 16 semanas, houve diminuição significativa da gordura hepática e da produção hepática de glicose, ambos os efeitos associados à diminuição da secreção de resistina (Miyazaki *et al.*, 2004).

Um importante estudo (FLIRT) sugeriu que as TZDs poderiam ser úteis para o tratamento da NASH em pacientes com sobrepeso ou obesos, onde se verificou melhoria da esteatose e redução das aminotransferases, sem, contudo haver uma melhoria significativa nos parâmetros histológicos de lesão, levando, contudo a um aumento de peso (Ratziu *et al.*, 2008). Apesar do interesse potencial de TZDs para o tratamento da NAFLD, é importante notar que a lesão do fígado tem sido relatada em alguns pacientes tratados com rosiglitazona (Henriksen e Ring-Larsen, 2008). Somando-se a esses aspectos, os estudos clínicos publicados recentemente demonstraram um aumento na incidência de insuficiência cardíaca grave associado ao uso de rosiglitazona no tratamento do DM tipo 2, o que trouxe um novo olhar para essa indesejada complicação (Nissen e Wolski, 2007; Mannucci *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Comparar os efeitos dos tratamentos com rosuvastatina, rosiglitazona e a combinação de rosuvastatina e rosiglitazona sobre o metabolismo de carboidratos, remodelamento hepático e a morfometria do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir resistência à insulina em camundongos C57BL/6 por administração de dieta hiperlipídica.
- Comparar os resultados entre os grupos para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico (rosuvastatina, rosiglitazona e rosuvastatina +rosiglitazona)sobre a massa corporal, depósitos de gordura visceral e bioquímica do sangue (lipídios plasmáticos e adipocitocinas).
- Avaliar os efeitos dos diversos tratamentos propostos sobre a morfologia e morfometria do fígado de camundongos C57BL/6 que receberam dieta hiperlipídica.
- Avaliar os efeitos dos diversos tratamentos propostos sobre a resposta inflamatória.
- Avaliar os efeitos dos diversos tratamentos propostos sobre o metabolismo lipídico no fígado, os parâmetros de intolerância à glicose e resistência à insulina, assim como analisar as concentrações plasmáticas de glicose e insulina.
- Comparar a eficácia de um tratamento clássico para dislipidemia com as demais associações propostas, enfatizando os efeitos pleiotrópicos dos fármacos envolvidos nessas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (publicação Nº85-23 do NIH, revisada em 1996). Os cuidados com os animais seguiram as normas impostas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto sob o protocolo CEA/018/2010.

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal Fluminense, mantidos no Laboratório de Morfometria & Morfologia Cardiovascular em caixas apropriadas com condições controladas de temperatura controlada ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) com acesso irrestrito a comida e água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12h claro-escuro, com início às 01:00 a.m. e de reposição de ar (15 minutos/hora).

Os animais foram separados em dois grupos que receberam diferentes dietas durante seis semanas, a partir da 8ª semana até a 13ª semana de vida, denominados Controle (SC), que recebeu dieta padrão com 76% da fonte de energia de carboidratos, 10% de gordura e 14% de proteína e o grupo que recebeu dieta de alta densidade energética (dieta hiperlipídica HF) com 26% da fonte de energia de carboidratos, 60% de gordura, 14% de proteína. Não houve restrição de proteínas, visto que nas duas dietas a proteína fornecida era fonte de proteínas de alto valor biológico (22g ptn/kg – AIN93), assim como o conteúdo vitamínico e mineral em ambas as dietas eram idênticos e de acordo com as recomendações do “*American Institute of Nutrition*” para roedores na fase de manutenção (AIN 93M) (Reeves *et al.*, 1993a).

Após seis semanas de administração das dietas, objetivando induzir os caracteres da SM, o tratamento farmacológico foi iniciado e os seguintes grupos foram formados: grupo SC (ração padrão durante todo o experimento / n=10); grupo HF (dieta hiperlipídica durante todo o experimento e que não fora tratado/n=10); grupo HF + ST [dieta HF acrescida com rosuvastatina (Crestor, AstraZeneca), 20 mg.kg⁻¹]; grupo HF + GZ [dieta HF acrescida com rosiglitazona (Avandia,

GlaxoSmithKline), 5 mg.kg⁻¹]; e a combinação HF + ST + GZ (dieta HF acrescida com rosuvastatina + rosiglitazona) nas mesmas concentrações utilizadas na monoterapias. O tratamento com drogas começou na sétima semana do experimento, e os grupos tratados com o fármaco continuou a ter livre acesso à dieta HF durante o período de tratamento. Os tratamentos tiveram a duração de oito semanas e as drogas foram trituradas e misturadas à dieta. Tomando consumo diário de alimentos e MC em conta, as doses da droga foram corrigidas para corresponder às mesmas concentrações, conforme indicado.

A manipulação das dietas ofertadas aos animais foi feita pela empresa Pragsoluções (São Paulo, www.pragsolucoes.com.br) e suas composições químicas estão descritas com detalhes na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição e conteúdo energético das dietas padrão (SC) e hiperlipídica (HF).

Ingredientes (g/Kg)	Dieta	
	SC	HF
Caseina (≥ 85% de proteína)	140.0	190.0
Maisena	620.7	250.7
Sacarose	100.0	100.0
Óleo de soja	40.0	40.0
Banha de porco	-	320.0
Fibra	50.0	50.0
Mistura de vitamina*	10.0	10.0
Mistura de mineral*	35.0	35.0
Cistina	1.8	1.8
Colina	2.5	2.5
Antioxidante	0.008	0.008
Total em gramas	1,000	1,000
Energia (Kcal/Kg)	3,573	5,404
Hidratos de carbono (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídios (%)	10	60

* Misturas de Vitaminas e Minerais segundo a AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993a).

3.2 Massa corporal e ingestão alimentar

A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente a partir da 8ª semana durante todo o curso do experimento, sempre às 14h00min em balança digital (precisão 0,01g). As médias dos grupos em cada semana foram calculadas e traçadas. O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente às 13h00min. A dieta era fornecida diariamente e todo restante do dia anterior descartado, devido ao alto conteúdo de gordura da dieta HF, sendo assim susceptível à rancificação. Uma dieta fresca foi fornecida diariamente, e qualquer dieta remanescente do dia anterior foi descartada.

3.3 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Foi realizada a glicemia de jejum e, após a administração por gavagem de solução 25% de glicose (2g/kg camundongo), nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. No dia da aferição, os camundongos permaneceram em jejum de seis horas (01 - 07h). As concentrações da glicemia de jejum foram determinadas pelo método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-Chek Go, Roche Diagnostic, Germany). A área sob a curva (AUC) foi calculada usando a ferramenta trapezóide do programa GraphPad Prism versão 5.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)

Foi realizada a glicemia de jejum e, após foi administrada intraperitonealmente (i.p.) 1,0 U /Kg MC de camundongo de insulina de ação ultrarrápida (Lispro insulin ®), sendo então determinadas as glicemias nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. No dia da aferição, os camundongos permaneceram em jejum de quatro horas. (01 - 05h). As concentrações da glicemia de jejum foram determinadas pelo método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (Accu-Chek Go, Roche Diagnostic, Germany). A área sob a curva também foi calculada objetivando avaliar a resistência à insulina.

3.5 Eutanásia e obtenção do material para análise bioquímica

Ao término de 14 semanas de experimento, no dia da eutanásia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e submetidos ao jejum de 6 horas. Antes do procedimento, os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/kg). Em seguida, abdômen e tórax foram abertos através de incisão mediana. Em seguida os órgãos foram dissecados e retirados o fígado e os depósitos de gordura retroperitoneal, perirrenal, epididimária, inguinal e subescapular. Estes foram completamente removidos de ambos os lados e suas massa foram aferidas em balança de precisão digital (precisão 0,001g). A gordura retroperitoneal foi considerada como os depósitos localizados ao redor dos rins e ao longo dos músculos lombares e a gordura perirrenal como os depósitos relacionados diretamente com os rins. A gordura epididimária incluiu o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga e epidídimos e a gordura inguinal, como toda gordura localizada na região inguinal.

Os órgãos foram fixados em formaldeído 1.27 mol/l em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 para posterior preparação técnica e microscopia de luz (Carson *et al.*, 1973).

3.6 Radioimunoensaio para insulina e HOMA-IR

As concentrações plasmáticas foram reconstituídas com 1ml de solução tampão gelatina-fosfato (TGF). Destes, 100µl foram utilizados em duplicatas para a execução do radioimunoensaio. A insulina de jejum foi mensuradas utilizando o anticorpo anti-insulina (IMMUCHEM™ DOUBLE ANTIBODY, MP BIOMEDICALS, CALIFORNIA, E.U.A., CAT. 07-260121) que foi utilizado em solução TGF. O triciado (1,2,6-7-3H-cortisol, Amersham, EUA), com atividade específica de 2,29 TBq/mmol, foi mantido a -20°C até a sua utilização na proporção 15:10,000 em TGF. Desta solução, 100µl foram empregados no ensaio. Depois foram adicionados 200µl a cada amostra de carvão dextran, e mantidos em agitação contínua a 4°C. Após a homogeneização e subsequente repouso por 15min a 4°C, as amostras foram submetidas à centrifugação (3000 RPM, 30 min a 4°C) em centrífuga refrigerada. A contagem foi realizada num contador de radiação beta (Packard, modelo 1900 TR, EUA). O cálculo do 21DF, em ng/dl, foi realizado pelo programa RIACALC (Wallac Oy, Turku, Finlândia). A curva de calibração foi determinada com sete diferentes concentrações: 39, 78, 156, 313, 625, 1.250 e 2.500 pg/0,1 ml e foram preparadas em TGF a partir do padrão de 21DF (100µg/ml). Os resultados obtidos foram corrigidos em função do volume inicial e da diluição das amostras, para o qual o coeficiente de variação intraensaio foi de 1,4%.

O índice HOMA-IR (*“homeostasis model assessment-insulin resistance”*) para avaliação da resistência à insulina foi calculado através da seguinte fórmula: $HOMA-IR = [\text{fasting serum glucose} \times \text{fasting serum insulin} / 22.5]$ (Vogesser *et al.*, 2007) para avaliar resistência à insulina.

3.7 Adipocitocinas

Análise sérica de adiponectina foi feita usando um kit comercial para ELISA (Millipore, Billerica, MA, EUA, mouse EZMADP-60K; Linco/Millipore). Assim como os níveis séricos de leptina e resistina foram analisados por um kit Milliplex Map (Millipore, Billerica, MA, EUA, cat. N°. MADPK-71K). Os coeficientes de variação intra-e interensaio de foram 5,4% e 1,4% para a adiponectina, 4,5% e 10,3% para leptina e resistina.

3.8 Morfometria dos adipócitos

O tecido adiposo epididimário foi incluído em paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), seccionado a 5 μm e corado com hematoxilina-eosina. Após isso, a área seccional dos adipócitos foi medida utilizando o software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para a análise de imagens digitais adquiridas de campos aleatórios (um mínimo de 10 adipócitos por animal, formato TIFF, 36-bit, 1280x1024 pixels) com câmera Olympus LC Evolution e microscópio Olympus BX51.

3.9 Análise bioquímica

Amostras de sangue foram rapidamente obtidos por punção cardíaca do átrio direito e após a coleta do sangue, o plasma foi separado por centrifugação em temperatura ambiente ($2,4 \times 10^3$ rpm por 15 min) e estocado individualmente a -20°C até a realização das análises bioquímicas.

O colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram dosados pelo método enzimático colorimétrico, sendo realizado de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Quanto às enzimas de função hepática, foram dosadas a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a concentração de fosfatase alcalina (FA) pelo método cinético colorimétrico.

3.10 Estereologia e Triglicerídeo hepático

O fígado foi cuidadosamente dissecado e teve seu volume aferido pelo método de Scherle. Este se fundamenta no deslocamento do líquido devido ao volume do órgão submerso na solução salina de maneira que as paredes do recipiente posicionado sobre a balança não sejam tocadas (Scherle, 1970). A partir

de tal procedimento, o volume do órgão é obtido por meio do peso, dado que volume = massa/gravidade e que a gravidade da solução fisiológica salina é 1,0048, pode-se considerar então que volume (cm³) = massa (g) (Weibel, 1979).

Na sequência, o fígado foi cortado em fragmentos pequenos, os quais foram mantidos formalina de Millong durante 48h em temperatura ambiente. Fragmentos aleatórios foram desidratados em alcoóis de concentração crescente até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O material foi seccionado com 3µm de espessura, e então os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina. Vários cortes foram obtidos de cada fragmento do órgão e 5 campos aleatórios foram analisados ao microscópio, configurando um estudo completamente cego.

Para as análises estereológicas, foi utilizado um sistema de vídeo-microscopia com microscópio Leica DMRBE, objetivas planacromáticas (Leica, Wetzlar, Alemanha) e um sistema teste com 36 pontos (pontos totais) acoplado ao monitor (Aguila *et al.*, 2003a). A densidade de volume de esteatose hepática foi estimada por contagem dos pontos que tocavam glóbulos de gordura: $Vv[\text{estrutura}] = P_P[\text{estrutura}] / P_T$ (onde P_P é o número de pontos que tocam as estrutura avaliada e P_T é o número total de pontos na grade teste) (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Vale a pena mencionar que a técnica de contagem de pontos foi escolhida uma vez que esta tem uma melhor reprodutibilidade que a avaliação visual (Franzen *et al.*, 2005; Catta-Preta *et al.*, 2011).

Para análise do triglicerídeo hepático, fragmentos do fígado de cada animal foram congelados a -80°C para análise bioquímica. Os níveis de triglicerídeos hepáticos foram medidos de acordo com um protocolo previamente publicados (Vieira *et al.*, 2009). Resumidamente, 50mg de tecido do fígado congelado foi colocado no processador ultrassônico com 1 mL de isopropanol. O homogenato foi centrifugado a 2000 x g e 5µl do sobrenadante foi usada para mensuração com uso de um kit de triglicerídeos em um analisador bioquímico semiautomático (K55, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

3.11 Imunohistoquímica

Foram utilizados cortes em Paraplast (5 μm) obtidos a partir de tecido de fígado em diferentes níveis, onde foi realizado a recuperação antigênica com tampão citrato em pH 6,0 por 30 minutos a 60°C. Após isso, a atividade da peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio 3%. Os cortes foram lavados com tampão fosfato (PBS). Ligações inespecíficas dos anticorpos policlonais foram bloqueadas pela incubação com albumina sérica bovina (BSA) a 5% em PBS. Os cortes foram então incubadas com anti-SREBP-1c (68 kDa; SC-367, Santa Cruz Biotechnology) anticorpos por 2 horas. As lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS). Posteriormente, as amostras foram tratadas com um anticorpo secundário biotilado (K0679, Universal DakoCytomation LSAB+Kit, Peroxidase, Glostrup, Dinamarca), que foi detectado pela reação com um complexo peroxidase-estreptavidina-biotina. A Imunoreação positiva foi identificada após incubação com 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (K3466, DAB, DakoCytomation) e contra corado com hematoxilina de Mayer.

Imagens digitais dos cortes foram obtidas (LC câmera Evolution, Olympus BX51 microscópio, o formato TIFF, cor 36-bit, 1280x1024 pixels) e analisadas com o software Image-Pro Plus versão 7.0. O número de núcleos SREBP-1c imunomarcados foi quantificado em dez campos por animal. Foi utilizada uma área teste com dimensões conhecida, onde somente foram quantificadas estruturas preservadas e que não tocavam a linha proibida (Gundersen, 1977).

3.12 Western Blot

As proteínas hepáticas foram extraídas com tampão de lise e inibidores de protease. Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 3200x g por 20 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram coletados. A expressão das proteínas SREBP-1c, GLUT-2, PPAR- α e PPAR- γ foram analisadas por western blot. Quantidades iguais de proteína total foram resuspensas em tampão de amostra contendo SDS, aquecidas por 5 minutos a 100°C e separadas pelo SDS-PAGE.

Após a eletroforese das proteínas houve a eletro transferência destas para uma membrana PVDF (Amersham HybondTM-P). A eficiência da transferência das proteínas foi visualizada pela coloração com o corante Ponceau. A membrana foi então incubada em leite desnatado em pó (6% em T-TBS), incubada com anticorpo policlonal anti-rabbit-SREBP-1c (68kDa, SC-367, Santa cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-rabbit-GLUT-2 (53-61kDa, AB1342, Chemicon), anti-rabbit-PPAR- γ (53-61 kDa; SC-7273; Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit-PPAR- α (53-61 kDa; SC-9000; Santa Cruz Biotechnology) e monoclonal anti-mouse-beta-actina (57 kDa; sc-130301; Santa Cruz Biotechnology). A proteína beta-actina serviu como controle de carregamento de proteínas citosólicas. Posteriormente a incubação, as membranas foram lavada e incubada com anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimioluminescência aumentada (ECL - Amersham). Os sinais foram visualizados por autoradiografia e determinada pela análise quantitativa de imagens digitais do gel usando o software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Silver spring, Md). A densidade integral ótica (IOD) das proteínas expressas foi mensurada e corrigida pelo controle da sua beta-actina. Os dados foram expressos como % do grupo SC.

3.13 Análise estatística

Os dados são mostrados como media \pm EPM. Nos casos em que podemos confirmar a homocedasticidade das variâncias, as comparações entre os grupos foram feitas pelo one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Caso contrário as diferenças foram testadas com Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Em todos os casos, um nível de significância de 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. Todas as análises e gráficos foram feitos com o GraphPad Prism versão 5.3 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão de energia, massa corporal e depósitos de gordura

Não houve diferença quanto à quantidade de ração ingerida durante todo o experimento, entretanto, quando avaliamos a ingestão em energia, o consumo de energia dos animais alimentados com a dieta HF ultrapassou o consumo de energia do grupo SC antes do tratamento de drogas (+100%, $P < 0,0001$). Após o tratamento, os animais do grupo HF+ST tiveram um consumo energético reduzido por grama de massa corporal quando comparado aos animais do grupo alimentado com dieta HF não tratado (-15%, $P < 0,01$).

Quanto à massa corporal, na quarta semana de experimento, a massa corporal já era maior em todos os animais alimentados com uma dieta HF em comparação aos animais alimentados com SC (pré-tratamento, $P = 0,02$). Ao final do experimento, houve uma redução significativa no ganho da massa corporal observados no grupo HF+ST. É importante destacar que o tratamento com ST preveniu o excessivo ganho de massa corporal nos animais tratados (Tabela 4, pós-tratamento, $P < 0,01$). Os animais do grupo HF+ST ganharam apenas $6,4 \pm 3,4\%$ de massa corporal durante o final de oito semanas do estudo, enquanto o grupo de animais HF+ST+GZ ganhou $11,2 \pm 4,1\%$ de massa corporal durante este período ($n=10$). O grupo HF+GZ ganhou $13,72 \pm 4,2\%$ da massa corporal total durante o final de oito semanas do estudo. As mudanças na massa corporal para todos os grupos são mostrados na figura 8.

Da mesma forma, os depósitos de gordura foram significativamente maiores nos animais HF em comparação com os alimentados com a dieta SC, com aumento nas gorduras visceral total (143%, $P = 0,003$), retroperitoneal (124%, $P < 0,01$) e na epididimária (90%, $P < 0,01$). A massa adiposa em camundongos não tratados alimentados com dieta HF foi aumentado em 28% quando comparado com os animais com dieta SC ($P < 0,05$), sendo o ganho total de tecido adiposo atenuado pelo tratamento com ST (+38% no grupo HF+ST, $P < 0,05$ e +42% no grupo HF+ST+GZ, $P < 0,001$, em comparação com grupo SC). O tratamento com rosuvastatina também alterou o padrão de distribuição de gordura, diminuindo a

proporção de gordura visceral epididimária/gordura subcutânea inguinal nos animais do grupo HF+ST (-25%, $P < 0,001$). A Hipertrofia dos adipócitos foi observada no grupo HF (+125%, $P < 0,001$) quando comparado ao grupo SC, que foi eficientemente reduzida pela ST. O HF+ST grupo mostrou adipócitos de tamanho menores, com diâmetro próximo aos animais do grupo SC. Os resultados mais importantes sobre o tecido adiposo são apresentados na Tabela 4 e figura 9.

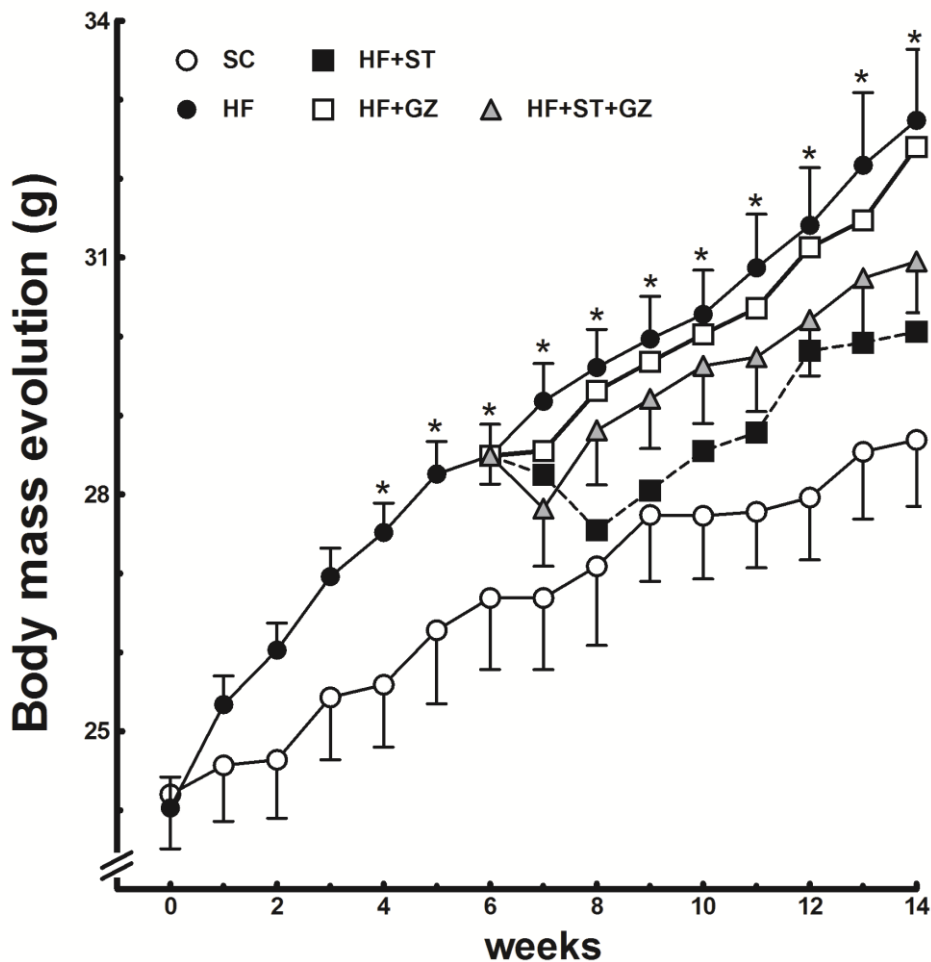


Figura 8 – Evolução de massa corporal (valores em média±EPM). Pré-tratamento corresponde ao período até a sexta semana (indução de resistência à insulina), quando começou o tratamento e se estendeu até 14^a semana. As diferenças foram encontradas comparando a SC e grupos HF (* $P < 0,05$), conforme determinado por uma one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina+rosiglitazona (HF+ST+GZ).

Tabela 4. Composição corporal e metabolismo energético

Parâmetros	Grupos				
	SC	HF	HF+ST	HF+GZ	HF+ST+GZ
Massa corporal final, g	28,69 ± 0,79	32,74 ± 0,90*	30,06 ± 0,36†	32,40 ± 0,97*	30,95 ± 0,65†
Dieta, g/dia/animal	2,53 ± 0,08	3,30 ± 0,14	3,23 ± 0,36	3,55 ± 0,29	3,71 ± 0,39
Energia, kJ/dia/animal	42,82 ± 1,58	85,79 ± 2,03*	73,08 ± 1,31*†	81,35 ± 1,69*‡	83,90 ± 1,70*‡
Adipócito, µm	53,60 ± 0,40	80,50 ± 1,07*	59,10 ± 0,60*†	67,30 ± 0,98*†‡	56,30 ± 0,59†‡§
<i>Massa de Gorgura, g</i>					
Epididimária	0,40 ± 0,03	1,50 ± 0,23*	0,60 ± 0,07†	1,00 ± 0,26*	0,60 ± 0,08†
Retroperitoneal	0,12 ± 0,01	0,54 ± 0,13*	0,16 ± 0,02†	0,34 ± 0,06*	0,17 ± 0,03†
Inguinal	0,10 ± 0,01	0,32 ± 0,07*	0,13 ± 0,01†	0,28 ± 0,05*†	0,17 ± 0,03
ViscGord/InguiGord razão	4,10 ± 0,15	5,30 ± 0,32*	4,60 ± 0,26	3,7 ± 0,19†‡	3,6 ± 0,18†‡

Os valores em média±EPM, com n=5-8 animais/grupo. Pré-tratamento corresponde ao período até a sétima semana (indução de resistência à insulina), Pós-tratamento quando o tratamento é iniciado e estendido até a 14ª semana. Nos casos sinalizados, P <0,05 quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Grupos: dieta padrão (SC), dieta hiperlipídica (HF), dieta HF tratado com rosuvastatina (HF+ST), dieta HF tratado com rosiglitazona (HF+GZ) e dieta HF tratado com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

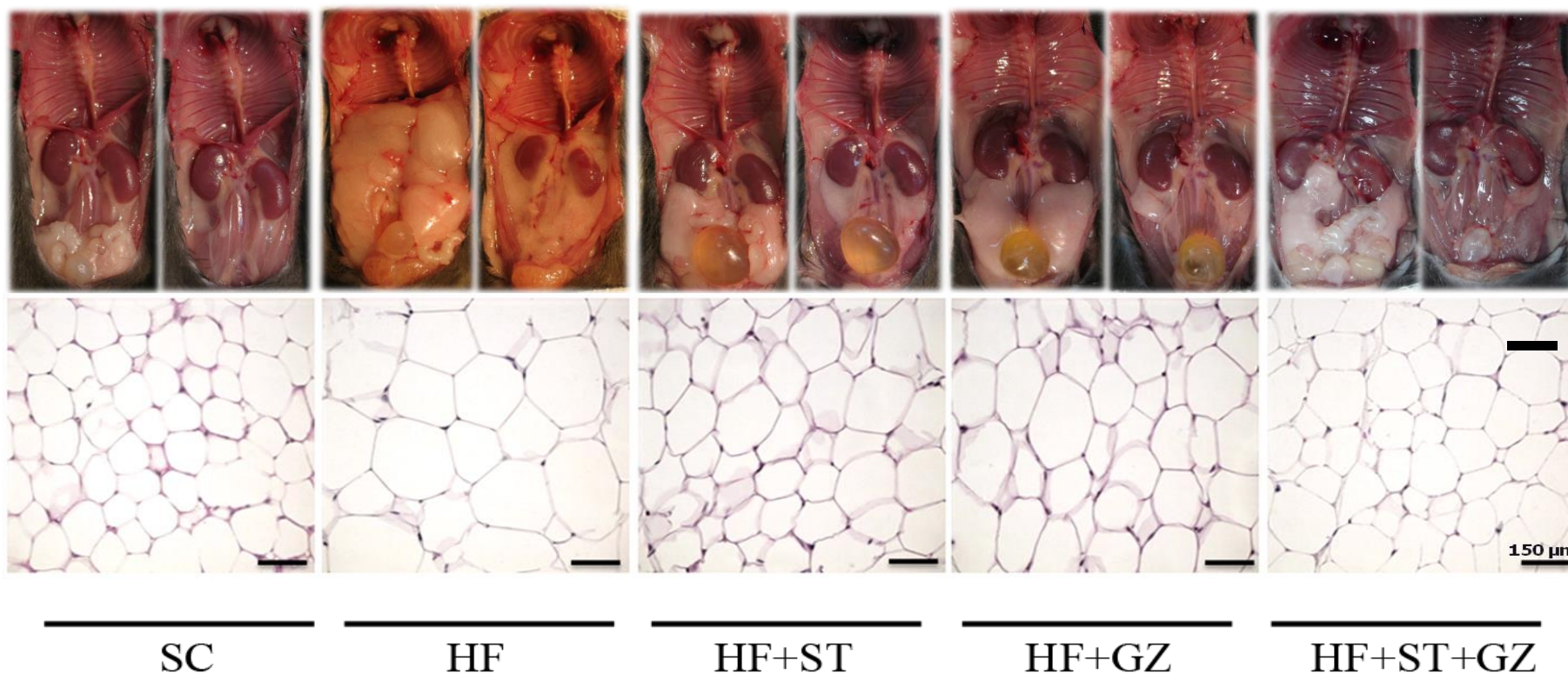


Figura 9 – Vista ventro abdominal do camundongo dissecado mostrando os depósitos de gordura (barra = 20 mm): À Esquerda Gordura epididimária: Grupo SC, os rins estão envoltos por pequenos depósitos de gordura estendidos até a bexiga urinária. Nos Grupos HF e HF+GZ, os depósitos de gordura são maiores que o grupo SC, cobrindo parcialmente os rins e com reduzida quantidade nos grupos HF+ST e HF+ST+GZ. À Direita Gordura retroperitoneal: Grupo SC – cobrem toda a parte inferior da cavidade abdominal, mas são muito mais desenvolvidas nos grupos HF e HF+GZ, com reduzida quantidade nos grupos HF+ST e HF+ST+GZ. Fotomicrografias dos depósitos de gordura epididimária dos após-tratamento. Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

4.2 Adipocitocinas

A resistina foi 79% maior no grupo de dieta HF, quando comparado com o grupo SC. No grupo HF+ST, os níveis de resistina foram menores quando comparados com o grupo HF (-44%, $P < 0,01$). Os níveis de resistina foram consistentes com os resultados do índice HOMA-IR e estão de acordo com os resultados de resistência à insulina (Tabela 5). De todos os grupos experimentais, o grupo HF não tratado apresentou os maiores níveis de leptina. Em geral, os níveis de leptina foram mais baixos nos animais alimentados com dieta HF comparados com os alimentados com dieta padrão (HF, -47%, $P < 0,001$). Os níveis de leptina foram normalizados por todos os tratamentos associados ao uso de rosuvastatina, sendo os níveis de leptina 85% e 78% menores nos grupos HF+ST e HF+ST+GZ, respectivamente, em comparação com o grupo HF ($P < 0,01$). Interessantemente, os níveis de adiponectina foram os menores no grupo HF e após o tratamento com rosiglitazona, houve um aumento nos níveis de adiponectina. No grupo HF+ST, os níveis de adiponectina aumentaram quando comparado ao grupo HF (13%), entretanto, este aumento não foi significativo. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos níveis de adiponectina entre os HF+GZ, HF+ST+GZ e grupo SC (Tabela 5).

Tabela 5. Metabolismo das adipocitocinas

Parâmetros	Grupos				
	SC	HF	HF+ST	HF+GZ	HF+ST+GZ
<i>Adipocitocinas</i>					
Resistina, pg/MI	3615,4 ± 60,6	4525,0 ± 442,5*	2527,3 ± 470,3†	4791,1 ± 164,6‡	2741,3 ± 459,0†§
Adiponectina, ng/dL	14,10 ± 1,00	7,4 ± 0,40*	8,40 ± 0,60*	14,70 ± 1,60†‡	13,50 ± 0,90†‡
Leptina, pg/mL	1284,1 ± 159,3	14252,0 ± 3367,0*	2054,2 ± 836,6†	6531,1 ± 2484,0	3112,2 ± 1186,0†

Os valores em média±EPM, com n=5 animais/grupo. Nos casos sinalizados, P <0,05 quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Grupos: dieta padrão (SC), dieta hiperlipídica (HF), dieta HF tratado com rosuvastatina (HF+ST), dieta HF tratado com rosiglitazona (HF+GZ) e dieta HF tratado com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

4.3 Análise Bioquímica

A dieta hiperlipídica causou dislipidemia nos camundongos, com aumento nos níveis plasmáticos de TG e CT quando comparados aos alimentados com dieta SC ($P = 0,001$). Animais tratados com rosuvastatina em monoterapia apresentaram redução dos níveis de CT de 16% ($P < 0,05$) e quando combinado a rosiglitazona, reduziram em 41% ($P < 0,01$). No entanto, o tratamento em monoterapia não teve nenhum benefício significativo na redução do CT. (Tabela 6). Os níveis de TG foram normalizados por todos os tratamentos com rosuvastatina, e ST em monoterapia reduziu os níveis de TG de 22% ($P < 0,05$) (Tabela 6). Além disso, as enzimas hepáticas ALT ($P < 0,001$), AST ($P < 0,01$) e FA ($P < 0,001$) também foram significativamente maiores nos grupos HF, em comparação ao grupo SC.

4.4 Metabolismo de carboidratos

A ingestão de dieta hiperlipídica induziu hiperinsulinemia nos animais HF, com insulinemia maior (+180%, $P < 0,0001$) que os animais SC da mesma idade e com aumento de 40% na glicose plasmática de jejum ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo SC, com consequente aumento do HOMA-IR ($P < 0,001$). Os animais alimentados com dieta hiperlipídica tratados com rosuvastatina apresentaram redução (-80%, $P = 0,002$) na insulina e na glicose de jejum, sendo estatisticamente diferentes do grupo HF e não apresentaram diferença com relação ao grupo SC, com uma consequente diminuição do HOMA-IR (-70% $P = 0,0008$). Todos os tratamentos com drogas normalizaram níveis de insulina e o índice HOMA-IR (Tabela 6).

Tabela 6. Metabolismo de carboidratos, perfil lipídico e análise bioquímica

Parâmetros	Grupos				
	SC	HF	HF+ST	HF+GZ	HF+ST+GZ
<i>Pré-tratamento</i>					
Glicose mg/dl	136.7 ± 7.3	168.9 ± 4.0*			
<i>Pós-tratamento</i>					
Glicose, mg/dl	127.8 ± 10.0	180.5 ± 8.2*	133.7 ± 9.4†	150.7 ± 5.2†	138.3 ± 5.0†
Insulina (mUI/ml)	6.0 ± 1.1	17.0 ± 2.6*	5.8 ± 0.6†	2.8 ± 1.1†	3.6 ± 0.6†
HOMA-IR	1.9 ± 0.4	7.5 ± 0.9*	2.3 ± 0.3†	1.7 ± 0.6†	1.3 ± 0.2†
Colesterol, mg/dl	113.0 ± 3.8	160.2 ± 5.5*	134.0 ± 6.2†	144.0 ± 3.7*	130.4 ± 5.5†
Triglicerídeo, mg/dl	28.0 ± 0.5	36.2 ± 0.7*	28.4 ± 0.7†	30.8 ± 2.5	22.0 ± 2.2†§
ALT, UI/l	30.2 ± 1.0	55.6 ± 4.0*	48.4 ± 1.8*	48.6 ± 3.8*	51.2 ± 2.0*
AST, UI/l	66.6 ± 2.8	97.8 ± 9.2*	92.4 ± 4.9*	94.6 ± 5.0*	90.0 ± 1.2*
ALK, UI/l	39.0 ± 2.6	53.4 ± 3.0*	53.4 ± 2.1*	51.40 ± 1.0*	54.6 ± 2.3*

Os valores em média±EPM, com n=5 animais/grupo. Nos casos sinalizados, P <0,05 quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Grupos: dieta padrão (SC), dieta hiperlipídica (HF), dieta HF tratado com rosuvastatina (HF+ST), dieta HF tratado com rosiglitazona (HF+GZ) e dieta HF tratado com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

4.5 TOTG e TITI

Corroborando com os níveis de insulinemia, quando comparado ao grupo SC, os camundongos HF apresentaram intolerância oral à glicose, com maior AUC após realização do TOTG. A glicose plasmática de jejum aumentou ao máximo após 15 minutos da administração oral de glicose em todos os grupos. Entretanto o nível de glicose nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica foi maior que no grupo SC ($P < 0.0001$). O *clearance* de glicose nos animais HF mostrou um atraso na captação desta glicose, permanecendo elevado após 120 minutos da administração da glicose ($P < 0.001$), caracterizando desta forma um retardo no *clearance* de glicose no grupo HF quando comparado aos animais do grupo SC (Figura 10). A área sob à curva (AUC) de glicose nos animais alimentados com a dieta HF foi significativamente maior (+30% para AUC no TOTG, $P = 0.001$, figura 10). Todos os tratamentos foram eficazes em reverter a intolerância oral à glicose, já que esses grupos não apresentaram diferenças com relação aos camundongos SC no que se refere à AUC do OGTT.

O TITI demonstrou uma rápida redução nos valores da glicose plasmática aos 15 minutos de administração da insulina (i.p) em todos os grupos, mas a glicose plasmática permaneceu significativamente elevada em camundongos alimentados com dieta HF quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão (SC) ($P < 0.0001$) em todos os tempos até os 120 minutos (Figura 10). A área sob a curva do TITI foi significativamente maior nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (+25%, $P = 0.002$) (Figura 10). Entre as monoterapias, o grupo HF+ST apresentou reduzida intolerância à glicose e resistência à insulina (-12% para AUC no TOTG, $P = 0,0004$ e -24% para AUC em TITI, $P = 0,0006$). Todos os tratamentos foram eficazes em reverter completamente a resistência à insulina avaliada pelo TITI (Figura 10).

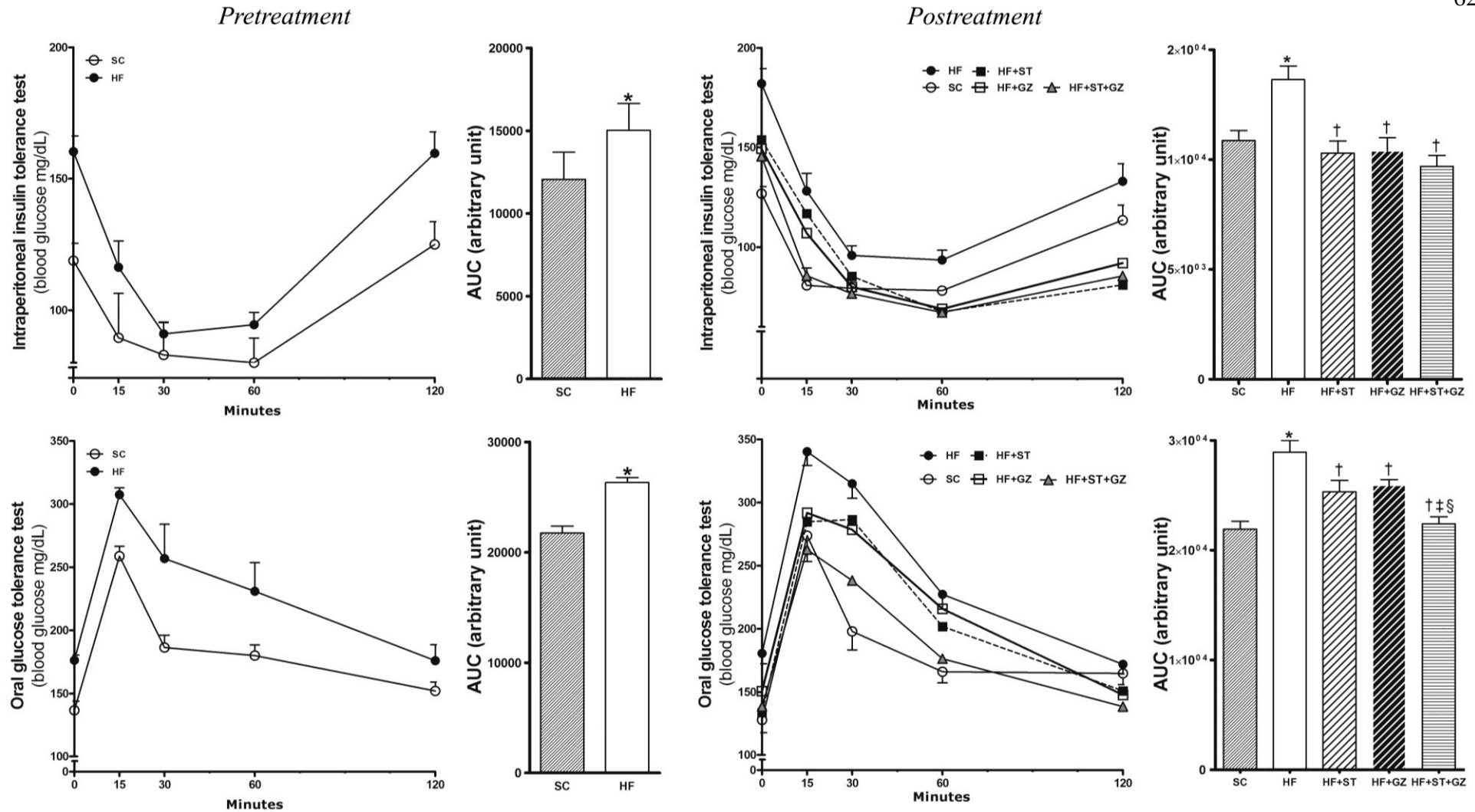


Figura 10 – Curva do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI). As áreas sob as curvas (AUC) mostram as significativas diferenças entre os grupos Os valores em média±EPM, com n=5 animais/grupo. Pré-tratamento corresponde ao período até a sétima semana (indução de resistência à insulina), Pós-tratamento quando o tratamento é iniciado e estendido até a 14ª semana. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Grupos: dieta padrão (SC), dieta hiperlipídica (HF), dieta HF tratado com rosuvastatina (HF+ST), dieta HF tratado com rosiglitazona (HF+GZ) e dieta HF tratado com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

4.6 Fígado: Biometria, Esteatose e Triglicerídeo

Na 14ª semana, a massa do fígado (38%, $P < 0.05$) foi significativamente maior no grupo HF quando comparado ao grupo SC (Figura 11 e Tabela 7) e a esteatose foi um achado comum no grupo HF não tratado, que exibiu expressiva esteatose macro-e micro-vesicular no interior dos hepatócitos em comparação com os animais alimentados com dieta SC. Quando comparado aos camundongos alimentados com dieta HF, os animais do grupo HF+ST mostraram reduções significativas na massa do fígado e na esteatose hepática (-6%; $P < 0,05$ e -21%, $P < 0,01$, respectivamente). No grupo HF+ST, a esteatose hepática reduziu ao nível observado no grupo alimentado com dieta SC (Tabela 17). As Figuras 12 e 13 mostram respectivamente, a densidade de volume de esteatose hepática e fotomicrografias da esteatose hepática nos diferentes grupos.

O grupo HF também apresentou os maiores valores nos níveis de triglicerídeos hepáticos, que foi aumentado em 127% comparado com o grupo SC ($P < 0,01$). No grupo HF+ST, os níveis de triglicerídeo hepático foram reduzidos em 58% quando comparados ao HF ($P < 0,01$) (Tabela 7).

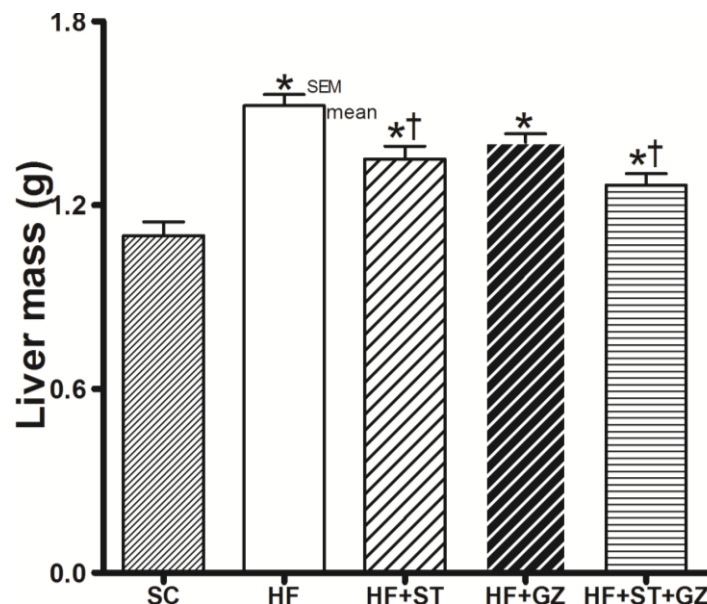


Figura 11 – Massa do fígado. Massa do fígado (em gramas) mostrando diferenças significativas encontradas comparando a SC e grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média±EPM, n=6.

Tabela 7. Massa e metabolismo hepático

Parâmetros	Grupos				
	SC	HF	HF+ST	HF+GZ	HF+ST+GZ
<i>Fígado</i>					
Massa, g	1.10 ± 0.10	1.50 ± 0.04*	1.40 ± 0.04*†	1.40 ± 0.030*	1.30 ± 0.04*†
Esteatose, %	5.30 ± 1.20	16.10 ± 0.90*	12.60 ± 0.50*†	15.30 ± 0.60*	10.80 ± 0.80*†§
Triglicerídeo, (mg/dL)/mg	180.0 ± 17.2	408.8 ± 62.2*	170.4 ± 23.6†	325.3 ± 31.7*‡	142.5 ± 16.5†§
SREPB1cnúcleo/μm ²	8.20 ± 0.60	14.00 ± 0.50*	9.30 ± 0.40†	12.70 ± 0.80*‡	9.40 ± 0.30†§

Os valores em média±EPM, com n=5 animais/grupo. Nos casos sinalizados, P <0,05 quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Grupos: dieta padrão (SC), dieta hiperlipídica (HF), dieta HF tratado com rosuvastatina (HF+ST), dieta HF tratado com rosiglitazona (HF+GZ) e dieta HF tratado com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ).

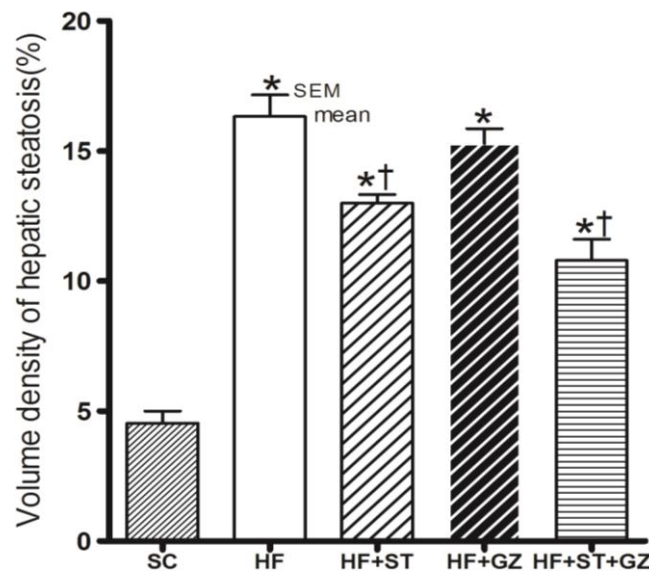


Figura 12 – Densidade de volume de esteatose hepática (em %) mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média±EPM, $n=6$.

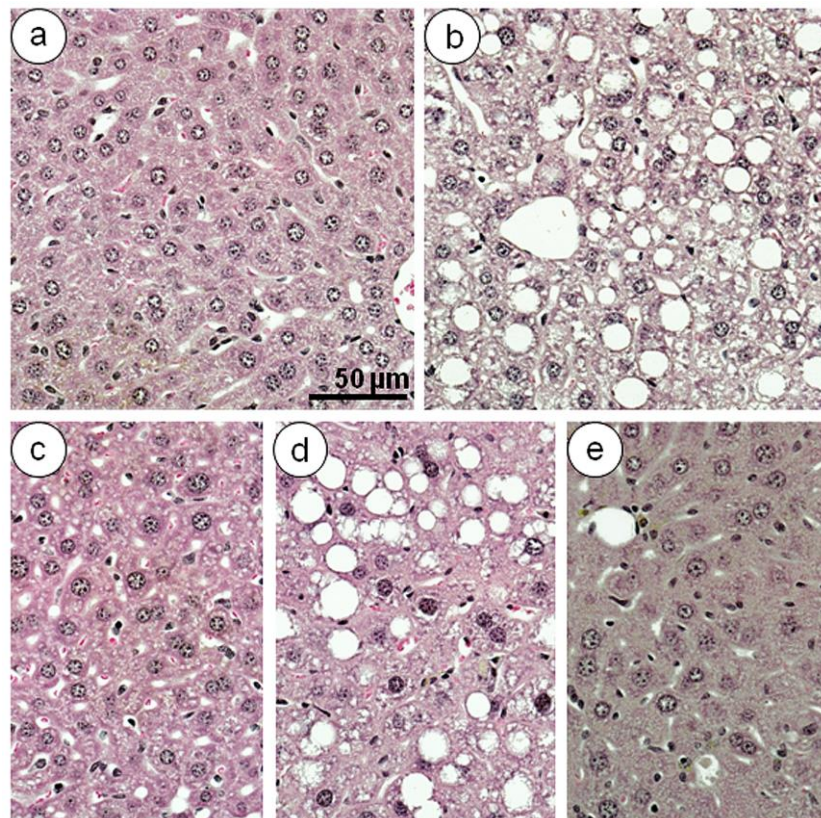


Figura 13 – Fotomicrografias da morfologia do fígado visualizadas através da coloração de Hematoxilina e Eosina. (A) Visualização típica dos hepatócitos do grupo dieta padrão (aumento de 40x, barra=50 µm). (B) Presença de esteatose micro- e macrovesicular em hepatócitos de animais alimentados com dieta hiperlipídica; (C) dieta HF tratado com rosuvastatina; (D) HF tratado com rosiglitazona e (E) HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona.

4.7 Imunohistoquímica

No grupo com dieta HF, observou-se quantitativamente mais núcleos de hepatócitos imunomarcados para SREBP-1c comparado com o SC dieta em grupo (72%, $P < 0,001$, Tabela 10). O grupo HF+ST mostrou uma diminuição na imunomarcção para SREBP-1c em comparação com os animais do grupo HF (-33%, $P < 0,0001$). O grupo HF+GZ não apresentou redução significativa na esteatose hepática ou na imunomarcção hepática para SREBP-1c (Tabela 7 e Figura 14).

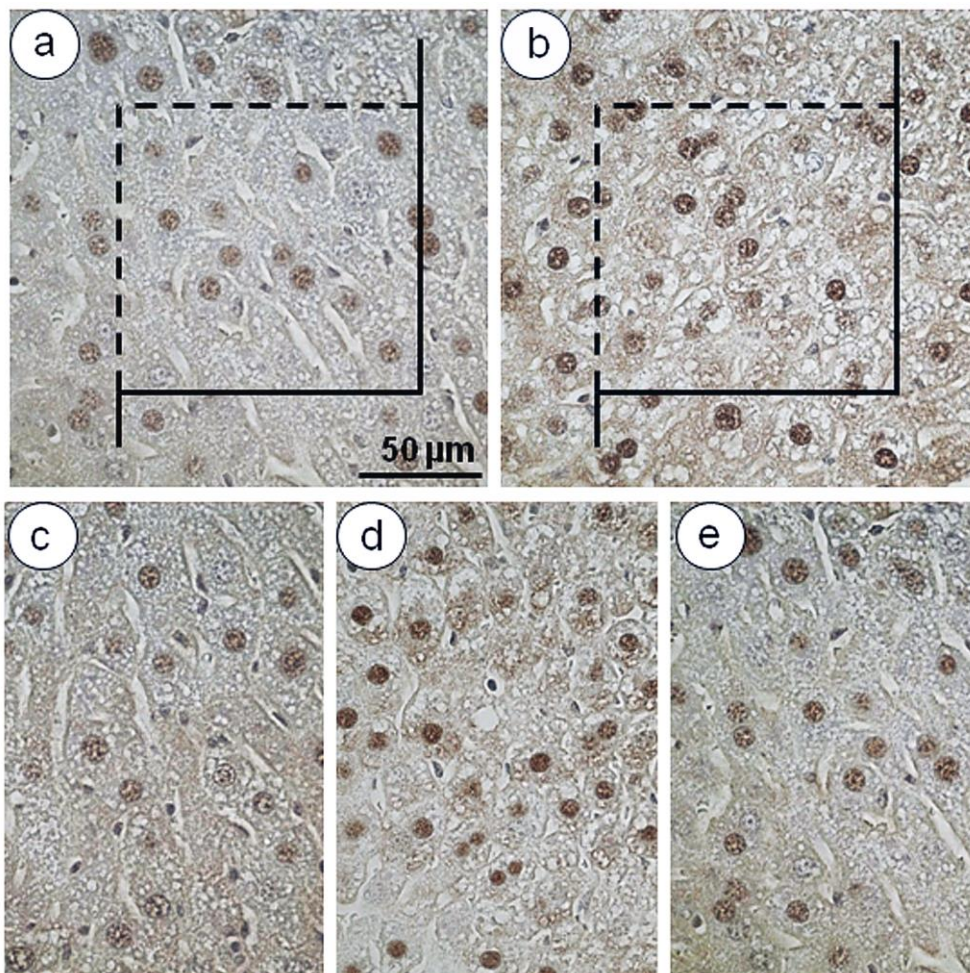


Figura 14 –Imunomarcção para SREBP-1c no fígado dos animais 8 semanas após tratamento. Em (A), grupo dieta padrão (aumento de 40x, barra=50 µm).e (B), grupo dieta hiperlipídica, vemos a aplicação da área teste com dimensões conhecidas para quantificação de núcleos marcados e que não tocavam a linha proibida; (C) dieta HF tratado com rosuvastatina; (D) HF tratado com rosiglitazona e (E) HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona.

4.8 Western Blot

A expressão da proteína SREBP-1c no fígado de camundongos HF foi aumentada em 50% em comparação com o grupo SC ($P < 0,05$). Os animais alimentados com dieta HF tratados com rosuvastatina apresentaram diminuída a expressão de SREBP-1c quando comparado com o grupo HF (-50%, $P < 0,01$). O tratamento com rosiglitazona não reduziu a expressão de SREBP-1c, permanecendo com valores semelhantes ao grupo HF (Figura 15).

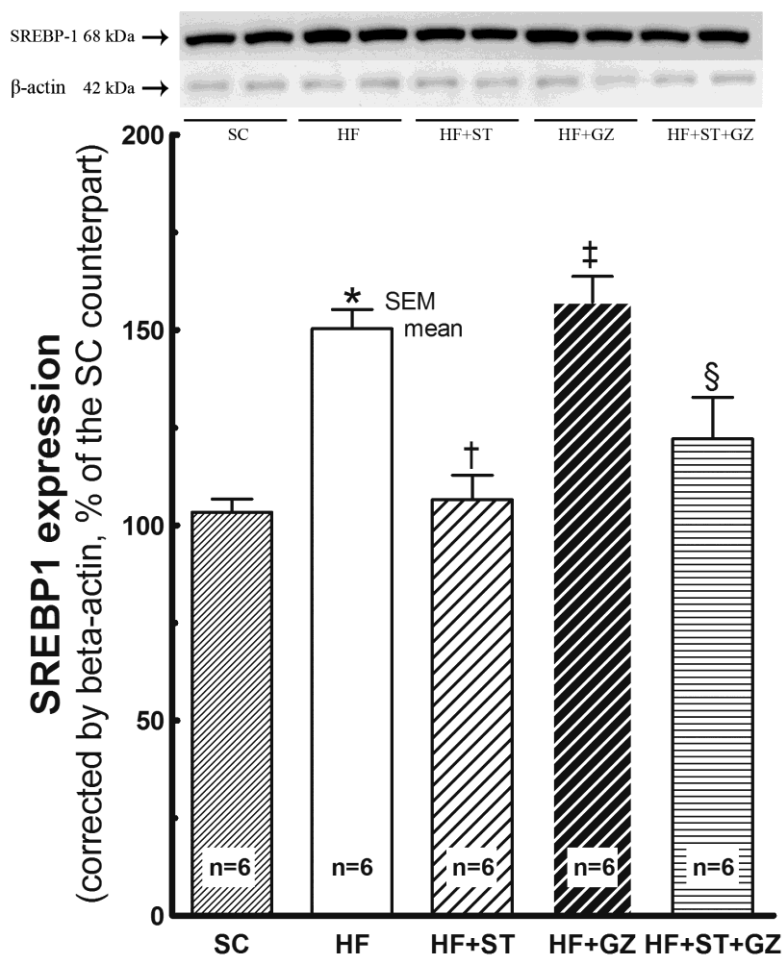


Figura 15 - Densidade óptica integral das bandas de western blotting para SREBP-1c mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média±EPM.

Paralelamente, a expressão PPAR- α no fígado foi reduzido em 67% nos camundongos HF em comparação com o grupo SC ($P < 0,05$). Embora os tratamentos em monoterapia tenham aumentado a expressão de PPAR- α , estes não foram eficazes o suficiente para diferir dos animais HF não tratados. O grupo HF+ST+GZ teve sua expressão hepática de PPAR- α aumentada, sendo diferente do grupo HF não tratado (Figura 16).

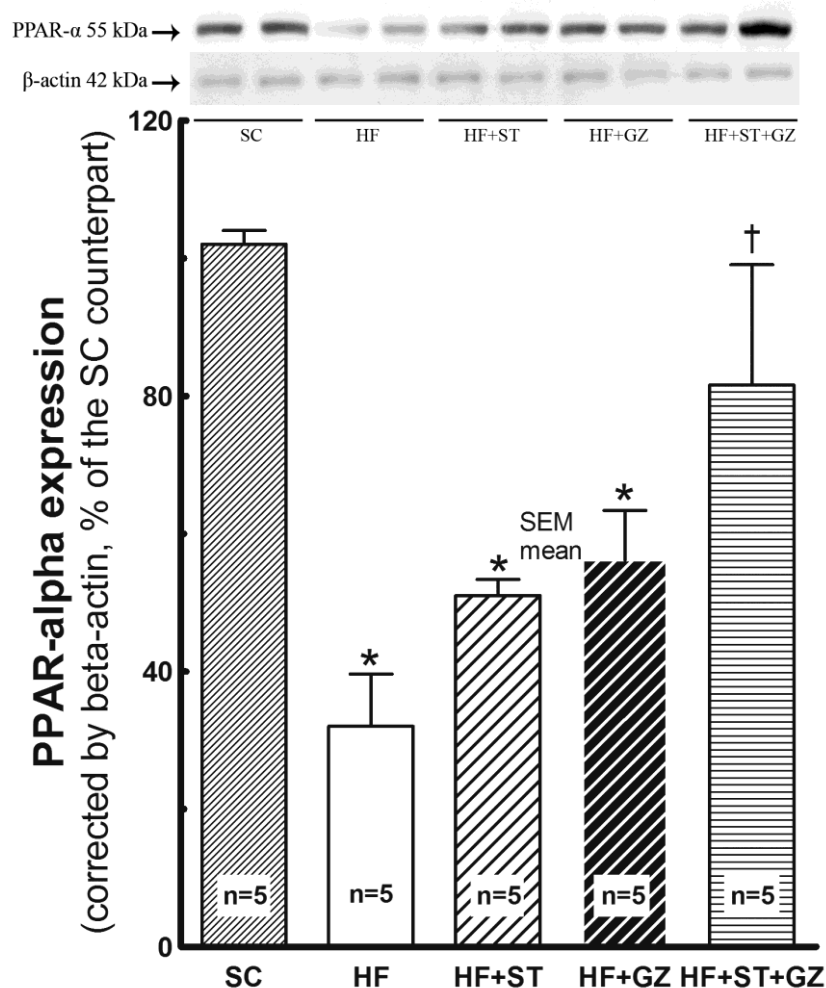


Figura 16 - Densidade óptica integral das bandas de western blotting para PPAR- α mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média \pm EPM.

Portanto, a relação SREBP1c/PPAR- α foi 43% maior nos grupo HF quando comparado com o grupo SC ($P < 0,05$). Os valores para a razão SREBP1c/PPAR- α foram equivalentes nos camundongos do grupo SC e nos animais alimentados com dieta HF tratados com ST ou ST+GZ. O grupo HF+GZ não foi eficiente na redução da razão SREBP1c/PPAR- α , sendo diferente do grupo SC e sem diferença significativa para o grupo HF não tratado (Figura. 17).

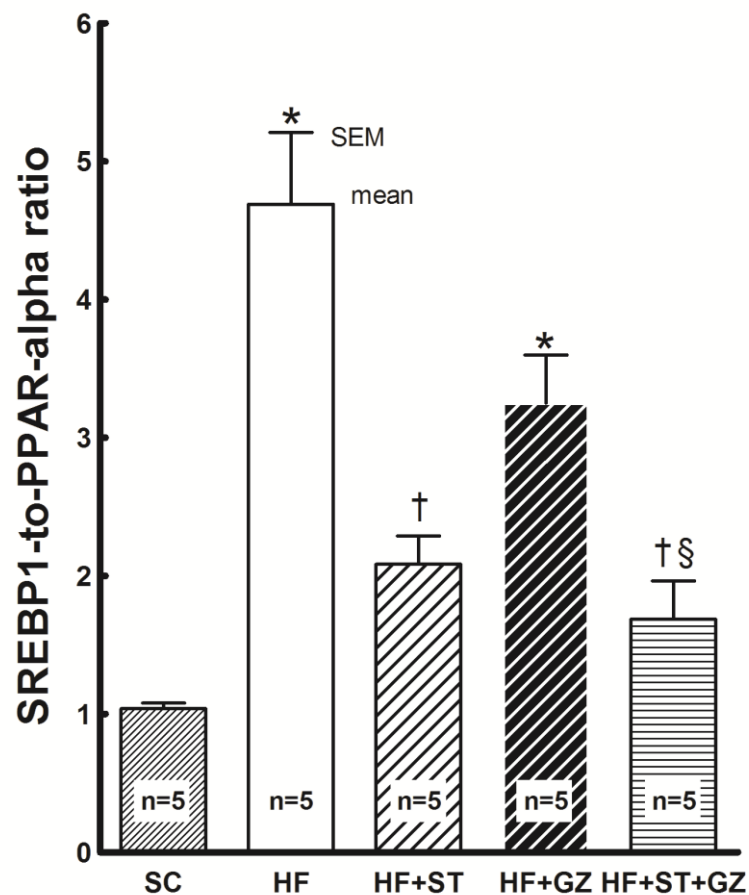


Figura 17 – Razão entre a Densidade óptica integral das bandas de western blotting de SREBP-1c e PPAR- α mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média±EPM.

A expressão da proteína GLUT-2 foi maior nos camundongos do grupo HF quando comparado ao grupo SC (+ 27%; $P < 0,01$). A expressão foi reduzida nos grupos HF + ST e HF+ST+GZ (- 30%; $P < 0,001$), sendo diferente do grupo HF não tratado (Figura 18).

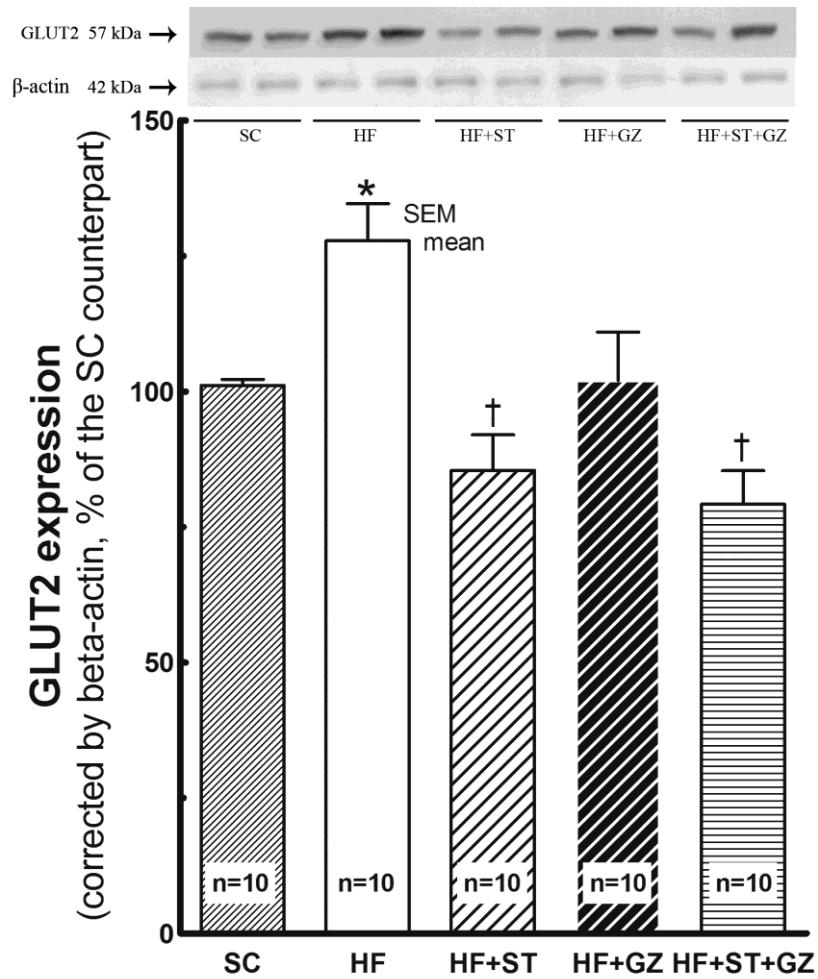


Figura 18 - Densidade óptica integral das bandas de western blotting para GLUT-2 mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média±EPM.

Além disso, a expressão de PPAR- γ foi reduzida nos camundongos HF não tratados quando comparado com o grupo SC (-36%, $P < 0,0001$). Os animais alimentados com dieta HF, tratados com rosiglitazona em monoterapia ou combinado à rosuvastatina, apresentaram aumento na expressão de PPAR- γ , com valores equivalentes aos camundongos do grupo SC (+36 % em HF+GZ, $P < 0,01$; +44% em HF+GZ+ST, $P < 0,01$; comparados com o grupo HF não tratados). Somente o grupo HF+ST não diferiu significativamente do grupo HF não tratado (Figura 19).

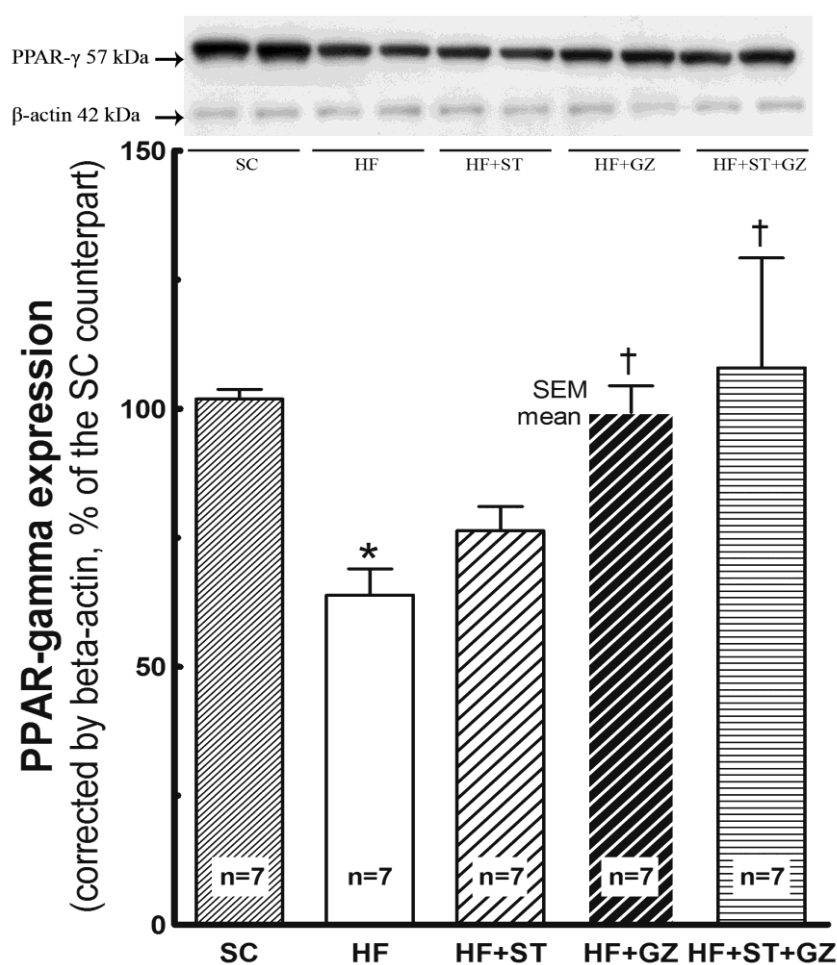


Figura 19 - Densidade óptica integral das bandas de western blotting para PPAR- γ mostrando diferenças significativas encontradas comparando o grupo SC e os grupos HF. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ quando comparado com (*) o grupo SC, (†) grupo HF, (‡) grupo HF+ST, e (§) grupo HF+GZ (one-way ANOVA e pós-teste de Tukey). Abreviaturas: grupo dieta padrão (SC); dieta hiperlipídica (HF); dieta HF tratados com rosuvastatina (HF+ST); HF tratados com rosiglitazona (HF+GZ), e HF tratados com rosuvastatina + rosiglitazona (HF+ST+GZ). Valores em média \pm EPM.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos que os animais alimentados com dieta HF tratados com rosuvastatina apresentam como efeitos pleiotrópicos melhora da sensibilidade à insulina, com redução da adiposidade e da esteatose comparado aos animais alimentados com dieta HF não tratados. A monoterapia com estatina induziu efeitos benéficos e diminuiu o grau de resistência à insulina em animais alimentados com dieta HF, avaliado pelo índice HOMA-IR. Além disso, o tratamento com estatina reduziu o ganho de massa corporal, melhorou os níveis circulantes de colesterol e triglicerídeos plasmáticos e ainda reduziu o triglicerídeo hepático, com concomitante redução da resistina e aumento da expressão sérica de adiponectina. Este é o primeiro relato da literatura demonstrando que a rosuvastatina reduz a esteatose hepática associada com a melhora da tolerância à glicose em modelo de resistência à insulina em roedores.

No presente estudo, o modelo de camundongo alimentado com dieta HF apresentou hipoadiponectinemia, com um aumento significativo no HOMA-IR, com hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, que mimetiza um fenótipo de resistência periférica à insulina. O aumento da massa corporal no camundongo C57BL/6 alimentado com uma HF se caracteriza por aumento na gordura visceral. A massa de gordura epididimária pode ser usada para estimar o percentual de gordura corporal, pois está fortemente correlacionado com a gordura corporal total (Rogers e Webb, 1980). O uso da dieta hiperlipídica aumenta o tamanho de adipócitos no tecido adiposo epididimário, e está associada com a obesidade hiperplásica (Strissel *et al.*, 2007).

O tecido adiposo é um órgão ativo da síndrome metabólica. A gordura visceral é conhecida por desempenhar importante papel nas disfunções metabólicas que ocorrem como consequência da obesidade. O tecido adiposo produz adipocinas, quimiocinas e citocinas, que são referidos coletivamente como adipocitocinas (Juge-Aubry *et al.*, 2005; Greenberg e Obin, 2006). Em adultos magros, as adipocinas, como a leptina e adiponectina, desempenham papel normal no metabolismo corporal. No entanto, em indivíduos obesos há aumento da leptina e redução da produção de adiponectina pelas células adiposas, estas adipocinas alteradas levam à infiltração de monócitos e macrófagos na gordura (Greenberg e Obin, 2006). Em

geral, o tecido adiposo intra-abdominal de roedores e humanos é suscetível à infiltração por macrófagos e é a maior fonte de mediadores inflamatórios. Desta forma, contribui de maneira intensa para algumas complicações metabólicas da obesidade, mais do que o tecido adiposo subcutâneo (Strissel *et al.*, 2007).

Os camundongos alimentados com dieta HF apresentaram hipertrofia dos adipócitos com um concomitante aumento nos níveis séricos de resistina, indicando o desenvolvimento da NAFLD e sua evolução para NASH (Tilg, 2010). É amplamente aceito que a supernutrição, principalmente através do consumo de uma dieta HF rica em gordura saturada, pode causar danos ao fígado pelo acúmulo de triglicerídeos, com elevação nos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas (Hanley *et al.*, 2005). Atualmente, com o aumento da incidência de NAFLD em todo o mundo, esta se tornou uma das formas mais comuns de doença que acometem o fígado, e é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (Khashab *et al.*, 2008), caracterizada por resistência à insulina como o fator determinante da associação entre obesidade e esteatose hepática.

Nosso estudo mostrou que a rosuvastatina pode melhorar a sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta HF e está de acordo com outros estudos em animais (Lalli *et al.*, 2008; Naples *et al.*, 2008) e humanos (Tzefos e Olin, 2011). Mais especificamente, o tratamento com estatina está associado com uma melhora na ação da insulina, com um aumento do substrato receptor de insulina IRS 1 e com ativação das vias PI3K e Akt no fígado e músculos do camundongos alimentados com dieta HF, em paralelo, com uma diminuição na via inflamatória relacionada à resistência à insulina (Lalli *et al.*, 2008).

Além disso, pela ativação das mesmas vias, as estatinas têm demonstrado melhorias na função endotelial por mecanismos independentes do colesterol. Estes efeitos pleiotrópicos têm sido relacionados com o aumento do NO. As estatinas através do aumento da fosforilação da eNOS através da via da PI3-cinase, com ativação da proteína Akt, nas células endoteliais (Liao e Laufs, 2005), promovem um aumento na expressão de eNOS, levando à fosforilação do eNOS e aumento do NO. O efeito das estatinas sobre a Akt parece ser específico das células endoteliais, uma vez que não se verifica a activação da Akt nas células musculares lisas cardíacas (Murata *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, os resultados relevantes na melhora da sensibilidade à insulina foram associados com menor HOMA-IR e redução da área sob a curva do

IPITT. Apesar de produzir efeitos menos acentuados nos parâmetros de resistência à insulina, comparado ao tratamento combinado de rosuvastatina e rosiglitazona, os efeitos do tratamento em monoterapia com rosuvastatina foram mais significativos para o retardo no desenvolvimento do diabetes tipo II, pois estas alterações foram acompanhadas por uma redução no ganho de peso. Além disso, também observamos diminuição nos depósitos de gordura abdominal associados à redução dos níveis de resistina nos animais HF+ST em comparação com aos animais do grupo HF ou camundongos tratados em monoterapia com GZ. Portanto, a rosuvastatina diminui os níveis circulantes de resistina, com concomitante redução na adiposidade. Essas observações estão em conformidade com estudos que mostraram aumento dos níveis séricos e na expressão dos genes relacionados à resistina nos depósitos de gordura abdominal durante estados aumentados de adiposidade (Kusminski *et al.*, 2005).

O presente estudo também apresenta níveis elevados de leptina plasmática no grupo HF. Em contraste, a monoterapia com ST teve efeitos benéficos com redução dos níveis de leptina plasmática, que se correlaciona com remodelamento benéfico do tecido adiposo, com reduzido diâmetro dos adipócitos e uma relação gordura subcutânea/gordura visceral semelhante ao grupo SC. A leptina é em grande parte produzido por tecido adiposo. Em camundongos, a expressão da leptina é maior em gordura visceral enquanto que em humanos, a leptina apresenta um nível de maior expressão no tecido adiposo subcutâneo (Trayhurn *et al.*, 1995). O acúmulo de triglicérido hepático e o aumento nas concentrações de triglicédeos no plasma do grupo HF observada neste estudo pode ser atribuída em parte pela entrada diminuída de leptina nas células, em adição a resistência à insulina, a resistência à leptina (Chitturi *et al.*, 2002). A leptina atua como um sensor de massa gorda e um regulador da homeostase energética (Tessari *et al.*, 2009). A leptina exerce ações no cérebro e nos tecidos periféricos, como o pâncreas e o fígado, e pode prevenir o acúmulo de lipídios nos tecidos não adiposos (Kahn *et al.*, 2005) através da modulação da beta-oxidação hepática (Minokoshi *et al.*, 2002). Outra atividade importante da leptina é sua ação reguladora sobre a expressão de SREBP-1c (Unger e Orci, 2001).

Esse efeito benéfico da leptina depende de fatores como a sensibilidade à insulina e do efeito da leptina em si. Por outro lado, na forma comum da obesidade, onde ocorre à resistência à leptina, esta pode promover o armazenamento ectópico

de lipídios, em órgãos como fígado e pâncreas, que pode, por sua vez, prejudicar ainda mais a sensibilidade à insulina (Ahima *et al.*, 2006). Outro achado importante do presente estudo é que a esteatose hepática foi eficientemente tratada por rosuvastatina.

O tratamento com rosuvastatina promoveu uma forte redução da expressão de SREBP-1c, com diminuída lipogênese e reduzida esteatose hepática em comparação com os grupos HF e HF+GZ. Além disso, nos fígados do grupo HF, o fator de transcrição pró-lipogênico SREBP-1c foi 50% maior em comparação com os camundongos da dieta SC, caracterizando uma indução significativa da lipogênese e com isso o armazenamento ectópico de lipídios. Diversos mecanismos podem ser responsáveis pelo armazenamento ectópico de lipídios no fígado. Além do fator leptina, temos ação da SREBP-1c, com sua atividade reguladora dependente do estado nutricional. Os ácidos graxos saturados encontrados em dietas hiperlipídicas aumentam fortemente a expressão hepática de SREBP-1c, possivelmente por causa da capacidade de ácidos graxos saturados em promover inflamação, aumentando o stress oxidativo e a probabilidade de evolução da NAFLD para NASH (Aragno *et al.*, 2009; Shimano, 2009). Além disso, dietas ricas em gordura induzem lipogênese por aumentar a atividade de SREBP-1c, com um concomitante aumento na expressão de alvos a jusante do SREBP (Strable e Ntambi, 2010).

O excesso de gordura promove uma rápida estimulação da “*de novo*” lipogênese e com isso um acúmulo ectópico de lipídios no fígado (Unger e Orci, 2001; Aragno *et al.*, 2009). Relacionado a isso, quando há redução da esteatose hepática, ocorre concomitantemente uma melhora no metabolismo da glicose e da resistência à insulina. A resistência à insulina se desenvolve quando um defeito no receptor da insulina ou pós-receptor alteram a sinalização para a translocação do GLUT para a membrana a fim de permitir a internalização e utilização glicose por células da periferia (Petersen e Shulman, 2006a). No presente estudo, a expressão hepática de GLUT-2 foi significativamente menor no grupo HF-ST, sugerindo a normalização da sinalização da insulina pós-receptor e da restauração da sinalização não apenas em nível hepático, mas também uma melhora global da sensibilidade à insulina. Na NAFLD, espera-se que ocorra um aumento da expressão de GLUT2 no fígado, como claramente demonstrado na esteatose hepática induzida em células humanas (HepG2) incubadas *in vitro* em meio de cultura com alta concentração de ácido oleico (Okamoto *et al.*, 2002). Em situações

de hiperglicemia, o GLUT2 aumenta no fígado, como resultado da ativação do fator de transcrição SREBP-1c (Im *et al.*, 2005). O grupo HF não tratada teve a maior expressão GLUT-2, em acordo com o estado de NAFLD e apenas o tratamento com rosuvastatina foi eficaz melhorar a sensibilidade à insulina, resultando em reduzida expressão de GLUT-2.

O PPAR- γ é um membro da subfamília de receptores de hormônio nuclear PPAR, cuja ativação promove adipogênese, melhora a sensibilidade à insulina, e que leva ao desenvolvimento de esteatose hepática como um efeito a jusante da ativação do fator SREBP-1c e da super-regulação das enzimas lipogênicas. O aumento da regulação da lipogênese observado no grupo HF+GZ pode ser devido à ação da rosiglitazona como um agonista PPAR- γ (Staels e Fruchart, 2005). Diferentemente da GZ, o tratamento com ST reduziu significativamente a expressão de SREBP-1c, com maior expressão de PPAR- α e com isso interferiu no padrão de armazenamento de tecido adiposo e no acúmulo de gordura ectópica. Embora GZ aumente a expressão de PPAR- α e adiponectina, apenas a ST modificou a relação gordura visceral/ gordura subcutâneo. Além disso, a ST alterou a relação das proteínas SREBP1c/PPAR- α , tendo como resultado uma proporção semelhante ao encontrado no grupo SC. Essas descobertas são consistentes com estudos em pacientes obesos, que demonstram um aumento da razão SREBP1c/PPAR- α e a incidência de resistência à insulina, sendo esta uma condição que pode favorecer a lipogênese sobre a oxidação de ácidos graxos, levando a um quadro de esteatose (Pettinelli *et al.*, 2009).

O PPAR- α é um fator de transcrição que super-regula as enzimas oxidativas como a carnitina palmitoyltransferase-1 e acil CoA oxidase (Schoonjans *et al.*, 1996). Recentes estudos mostraram que a menor expressão do PPAR- α no fígado, sem alteração significativa na expressão da SREBP-1c foi observada na NAFLD (Nakamuta *et al.*, 2005; Kohjima *et al.*, 2007). Além disso, a expressão do PPAR- α no fígado foi positivamente correlacionada com os níveis de adiponectina plasmática em pacientes obesos resistentes à insulina com NAFLD, enquanto que a expressão de PPAR- α foi negativamente associada com HOMA-IR. Portanto, a hipoadiponectinemia em indivíduos obesos pode prejudicar a função hepática do PPAR- α (Pettinelli *et al.*, 2009).

Os PPARs têm um papel importante na homeostase assim como na regulação da resposta inflamatória (Vidal-Puig *et al.*, 1997; Cunard *et al.*, 2004) e

estudos recentes revelam que estes podem igualmente contribuir para os efeitos pleiotrópicos das estatinas. As estatinas através dos PPAR α e PPAR γ induzem o aumento da transcrição dos PPAR γ , inibem a indução lipopolissacarídea do TNF- α e a proteína quimioatrativa do monócito tipo 1 (MCP-1). Estas diminuem ainda a atividade transcricional do NF κ B e da proteína activadora 1 (Yano *et al.*, 2007). As estatinas também evidenciam atividade anti-inflamatória inibindo a expressão de genes inflamatórios induzida pelos lipopolissacarídeos (LPS) através de um mecanismo dependente da proteína-quinase C dos PPAR α (Blanquart *et al.*, 2004; Paumelle *et al.*, 2006). Outros efeitos pleiotrópicos foram atribuídos à modulação do receptor nuclear PPAR- α , o qual, à semelhança da isoforma SREBP-1c, exerce acção reguladora no metabolismo lipídico (no fígado e músculo) e na homeostasia da glicose (Lefebvre *et al.*, 2006).

A rosuvastatina é um medicamento cujo seus benefícios no tratamento da dislipidemia são bem conhecidos e os nossos resultados estão de acordo com outros estudos. Nossos dados também mostram uma clara redução no colesterol plasmático e os níveis de triglicéridos no grupo HF+ST em comparação com o grupo HF. Estes resultados foram associados com reduzida síntese de triglicéridos e a menor produção de partículas de VLDL pelo fígado. Outro trabalho demonstrou ocorrer simultaneamente em camundongos tratados com rosuvastatina um aumento na excreção hepática de ácidos biliares, colesterol e fosfolipídios, sugerindo que a rosuvastatina induz a um redirecionamento do transporte de lipídios no fígado (Delsing *et al.*, 2005).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica:

- Promove aumento da massa corporal;
- Causa resistência à insulina (incremento da área sob a curva do TOTG, TITI e valores maiores de HOMA-IR);
- Conduz ao desenvolvimento esteatose hepática, com aumento no conteúdo de triglicérido e na expressão de SREBP-1c e redução da expressão de PPAR- α no fígado; concomitante ao aumento na expressão do GLUT-2 no fígado;
- Leva ao incremento na imunomarcagem de SREBP-1c.
- Promove hiperinsulinemia, hiperleptinemia, aumento dos níveis de resistina e hipoadiponectinemia;
- Aumenta o colesterol total e o triglicérido plasmático;
- Promove aumento nos depósitos de gordura visceral e hipertrofia dos adipócitos;

O tratamento com rosuvastatina:

- Reverte o sobrepeso quando administrado em monoterapia ou em associação com a rosiglitazona;
- Promove redução nos depósitos de gordura visceral e reduz o diâmetro dos adipócitos;
- Normaliza o colesterol total e o triglicérido plasmático;
- Trata a hiperinsulinemia, hiperleptinemia e reduz os níveis de resistina;
- Reverte a resistência à insulina quando em monoterapia ou em associação com a rosiglitazona, normalizando a área sob a curva do TOTG e TITI e produzindo valores normais de HOMA-IR; A associação com a rosiglitazona reduz a área sob a curva do TOTG e TITI, se igualando ao grupo controle;
- Reduz o percentual de esteatose hepática quando administrada em monoterapia ou combinada com a rosiglitazona;

- Reduz a massa do fígado, concomitante com menor conteúdo de triglicérido no fígado;
- Reduz significativamente a expressão de SREBP-1c e aumenta ligeiramente a expressão de PPAR- α no fígado; Com isso, reduz significativamente a razão SREBP1c/PPAR- α ; Concomitante a redução do GLUT-2 no fígado;
- Leva à menor imunomarcagem de SREBP-1c.

O tratamento com rosiglitazona:

- Não altera parâmetros de massa corporal;
- Reverte a resistência à insulina quando em monoterapia, normalizando a área sob a curva do TOTG e TITI e produzindo valores normais de HOMA-IR;
- Trata a hiperinsulinemia e aumenta a adiponectina. Reduz ligeiramente a hiperleptinemia, sem diferença significativa;
- Quando em associação com rosuvastatina, intensifica a redução da esteatose hepática;
- Aumenta a expressão de PPAR- γ e aumenta ligeiramente a expressão de PPAR- α no fígado. Contudo, somente a associação com rosuvastatina exhibe expressão do PPAR- α com diferença para o grupo HF;
- Reduz o diâmetro dos adipócitos em relação ao grupo HF, porém sem se igualar ao grupo controle.

Concluindo, o modelo do camundongo alimentado com dieta HF mimetiza a resistência à insulina humana, dentro de um ambiente metabólico de risco propício para o surgimento da doença cardiovascular, ou seja, a obesidade, hipertrigliceridemia, inflamação e NAFLD, através da ingestão de uma dieta hiperlipídica. Tratamentos farmacológicos são estratégias viáveis para reverter a resistência à insulina e controlar o impacto econômico causado pela atual pandemia de SM. O presente estudo demonstrou que há uma diminuição significativa na expressão de adiponectina, com aumento de SREBP-1c nos fígados de camundongos com esteatose hepática, sugerindo a importância da via funcional desta adipocinas. Rosuvastatina foi eficaz em melhorar a resistência à insulina e reverter a esteatose hepática, além de diminuir a adiposidade. Além disso, a ST

reduziu o ganho de massa corporal, com melhora nos níveis circulantes de colesterol plasmático e triglicerídeos e reduziu conteúdo de triglicerídeo hepático, com concomitante redução nos níveis resistina e aumento da adiponectina plasmática. Este é o primeiro trabalho demonstrando que a rosuvastatina melhora esteatose hepática, com evidência histopatológica de resposta da NAFLD ao tratamento com rosuvastatina em um modelo experimental com resistência à insulina.

REFERÊNCIAS

Abbasi F, Chang SA, Chu JW, Ciaraldi TP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Reaven PD. Improvements in insulin resistance with weight loss, in contrast to rosiglitazone, are not associated with changes in plasma adiponectin or adiponectin multimeric complexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290:R139-144.

Abdelmalek MF, Diehl AM. De novo nonalcoholic fatty liver disease after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007a; 13:788-790.

Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007b; 91:1125-1149, ix.

Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22:1129-1133.

Aguila MB, Fernandes-Santos C, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. *Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease*. In: Molière J, Gauthier L, editors. *Insulin resistance: symptoms, causes and treatment*. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. p 1-44.

Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003a; 23:363-370.

Aguila MB, Pinheiro AR, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003b; 23:363-370.

Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* 2006; 55 Suppl 2:S145-154.

Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 1997a; 100:449-458.

Ahmad F, Considine RV, Bauer TL, Ohannesian JP, Marco CC, Goldstein BJ. Improved sensitivity to insulin in obese subjects following weight loss is accompanied by reduced protein-tyrosine phosphatases in adipose tissue. *Metabolism* 1997b; 46:1140-1145.

Akbar DH, Kawther AH. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: what we know and what we don't know. *Med Sci Monit* 2006; 12:RA23-26.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645.

Angulo P, Lindor KD. Insulin resistance and mitochondrial abnormalities in NASH: a cool look into a burning issue. *Gastroenterology* 2001; 120:1281-1285.

Aragno M, Tomasinelli CE, Vercellinatto I, Catalano MG, Collino M, Fantozzi R, Danni O, Boccuzzi G. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med* 2009; 47:1067-1074.

Averna M, Missault L, Vaverkova H, Farnier M, Viigimaa M, Dong Q, Shah A, Johnson-Levonas AO, Taggart W, Brudi P. Lipid-altering efficacy of switching to ezetimibe/simvastatin 10/20 mg versus rosuvastatin 10 mg in high-risk patients with and without metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res* 2011; 8:262-270.

Bakri R, Wang J, Wierzbicki AS, Goldsmith D. Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure. *Int J Cardiol* 2003; 91:107-109.

Ballantyne CM, Stein EA, Paoletti R, Southworth H, Blasetto JW. Efficacy of rosuvastatin 10 mg in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2003; 91:25C-27C; discussion 28C.

Begrache K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6:1-28.

Bezerra DG, Lacerda Andrade LM, Pinto da Cruz FO, Mandarim-de-Lacerda CA. Atorvastatin attenuates cardiomyocyte loss in adult rats from protein-restricted dams. *J Card Fail* 2008; 14:151-160.

Bezerra DG, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of simvastatin and pravastatin treatment on adverse cardiac remodelling and glomeruli loss in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108:349-355.

Bieri JG. AIN-76 diet. *J Nutr* 1979; 109:925-926.

Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000; 129:823-834.

Black BL, Croom J, Eisen EJ, Petro AE, Edwards CL, Surwit RS. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism* 1998; 47:1354-1359.

Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2004; 18:1906-1918.

Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem* 1997; 272:29698-29703.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-340.

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH): further expansion of this clinical entity? *Liver* 1999; 19:263-264.

Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; 33:68-71.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-2474.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36:485-501.

Caldwell GW, Masucci JA, Yan Z, Hageman W. Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: can human CL, Vss and t1/2 be predicted from in-vivo rat data? *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 29:133-143.

Campo VL, Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Quim. Nova* 2007; 30:425-430.

Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J* 2005; 19:136-138.

Caro JF, Ittoop O, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jenquin M, Silverman JF, Khazanie PG, Sinha MK. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. *J Clin Invest* 1986; 78:249-258.

Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:365-373.

Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. [Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51:195-203.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459:477-485.

Ceriello A, Johns D, Widel M, Eckland DJ, Gilmore KJ, Tan MH. Comparison of effect of pioglitazone with metformin or sulfonylurea (monotherapy and combination therapy) on postload glycemia and composite insulin sensitivity index during an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:266-272.

Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:17-21.

Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36:403-409.

Cohen D. European regulatory body recommends suspension of rosiglitazone. *BMJ* 2010; 341:c5291.

Colandré M, Diez R, Bernal C. Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model. *Br J Nutr* 2003; 89:631-638.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81:243-248.

Costa MV, Fernandes-Santos C, Faria TD, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr* 2011. Doi:10.1007/s00394-011-0196-1

Coutinho JG, Gentil PC, Toral N. Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24:S332-S340.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378:785-789.

Cunard R, Eto Y, Muljadi JT, Glass CK, Kelly CJ, Ricote M. Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 2004; 172:7530-7536.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111:1448-1454.

Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; 109:III39-43.

Deedwania P, Barter P, Carmena R, Fruchart JC, Grundy SM, Haffner S, Kastelein JJ, LaRosa JC, Schachner H, Shepherd J, Waters DD. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: analysis of the Treating to New Targets study. *Lancet* 2006; 368:919-928.

DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:667-687.

Delsing DJ, Post SM, Groenendijk M, Solaas K, van der Boom H, van Duyvenvoorde W, de Wit EC, Bloks VW, Kuipers F, Havekes LM, Princen HM. Rosuvastatin reduces plasma lipids by inhibiting VLDL production and enhancing hepatobiliary lipid excretion in ApoE*3-leiden mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45:53-60.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444:881-887.

Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodes-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008.

Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33:138-144.

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999; 103:253-259.

Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukic L, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4539-4550.

Eguchi Y, Mizuta T, Sumida Y, Ishibashi E, Kitajima Y, Isoda H, Horie H, Tashiro T, Iwamoto E, Takahashi H, Kuwashiro T, Soejima S, Kawaguchi Y, Oda Y, Emura S, Iwakiri R, Ozaki I, Eguchi T, Ono N, Anzai K, Fujimoto K, Koizumi S. The pathological role of visceral fat accumulation in steatosis, inflammation, and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2011; 46 Suppl 1:70-78.

Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S412-416.

Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5:27-42.

Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Liepvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferre P, Foulle F. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 1999; 19:3760-3768.

Franzen LE, Ekstedt M, Kechagias S, Bodin L. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod Pathol* 2005; 18:912-916.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.

Furnsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia* 2002; 45:1211-1223.

Gadja AM, Pellizon MA, Ricci MR, Ulman EA. Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models. *Animal Lab News* 2007.

Garcia-Ruiz I, Rodriguez-Juan C, Diaz-Sanjuan T, Martinez MA, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology* 2007; 46:414-423.

Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* 2002; 10:956-963.

Ginsberg HN. REVIEW: Efficacy and mechanisms of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:383-392.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 1995; 95:2195-2204.

Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:461S-465S.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:367-377.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111:219-227.

Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2412-2421.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Jr., Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005; 54:3140-3147.

Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16:230-236.

Henriksen JH, Ring-Larsen H. Rosiglitazone: possible complications and treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Hepatol* 2008; 48:174-176.

Holness MJ, Fryer LG, Sugden MC. Protein restriction during early development enhances insulin responsiveness but selectively impairs sensitivity to insulin at low concentrations in white adipose tissue during a later pregnancy. *Br J Nutr* 1999; 81:481-489.

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5987-5992.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-668.

Hung YJ, Lin SH, Pei D, Kuo SW, Hsieh CH, He CT, Hsing Lee C, Fan SC, Sheu WH. Rosiglitazone improves insulin sensitivity in nonobese subjects with impaired glucose tolerance: the role of adiponectin and C-reactive protein. *Metabolism* 2006; 55:439-444.

Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330:280-289.

Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. *Metabolism* 1996; 45:1539-1546.

Im SS, Kang SY, Kim SY, Kim HI, Kim JW, Kim KS, Ahn YH. Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes* 2005; 54:1684-1691.

Istvan ES. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases: related enzymes with distinct architectures. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11:746-751.

Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins (Review). *Int J Oncol* 2003; 23:1055-1069.

Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27:412-421.

Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19:547-566.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; 1:15-25.

Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, Malinski T. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. *Circulation* 2002; 105:933-938.

Kawai M, Sousa KM, MacDougald OA, Rosen CJ. The many facets of PPARgamma: novel insights for the skeleton. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299:E3-9.

Kendrach MG, Kelly-Freeman M. Approximate equivalent rosuvastatin doses for temporary statin interchange programs. *Ann Pharmacother* 2004; 38:1286-1292.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E745-751.

Khashab MA, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10:73-80.

Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1272-1282.

Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamuta M. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007; 20:351-358.

Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Enjoji M, Takayanagi R, Nakamuta M. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2008; 21:507-511.

Kopelman PG, Caterson ID, Dietz WH. *Clinical obesity in adults and children*, 3rd ed: Blackwell Publishing Limited, 2010: 502 p.

Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21:89-104.
Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109:243-256.

Lalli CA, Pauli JR, Prada PO, Cintra DE, Ropelle ER, Velloso LA, Saad MJ. Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism* 2008; 57:57-65.

Larsen TM, Toubro S, Astrup A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:147-161.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116:571-580.

Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:335-363.

Liao JK. Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:624-629.

- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:89-118.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:502-509.
- Liu J, Jin X, Yu CH, Chen SH, Li WP, Li YM. Endoplasmic reticulum stress involved in the course of lipogenesis in fatty acids-induced hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25:613-618.
- Lu LG, Zeng MD, Li JQ, Hua J, Fan JG, Fan ZP, Qiu DK. Effect of lipid on proliferation and activation of rat hepatic stellate cells (I). *World J Gastroenterol* 1998; 4:497-499.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.
- Mannucci E, Monami M, Di Bari M, Lamanna C, Gori F, Gensini GF, Marchionni N. Cardiac safety profile of rosiglitazone: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *Int J Cardiol* 2010; 143:135-140.
- Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1513-1517.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850.
- Marques CM, Motta VF, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43:467-475.
- Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 2002; 62:1463-1480.
- Mattson DL. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am J Hypertens* 2001; 14:405-408.
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:7-18.
- McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:9-14.
- Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:1118-1123.
- Mills E, Kuhn CM, Feinglos MN, Surwit R. Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1993; 264:R73-78.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 415:339-343.
- Miyazaki Y, Mahankali A, Wajcberg E, Bajaj M, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4312-4319.

Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, Al-Haddad W, Dhindsa S, Dandona P. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2728-2735.

Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:767-772.

Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001; 414:821-827.

Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, de Castro IR, Cannon G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutr* 2011; 14:5-13.

Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:105-113.

Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Fujiki T, Takeshita A. Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42:118-124.

Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:193-205.

Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H, Karaki H, Ozaki H. Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2335-2342.

Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, Enjoji M. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2005; 16:631-635.

Naples M, Federico LM, Xu E, Nelken J, Adeli K. Effect of rosuvastatin on insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance: evidence for statin-induced hepatic insulin sensitization. *Atherosclerosis* 2008; 198:94-103.

Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:1240-1249.

Neto-Ferreira R, Novaes Rocha V, da Silva Torres T, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Beneficial effects of rosuvastatin on aortic adverse remodeling in nitric oxide-deficient rats. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63:473-478.

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-1219.

Nishikimi T, Tadokoro K, Wang X, Mori Y, Asakawa H, Akimoto K, Yoshihara F, Horio T, Minamino N, Matsuoka H. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, inhibits cardiac myocyte hypertrophy induced by endothelin. *Eur J Pharmacol* 2002; 453:175-181.

Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; 356:2457-2471.

Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. *Hepatol Res* 2002; 23:138-144.

Pan HJ, Lin Y, Chen YE, Vance DE, Leiter EH. Adverse hepatic and cardiac responses to rosiglitazone in a new mouse model of type 2 diabetes: relation to dysregulated phosphatidylcholine metabolism. *Vascul Pharmacol* 2006; 45:65-71.

Pan HJ, Reifsnyder P, Vance DE, Xiao Q, Leiter EH. Pharmacogenetic analysis of rosiglitazone-induced hepatosteatosis in new mouse models of type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:1854-1862.

Parekh PI, Petro AE, Tiller JM, Feinglos MN, Surwit RS. Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism* 1998; 47:1089-1096.

Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, Percevault F, Fruchart JC, Dombrowicz D, Glineur C, Staels B. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 2006; 98:361-369.

Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006a; 119:S10-16.

Petersen KF, Shulman GI. New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy. *Obesity (Silver Spring)* 2006b; 14 Suppl 1:34S-40S.

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism* 2004; 53:454-457.

Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Korn O, Maluenda F, Diaz JC, Rencoret G, Braghetto I, Castillo J, Poniachik J, Videla LA. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:1080-1086.

Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 1992; 54:885-909.

Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:447-452.

Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9:299-314.

Popkin B. The nutrition transition and obesity in developing world. *J Nutr* 2001; 131:871S-873S.

Qurashi S, Mynarcik DC, McNurlan MA, Ahn H, Ferris R, Gelato MC. Importance of the high molecular weight isoform of adiponectin in improved insulin sensitivity with rosiglitazone treatment in HIV disease. *Clin Sci (Lond)* 2008.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1:785-789.

Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E, Grimaldi A, Poynard T. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 2008; 135:100-110.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-1607.

Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1993; 42:1405-1409.

Reeves PG. AIN-76 diet: should we change the formulation? *J Nutr* 1989; 119:1081-1082.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993a; 123:1939-1951.

Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 1993b; 123:1923-1931.

Reifsnyder PC, Leiter EH. Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice. *Diabetes* 2002; 51:825-832.

Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:319-326.

Rizos CV, Milionis HJ, Kostapanos MS, Florentin M, Kostara CE, Elisaf MS, Liberopoulos EN. Effects of rosuvastatin combined with olmesartan, irbesartan, or telmisartan on indices of glucose metabolism in Greek adults with impaired fasting glucose, hypertension, and mixed hyperlipidemia: a 24-week, randomized, open-label, prospective study. *Clin Ther* 2010; 32:492-505.

Robertson RP. Beta-cell deterioration during diabetes: what's in the gun? *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20:388-393.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996; 97:2859-2865.

Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr* 1980; 43:83-86.

Rosenson RS. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; 1:495-505.

Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, Suzuki S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:176-183.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.

Samaras K, Kelly PJ, Chiano MN, Spector TD, Campbell LV. Genetic and environmental influences on total-body and central abdominal fat: the effect of physical activity in female twins. *Ann Intern Med* 1999; 130:873-882.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005; 45:828-833.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26:57-60.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302:93-109.

Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20:665-679.

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 2001; 15:2099-2111.

Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamiss A. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens* 2007; 20:206-210.

Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341:248-257.

Shimano H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J* 2009; 276:616-621.

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999a; 274:30028-30032.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b; 96:13656-13661.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999c; 401:73-76.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000; 6:77-86.

Sinha MK, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D, Caro JF. Insulin-receptor kinase activity of adipose tissue from morbidly obese humans with and without NIDDM. *Diabetes* 1987; 36:620-625.

Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7:456-465.

Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119:239-250.

Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Gungor T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res* 2003; 18:88-96.

Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005; 54:2460-2470.

Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL. Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr* 2000; 83 Suppl 1:S85-90.

Storlien LH, Huang XF, Lin S, Xin X, Wang HQ, Else PL. Dietary fat subtypes and obesity. *World Rev Nutr Diet* 2001; 88:148-154.

Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; 45:199-214.

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56:2910-2918.

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; 44:645-651.

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; 37:1163-1167.

Surwit RS, Seldin MF, Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN. Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes* 1991; 40:82-87.

Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351:191-199.

Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169:846-860.

Tan MH, Glazer NB, Johns D, Widell M, Gilmore KJ. Pioglitazone as monotherapy or in combination with sulfonylurea or metformin enhances insulin sensitivity (HOMA-S or QUICKI) in patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin* 2004; 20:723-728.

Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363:1341-1350.

Tasci I, Dogru T, Ercin CN, Erdem G, Sonmez A. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:266-267; author reply 267-268.

Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 1999; 97:9-12.

Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19:291-302.

Thigpen JE, Setchell KD, Saunders HE, Haseman JK, Grant MG, Forsythe DB. Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 2004; 45:401-416.

Thorens B, Charron MJ, Lodish HF. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 1990; 13:209-218.

Tilg H. Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease: key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis. *Curr Pharm Des* 2010; 16:1893-1895.

Tousoulis D, Charakida M, Stefanadi E, Siasos G, Latsios G, Stefanadis C. Statins in heart failure. Beyond the lipid lowering effect. *Int J Cardiol* 2007; 115:144-150.

Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett* 1995; 368:488-490.

Tzefos M, Olin JL. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor use in chronic liver disease: A therapeutic controversy. *Journal of Clinical Lipidology* 2011.

Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4:S28-32.

Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 2001; 15:312-321.

Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354:141-148.

van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Hauner H. HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin inhibits interleukin-6 expression and secretion in human adipocytes. *Horm Metab Res* 2003; 35:466-470.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99:2416-2422.

Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Woods JA. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine* 2009; 46:339-345.

Vijan S, Hayward RA. Pharmacologic lipid-lowering therapy in type 2 diabetes mellitus: background paper for the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2004; 140:650-658.

Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, Soria J, Hong L. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in *In vivo* models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:623-629.

Vogeser M, Konig D, Frey I, Predel HG, Parhofer KG, Berg A. Fasting serum insulin and the homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) in the monitoring of lifestyle interventions in obese persons. *Clin Biochem* 2007; 40:964-968.

Walt G. WHO's World Health Report 2003. *BMJ* 2004; 328:6.

Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006; 147:943-951.

Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14:193-199.

Weibel ER. *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press, 1979: p.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2003; 916:i-viii, 1-149, backcover.

Wierzbicki AS, Mikhailidis DP, Wray R, Schacter M, Cramb R, Simpson WG, Byrne CB. Statin-fibrate combination: therapy for hyperlipidemia: a review. *Curr Med Res Opin* 2003; 19:155-168.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43:527-550.

Wong VW, Wong GL, Yip GW, Lo AO, Limquiaco J, Chu WC, Chim AM, Yu CM, Yu J, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. Coronary artery disease and cardiovascular outcomes in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2011.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:91-100.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 2007; 100:1442-1451.

Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004; 351:1106-1118.

Yki-Jarvinen H. The PROactive study: some answers, many questions. *Lancet* 2005; 366:1241-1242.

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2300-2308.

Zhang X, Young HA. PPAR and immune system--what do we know? *Int Immunopharmacol* 2002; 2:1029-1044.

Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard Wahlstrom E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39:1180-1189.

APÊNDICE A – Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed a high-fat diet.



Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet

Julio Cesar FRAULOB, Vanessa SOUZA-MELLO, Marcia Barbosa AGUILA and Carlos Alberto MANDARIM-DE-LACERDA

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Centre, State University of Rio de Janeiro, Brazil

A B S T R A C T

The aim of the present study was to evaluate the effects of ST (rosuvastatin) and GZ (rosiglitazone) on IR (insulin resistance) and on liver as well as adipose tissue in mice fed on an HF (high-fat) diet. Our data show that treatment with ST resulted in a marked improvement in insulin sensitivity characterized by enhanced glucose clearance during the insulin tolerance test and a 70% decrease in the HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) index level ($P = 0.0008$). The ST-treated mice exhibited lower gains in BM (body mass; -8% ; $P < 0.01$) and visceral fat pad thickness (-60% ; $P < 0.01$) compared with the untreated HF group. In comparison with HF-diet-fed mice, HF + ST-treated mice showed a significant reduction in hepatomegaly and liver steatosis (-6% , $P < 0.05$; and -21% , $P < 0.01$ respectively). In HF + ST-treated mice, the hepatic TAG (triacylglycerol) levels were reduced by 58% compared with the HF group ($P < 0.01$). In addition, the expression of SREBP-1c (sterol-regulatory-element-binding protein-1c) was decreased by 50% in the livers of HF + ST-treated mice ($P < 0.01$) relative to the HF-diet-fed mice. The levels of resistin were lower in the HF + ST-treated group compared with the HF group (44% less, $P < 0.01$). In conclusion, we demonstrated that ST treatment improved insulin sensitivity and decreased liver steatosis in mice fed on an HF diet. Furthermore, ST reduced BM gains, improved the circulating levels of plasma cholesterol and TAG, and reduced hepatic TAG, which was concomitant with lower resistin levels.

INTRODUCTION

Most overweight and obese individuals develop hepatic steatosis, which is characterized by increased lipid

[mainly TAG (triacylglycerol)] levels in the liver; hepatic steatosis leads to a condition known as NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) [1]. It is estimated that up to 70% of obese persons and subjects with T2DM

Key words: insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), obesity, rosuvastatin, sterol-regulatory-element-binding protein 1 (SREBP-1).

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AUC, area under the curve; BM, body mass; CVD, cardiovascular disease; GLUT, glucose transporter; GZ, rosiglitazone; HF, high-fat; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test; IR, insulin resistance; IRS, insulin receptor substrate; LDL, low-density lipoprotein; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; OGTT, oral glucose tolerance test; PPAR, peroxisome-proliferator-activated receptor; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SC, standard chow; SREBP, sterol-regulatory-element-binding protein; ST, rosuvastatin; TAG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; T2DM, Type 2 diabetes mellitus; TZD, thiazolidinedione.

Correspondence: Professor Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (email mandarim@uerj.br).

APÊNDICE B – A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies

Virchows Arch (2011) 459:477–485
DOI 10.1007/s00428-011-1147-1

ORIGINAL ARTICLE

A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies

Mariana Catta-Preta · Leonardo Souza Mendonça ·
Julio Fraulob-Aquino · Marcia Barbosa Aguilã ·
Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Received: 21 June 2011 / Revised: 24 August 2011 / Accepted: 26 August 2011 / Published online: 8 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The issue of adequately quantitatively evaluating hepatic steatosis is still unresolved. Therefore, we compared three methods of quantitative assessment. Two groups of mice ($n=10$ each) were fed standard chow (10% fat, SC group) or a high-fat diet (60% fat, HF group) for 16 weeks, and hepatic triglyceride (HT) and liver tissue were then studied. Paraplast-embedded tissues stained by hematoxylin and eosin (H-E) were compared to frozen sections stained by Oil Red-O (ORO). In addition, the volume density of steatosis ($V_v[\text{steatosis, liver}]$) was measured by point counting (P-C, sections H-E or ORO) or by image analysis (I-A, sections ORO). HT was significantly higher in the HF group (104% greater, $P=0.0004$) than in the SC group. With P-C and H-E, $V_v[\text{steatosis, liver}]$ was $4.80 \pm 0.90\%$ in the SC group and $33.50 \pm 3.17\%$ in the HF group (600% greater, $P<0.0001$). With P-C and ORO, $V_v[\text{steatosis, liver}]$ was $4.86 \pm 0.89\%$ in the SC group and $25.21 \pm 1.27\%$ in the HF group (420% greater, $P<0.0001$). With I-A and ORO, $V_v[\text{steatosis, liver}]$ was $4.17 \pm 0.85\%$ in the SC group and $23.35 \pm 1.58\%$ in the HF group (460% greater, $P<0.0001$). Correlations between $V_v[\text{steatosis, liver}]$ and HT were strong and significant in all methods. In conclusion, all methods were appropriate and reproducible. In P-C and H-E, there is a slight overestimation of steatosis in the HF animals in comparison to frozen sections and ORO; in frozen sections, differences between P-C and I-A are insignificant.

Keywords NAFLD · Assessment of steatosis · Semi-quantitative scaling · Point counting · Image analysis · Stereology

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (or NAFLD) is the most common liver disease in Western countries [1], affecting approximately 30% of the population of the USA and 75–100% of obese and morbidly obese people [2, 3]. Although initial characteristics are benign, NAFLD is the starting point of more serious diseases such as non-alcoholic steatohepatitis (or NASH), liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [4].

Steatosis can take either of two forms of pathologic anatomy, depending on the size of the lipid vesicles present. These are microvesicular steatosis, where fat is stored in multiple small vesicles, and macrovesicular steatosis, where fat is stored in a single large vesicle. In microvesicular steatosis, hepatocytes appear with a cytoplasm rich in small vesicles with multiple cores [5]. Not much is known about the pathogenesis of microvesicular steatosis, but, in general, it has a worse prognosis than does macrovesicular steatosis [6].

Non-invasive assessment of hepatic steatosis is possible and should be standardized [7]; both T1-weighted dual-echo magnetic resonance (MR) imaging and one-proton MR spectroscopy have excellent diagnostic accuracy as compared to ultrasonography and computed tomography [8]. Still, a liver biopsy is used to establish or confirm the diagnosis of a particular type of liver disease, as well as for staging disease severity. Although a liver biopsy is considered the “gold standard” to assess hepatic steatosis and steatohepatitis, it is not without practical difficulties and controversies [7, 9]. Overall, a biopsy is still very useful because it provides information about the prognosis of the disease its proper clinical management [10, 11].

M. Catta-Preta · L. S. Mendonça · J. Fraulob-Aquino ·
M. B. Aguilã · C. A. Mandarim-de-Lacerda (✉)
Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular
Diseases, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro,
Av 28 de Setembro 87 fls,
20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: mandarim@uerj.br
URL: www.lmm.cuerj.br

ANEXO– Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEA/018/2010 sobre "*Efeitos da monoterapia ou em associação de Rosiglitazona (agonista PPAR γ) e Rosuvastatina (estatina) em camundongos C57BL/6 com dieta hiperlipídica (modelo de síndrome metabólica)*", sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 30/03/2010. Este certificado expira em 30/03/2014.

Rio de Janeiro, 30 de Março de 2010.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof. Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Tel. 2587-8

f.898