



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

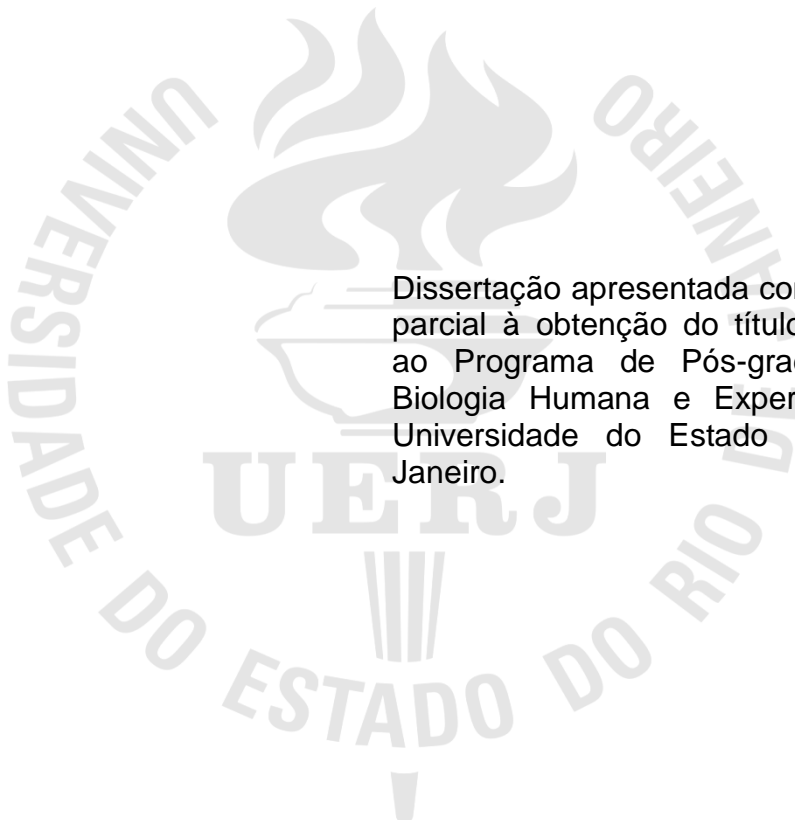
Thatiany de Souza Marinho

**Rosuvastatina, doença hepática gordurosa não alcoólica e ativação
das células estreladas hepáticas em camundongos**

Rio de Janeiro
2015

Thatiany de Souza Marinho

Rosuvastatina, doença hepática gordurosa não alcoólica e ativação das células estreladas hepáticas em camundongos



Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre 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

2015

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

M337 Marinho, Thatiany de Souza.
Rosuvastatina, doença hepática gordurosa não alcoólica e
ativação das células estreladas hepáticas em camundongos /
Thatiany de Souza Marinho. – 2015
65 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Fígado gorduroso - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Hepatopatia Gordurosa não Alcoólica. 4. Células Estreladas do Fígado. 5. PPAR alfa. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.391

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thatiany de Souza Marinho

Rosuvastatina, doença hepática gordurosa não alcoólica e ativação das células estreladas hepáticas em camundongos

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de agosto de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Leonardo de Souza Mendonça
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

Para a minha família, em especial ao meu filhote.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe (Dona Helena) e minha avó (Maria Aliano, vulgo nhé-nhé), que me proporcionaram todo o suporte para a realização não só do mestrado, mas sim, de todas as conquistas da minha vida. A vocês expresso o meu maior agradecimento.

Ao meu irmão Thiago, por estar por perto nos bons e maus momentos que passamos e olha que não foram poucos.

Ao meu marido Marcio Viana Soares que merece uma medalha por me aturar todos estes anos e que nestes dois últimos tem sofrido bastante, obrigado por seu apoio e companheirismo para a realização das minhas conquistas.

A pessoa mais importante da minha vida, meu filhote Felipe Marinho, que eu amo muito e sofre um bocado comigo em casa, “se mamãe mandar você estudar não reclame, pois este será seu bem mais valioso”.

A minha Grande Família (tias, primos e primas, sobrinhos, cunhadas e agregados) meu muito obrigada pelas festas, brigas e risadas e por fazerem parte da minha vida. É como diz a música “Está família é muito unida; e também muito ouriçada; brigam por qualquer razão, mas, acabam pedindo perdão...”

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por me guiar nestes 14 anos e por ajudar na minha conquista profissional e intelectual. Parafraseando Isaac Newton “Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes”.

À Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda, obrigada pelos ensinamentos e puxões de orelhas, pois sei que faz isso por ser importar bastante.

À Prof.^a Dr. Sandra Barbosa da Silva (Sibitinha) meu muito obrigado, pela paciência, puxões de orelha, risadas e por exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer.

Às minhas filhotas científicas Adriana Kawasaki, Thais Duarte, Thais Baptista e Andreza, meu muito obrigada pelos momentos de risadas, estudos e trabalho.

As amigas, filhas e irmãs Francielle e Fernanda Ornellas obrigado por serem meus anjos da guarda me ajudando, auxiliando ou aconselhando nos momentos de tristezas, alegrias, angústias e ansiedade, sem vocês tudo seria mais difícil.

A Vanessa, por todos estes anos de convívio, amizade, ensinamentos e divãs, obrigada. Aos meus amigos Helder e Verônica obrigado, pelas risadas, discussões, brigas, resumindo obrigado por serem o “ovo da minha marmita”. Ao amigo D’angelito, obrigado pelas conversas, conselhos, risadas, ensinamentos e pelo seu divã espontâneo. Agradeço à Tati Faria e Isabelita, por todos os anos de reclamações, risadas e conversas. Vocês são umas figuras. À Aline Penna pelo companheirismo e aconselhamento técnico na execução do WB e PCR.

Muito obrigada à Celina, Victor, André, Thereza, Tamiris, Wilian, Jorge, Thais Ceciliano, Fabiane, Flavia, Guilherme, Carol, Raul, Gezileia (Leia) e Michele, pelo companheirismo, conversas, risadas e estresses durante estes anos, pois sei que fui extremamente chata com alguns.

Aos muitos alunos de iniciação científica que tive o prazer de conhecer e perturbar, meu muito obrigado.

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Mesmo distante, sinto uma imensa saudade de vocês” (autor desconhecido) dedico esta frase aos amigos da secretaria e anatômico(Ciro, Fernandinha, Tio Luis Carlos e Carlinhos) a família LMMC antiga (Alê (minha filhota), Dani, Bianca, Leo, Alini Schultz, Jessica, Júlio Cesar, Claudinha, Carol, Geraldo, Thiago, Catta-Preta e muitos outros que tive o prazer de conhecer) e atual, por todos estes anos de aprendizado, ensinamentos e muitas, mas muitas risadas que tive durante estes 14 anos, meu muito obrigada.

Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons, mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.

Bertolt Brecht

RESUMO

MARINHO, Thatiany de Souza. **Rosuvastatina, doença hepática gordurosa não alcoólica e ativação das células estreladas hepáticas em camundongos.** 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Introdução: A atual epidemia de obesidade tem chamado a atenção para a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Atualmente não existe um medicamento para o tratamento da esteatose hepática, embora as estatinas sejam muito prescritas para pacientes obesos, este medicamento destina-se ao tratamento da hipercolesterolemia. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da rosuvastatina em um modelo de obesidade induzida por dieta, como foco principal a DHGNA e os marcadores hepáticos da lipogênese e beta-oxidação e ativação de células estreladas hepáticas (CEHs) em camundongos. **Métodos:** Camundongos machos C57BL/6 receberam dieta padrão (SC, 10% de energia como lipídios) ou dieta rica em gorduras (HF, 50% de energia como lipídios) durante 12 semanas. Em seguida, 7 semanas de tratamento, foram feitas, formando os grupos: SC, SCR (SC + rosuvastatina), HF e HFR (HF + rosuvastatina). As análises bioquímicas e técnicas moleculares foram aplicadas para abordar os resultados plasmáticos e moleculares. **Resultados:** O grupo HF apresentou maiores valores de insulina, colesterol total, triglicerídeos e leptina que o grupo SC, todos os quais foram reduzidos significativamente após o tratamento com Rosuvastatina no grupo HFR. O grupo HF apresentou maior percentual de esteatose, assim como maior ativação das CEHs, enquanto que a rosuvastatina provocou uma redução de 21% na esteatose hepática e atenuou a ativação das CEHs no grupo HFR. Em concordância com os achados histológicos, as expressões de SREBP-1 e PPAR-gama foram aumentados nos animais HF e reduzido após o tratamento no grupo HFR. Por outro lado, a expressão reduzida de PPAR-alfa e CPT-1 foram encontrados nos animais HF, sendo tais parâmetros restaurados após o tratamento no grupo HFR. **Conclusão:** A rosuvastatina atenua significativamente a ativação das células estreladas na obesidade induzida por dieta, afetando o equilíbrio dos PPARs na lipotoxicidade. Diante desses achados a Rosuvastatina pode ser indicada como alternativa para auxiliar o tratamento da esteatose hepática.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica. Células estreladas hepáticas. Rosuvastatina. PPAR. CPT-1.

ABSTRACT

MARINHO, Thatiany de Souza. **Rosuvastatin, non-alcoholic fatty liver disease and activation of hepatic stellate cells in mice**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Background & Aims: The current obesity epidemic has called attention to the most common hepatic obesity feature, the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). There is no drug for treating NAFLD, though statins are greatly prescribed for obese patients. This work aimed to investigate the effects of Rosuvastatin in a model of diet-induced obesity and NAFLD, focusing on hepatic markers of lipogenesis and beta-oxidation and activation of HSCs in mice. **Methods:** Male C57BL/6 mice received a standard chow diet (SC, 10% energy as lipids) or high-fat diet (HF, 50% energy as lipids) for 12 weeks, followed by 7 weeks of treatment, forming the groups: SC, SCR (SC + Rosuvastatin), HF and HFR (HF + Rosuvastatin). Biochemical analyzes and molecular techniques were applied to address the plasma and molecular outcomes. **Results:** HF group had higher insulin, total cholesterol, triacylglycerol and leptin levels than SC group, all of which were significantly diminished by rosuvastatina in HFR group. HF group showed greater steatosis than SC group and activated hepatic stellate cells (HSCs), whereas rosuvastatin elicited a 21% decrease in steatosis and greatly inhibited the HSCs activation in HFR group. In agreement to histological findings, SREBP-1 and PPAR γ expression were increased in HF animals and reduced after the treatment in HFR group. By contrast, low PPAR α and CPT-1 expression were found in HF animals, being restored by the treatment in HFR group. **Conclusion:** Rosuvastatin has the advantage of significantly inhibit the activation of HSCs in diet-induced obesity, by affecting PPAR balance to counter lipotoxicity. Rosuvastatin should be thought to treat hepatic steatosis.

Keywords: Non- alcoholic fatty liver disease. Hepatic stellate cells. Rosuvastatin. PPAR. CPT-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Obesidade central e suas alterações metabólicas e inflamatórias.....	18
Figura 2 –	Mecanismo de acúmulo de gordura hepática.....	20
Figura 3 –	Representação esquemática do modelo <i>double hit</i> na patogênese da DHGNA.....	21
Figura 4 –	Alterações fenotípicas da célula estrelada hepática durante lesões agudas e crônicas.....	25
Figura 5 –	Morfologia das células estreladas hepáticas no fígado.....	26
Figura 6 –	Estrutura química das estatinas, inibidoras da HMG-CoA redutase.....	27
Figura 7 –	Resumo do mecanismo de ação das estatinas na via do Mevalonato.....	28
Figura 8 –	Desenho experimental.....	32
Figura 9 –	Sistema teste gerado pelo software <i>Stepanizer</i>	35
Figura 10 –	Massa corporal e gordura abdominal dos animais estudados.....	41
Figura 11 –	Fotomicrografias do parênquima hepático	46
Figura 12 –	Estrutura hepática	47
Figura 13 –	Bandas representativas da expressão hepática de anti-alfa actina de musculo liso.....	48
Figura 14 –	Expressão de proteínas no fígado.....	49
Figura 15 –	Medição quantitativa de q RT-PCR dos genes expressos no fígado.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais segundo recomendação da AIN-93M.....	32
Tabela 2 – Primes usados no estudo.....	38
Tabela 3 – Comportamento alimentar e bioquímica.....	43
Tabela 4 – Dados do fígado.....	45
Tabela 5 – Análise estatística de dois fatores.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	Alfa actina de músculo liso
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CHE	Células estreladas hepáticas
CPT1	Carnitina palmitoil transferase A
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DP	Desvio padrão
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FAS	Ácido graxo sintase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAT/CD36	Transportador de ácidos graxos translocase
GGT	Gama glutamil transpeptidase
HF	Dieta hiperlipídica (<i>High-fat</i>)
HFR	Dieta hiperlipídica (<i>High-fat</i>) tratado com Rosuvastatina
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A redutase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEC	Matriz extracelular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
RER	Reticulo endoplasmático rugoso

RNA	Ácido ribonucléico
qRT- PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
SC	Dieta padrão (<i>Standard chow</i>)
SCR	Dieta padrão (<i>Standard chow</i>) com Rosuvastatina
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SREBP1-c	Proteína de ligação ao elemento regulador do esteroI
TBS-T	Tampão salina com Tris
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UA	Unidade arbitrária
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
Vigitel	Vigilância de fatores de risco e proteção para Doenças Crônicas por inquérito telefônico
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Obesidade	17
1.2	Doença hepática gordurosa não alcoólica	19
1.3	Células Estreladas Hepáticas	24
1.4	Estatinas	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Geral	30
2.2	Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Animais, dietas e medicamentos	31
3.2	Teste oral de tolerância a glicose	33
3.3	Eutanásia e bioquímica	33
3.4	Determinação das concentrações de lipídios plasmáticos	33
3.5	Insulina, leptina e adiponectina	34
3.6	Fígado	34
3.6.1	<u>Estrutura</u>	34
3.6.2	<u>Bioquímica</u>	35
3.6.3	<u>Células Estreladas Hepáticas</u>	36
3.6.4	<u>Western Blot</u>	36
3.6.5	<u>qRT-PCR</u>	37
3.6.6	<u>Análise estatística</u>	38
4	RESULTADOS	40
4.1	Massa corporal	40
4.2	A Rosuvastatina melhora o metabolismo da glicose	40
4.3	A rosuvastatina controla os níveis de lipídios	41
4.4	Adipocinas	42
4.5	Fígado	44
4.5.1	<u>Massa hepática, colesterol e triacilglicerol</u>	44
4.5.2	<u>As enzimas hepáticas</u>	44

4.5.3	<u>Arquitetura do fígado e células estreladas</u>	45
4.5.4	<u>Análises moleculares</u>	48
5	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO A – Comitê de ética e pesquisa.....	64
	ANEXO B – Termo de submissão do artigo científico à publicação.....	65

INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) é uma alteração clínico patológica caracterizada pelo acúmulo de triacilglicerol nos hepatócitos, que está fortemente correlacionada com o aumento da prevalência mundial da obesidade (Ahmed et al., 2012; Berlanga et al., 2014). A DHGNA é o resultado do aumento da deposição ectópica de triacilglicerol no tecido hepático (Adams e Angulo, 2005). Essa está intimamente ligada à resistência periférica à insulina e aumento da lipólise no tecido adiposo branco abdominal, sendo que ambos desencadeiam a lipogênese hepática e prejudicam a beta-oxidação hepática (Angulo, 2005). Apesar da DHGNA e esteatohepatite não alcoólica (EHNA) serem questionadas como um fator definitivo de risco para o câncer de fígado (Duan et al., 2014), os dados da literatura em longo prazo são explícitos em demonstrar que a DHGNA progride para doença hepática avançada, incluindo cirrose, com uma mortalidade mais elevada do que o esperado e incidência de câncer hepatocelular (Michelotti et al., 2013; Onnerhag et al., 2014). Neste processo, a ativação de células estreladas hepáticas (CEH) e o aumento da síntese de colágeno causam fibrose hepática (Li et al., 2008).

Atualmente, não existem medicamentos para o tratamento da DHGNA, no entanto, as estatinas, a classe de drogas mais amplamente prescrita em todo o mundo para o tratamento da hipercolesterolemia (Lin et al., 2015; Svensson et al., 2015), incluindo crianças (Braamskamp et al., 2015), têm sido considerada para o tratamento da esteatose hepática (de Keyser et al., 2014). As estatinas atuam na inibição da síntese de colesterol endógeno através do bloqueio da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), seus efeitos pleiotrópicos incluem redução de esteatose hepática e a melhora da resistência à insulina hepática, diminuição dos níveis de triacilglicerol, inibição da reabsorção óssea e relaxamento do músculo cardíaco (Averna et al., 2011; Fraulob et al., 2012; Ridker et al., 2012). Embora a DHGNA e a EHNA sejam doenças comuns, nenhum fármaco eficaz está disponível para o tratamento das alterações das enzimas hepáticas e dos resultados adversos associados, no entanto, a literatura demonstra que a Rosuvastatina (Brunt et al., 1999) representa um agente redutor de lipídios eficaz em pacientes com síndrome metabólica agindo na redução

do colesterol e exercendo uma variedade de efeitos pleiotrópicos que podem resultar em benefícios clínicos (Liao e Laufs, 2005).

As CEH têm um papel decisivo na progressão da DHGNA em direção a EHNA, um estágio mais prejudicial da doença hepática devido à lipotoxicidade, sustentada pelo aumento do estresse oxidativo juntamente com o estado inflamatório (Sanyal, 2005; Tessari et al., 2009). O impacto da ativação de CEH sobre a síntese de colágeno produz grande suscetibilidade à fibrose hepática (Leclercq et al., 2007). Neste contexto, estudos recentes mostraram que as estatinas têm efeitos adicionais que melhoram a sensibilidade à insulina hepática em modelos animais e em humanos (Fraulob et al., 2012; Bostan et al., 2015). No entanto, a literatura é escassa, ao considerar o uso de estatinas em casos de DHGNA focando as CEH.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade, considerada como um único fator metabólico está em grande parte relacionada ao sedentarismo, sendo determinada por fatores ambientais, comportamentais, culturais, socioeconômicos, biológicos, dieta desequilibrada e predisposição genética, representando, um problema de saúde mundial crescente, mesmo em países em desenvolvimento. Sua prevalência tem aumentado dramaticamente nos últimos anos, atingindo proporções epidêmicas, visto que a atual abundância nutricional aliada a um estilo de vida sedentário torna-se cada vez mais comum entre crianças e adultos, sobretudo em idade reprodutiva (Kimm e Obarzanek, 2002; Alberti et al., 2006; Cantiello et al., 2015). O aumento da ingestão de alimentos ricos em gorduras reflete uma das possíveis causas da obesidade em todo mundo. Projeções para 2030 apontam que serão 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso (38%) e 1,12 bilhões de obesos (20%) na população adulta mundial (Kelly et al., 2008).

O sobrepeso e a obesidade são os principais fatores de risco para Síndrome Metabólica. De acordo com a OMS, em 2014, mais de meio bilhão de adultos apresentavam obesidade em todo o mundo¹. No Brasil, segundo o Vigitel 2014, 56,5% dos homens e 49,1% das mulheres apresentaram sobrepeso e 17,6% dos homens e 18,2% das mulheres apresentaram obesidade². O Brasil está acima da média global de obesidade, mas abaixo de países como Estados Unidos, Reino Unido, México e Bolívia. Nenhum país teve um declínio significativo da obesidade nos últimos 33 anos, o que representa um motivo de preocupação (Ng et al., 2014). Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, as despesas médicas relacionadas com essa patologia alcançaram o marco de 147 bilhões de dólares no mesmo período (Hammond e Levine, 2010), com estimativas de

¹ Organização Mundial da Saúde. Programme and Projects: Diabetes in World. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/en/html>>. Acesso em: 02 maio 2015.

² Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL). Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf> . Acesso em 05 maio 2015.

ultrapassarem a faixa de 957 bilhões de dólares em 2030 (Go et al., 2014). Todavia, o aumento na prevalência da obesidade não vem ocorrendo somente em países desenvolvidos, mas também em países em desenvolvimento, como o Brasil, caracterizando um importante problema de saúde pública (de Onis e Blossner, 2000).

O mecanismo básico do desenvolvimento da obesidade é uma condição de balanço energético positivo, no qual ocorre um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, sendo o acúmulo de energia estocado em forma de gordura. Esse excesso advém principalmente de alterações no metabolismo de carboidratos e gorduras que acabam armazenados como triacilglicerol nos adipócitos (Galgani e Ravussin, 2008). Estudos indicam que a presença da obesidade, principalmente a do tipo central, promove uma desregulação na homeostase corporal total e desencadeia um processo inflamatório crônico, elevando o risco de comorbidades a ela associadas, tais como: resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, doença cardiovascular e Diabetes Mellitus tipo 2 (Figura 1). A combinação de três dessas desordens, quando associadas em um indivíduo, pode ser nomeada de síndrome metabólica (Eckel et al., 2005).

Figura 1 - Obesidade central e suas alterações metabólicas e inflamatórias



Fonte: Adaptado de Catta-Preta, 2011.

Deste modo, a obesidade está relacionada ao funcionamento prejudicial e hipertrofia do tecido adiposo branco, órgão endócrino, capaz de produzir e liberar substâncias no organismo, com papel fundamental no estoque de lipídios para o fornecimento de energia. O tecido adiposo branco produz e secreta diversas proteínas e peptídeos bioativos, chamados coletivamente de adipocinas, as quais podem influenciar profundamente os processos metabólicos que participam da inflamação e da resposta do sistema imune, além de serem sensores do balanço energético. Dentre as adipocinas associadas às doenças crônicas merecem destaque: leptina, resistina, visfatina, fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6, inibidor do ativador de plaminogênio-1 e angiotensinogênio (Bastard et al., 2002; Faria TS et al., 2013). Com isso, foi descoberto que à medida que o adipócito aumenta de tamanho, aumenta também a produção e liberação destas citocinas. Conseqüentemente, há um aumento da massa corporal e um quadro pró-inflamatório pode ser instalado (Ristow et al., 1998).

1.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica

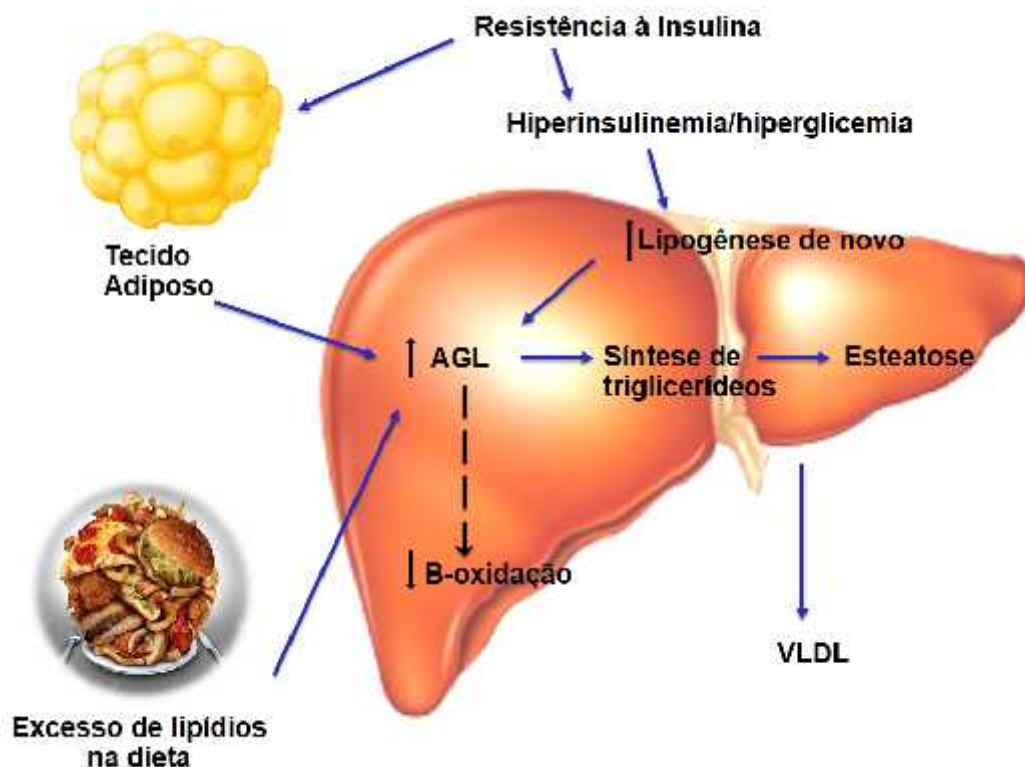
O fígado desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, na importação e fabricação de ácidos graxos livres (AGL), armazenamento e exportação de lipídios, sendo considerado com isso um órgão central do metabolismo. Portanto, um desequilíbrio em qualquer um destes processos pode levar ao desenvolvimento de DHGNA (Berlanga et al., 2014).

A DHGNA é um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência mundial (Angulo, 2007; Lazo e Clark, 2008). Atualmente é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica e fator de risco para doenças como: hipertensão arterial, Diabetes Mellitus tipo 2 e dislipidemia (Berlanga et al., 2014). A esteatose hepática é assintomática e pode ser detectada por meio de alterações nas enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT e gama-glutamil transpeptidase - GGT) ou por exame de imagem como a ultrassonografia (Dowman et al., 2011). A DHGNA é um termo utilizado para a esteatose hepática, com isso, a progressão da mesma pode levar a um quadro de EHNA, que envolve lesão hepatocelular e inflamação do fígado

(Wieckowska e Feldstein, 2008). A EHNA, quando não tratada progride para cirrose hepática e hepatocarcinoma (Kim e Younossi, 2008).

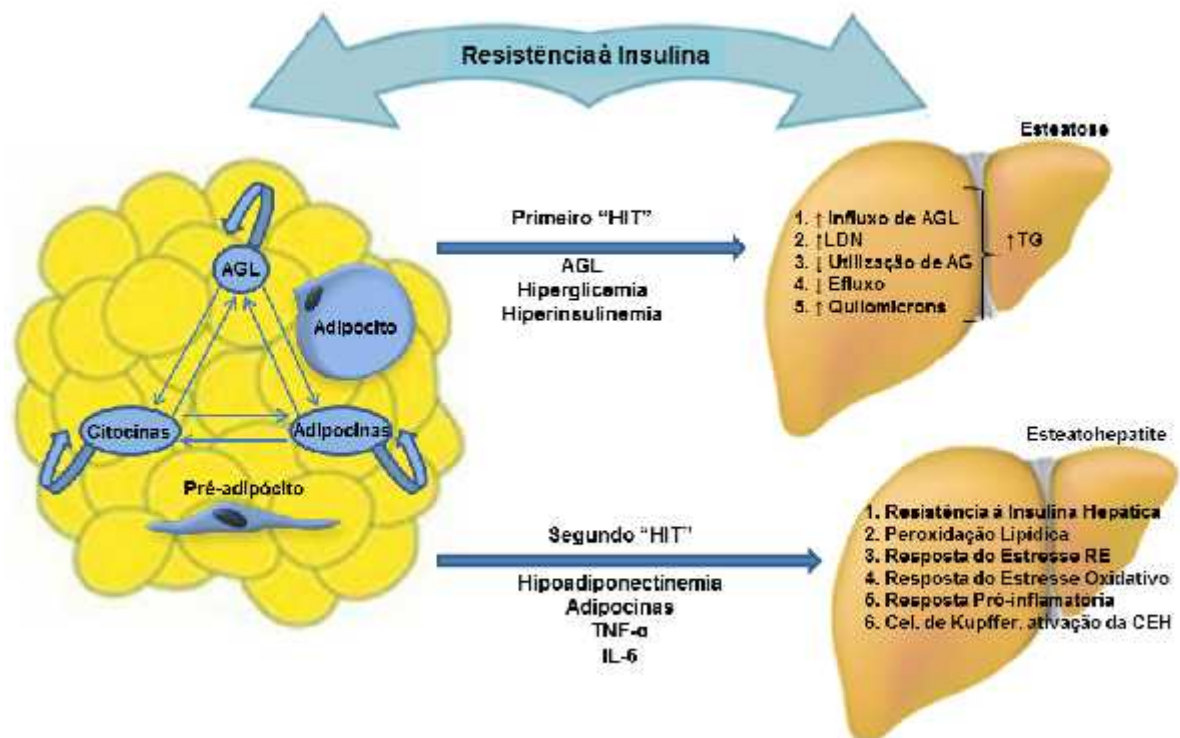
A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de triacilglicerol, os quais são formados a partir da esterificação de AGL e glicerol no hepatócito. AGL surgem no fígado a partir de três fontes distintas: lipólise (a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e AGL) no interior do tecido adiposo, fontes alimentares e da lipogênese de novo (Postic e Girard, 2008; Dowman et al., 2010). Em contraste, os AGL podem ser utilizados através da β -oxidação, reesterificação dos triacilglicerol e de armazenagem como gotículas lipídicas ou embaladas e exportadas como lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Assim, o acúmulo de gordura hepática pode ocorrer como um resultado do aumento da síntese, da entrada e da diminuição na exportação e oxidação da gordura (Postic e Girard, 2008), Figura 2. Ainda que a DHGNA e a ENHA permaneçam associadas, a patogênese da ENHA ainda não está totalmente explicada.

Figura 2 - Mecanismos de acúmulo de gordura hepática



A patogênese da DHGNA é muitas vezes interpretada pela hipótese de double-hit. O primeiro hit consiste no desenvolvimento da esteatose hepática (acúmulo de lipídios no fígado), a qual uma vez estabelecida promove adaptações de rotas sinalizadoras celulares frente aos níveis elevados de estresse oxidativo (Day e James, 1998), seguido por um segundo hit em que mediadores pró-inflamatórios levam à inflamação, lesão hepatocelular, e fibrose (Tacke et al., 2009; Jaeschke e Ramachandran, 2011). A Figura 3 esquematiza a teoria do double-hit para a esteatohepatite.

Figura 3 - Representação esquemática do modelo double-hit na patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)



Nota: O primeiro hit induz esteatose e aumenta a suscetibilidade do fígado para o segundo hit. A esteatose hepática resulta principalmente de um amplificado influxo de ácidos graxos livres (AGL), devido a um aumento da liberação de AGL dos depósitos de gordura. No fígado, este influxo de AGL é combinado com o aumento da lipogênese de novo, danificando a oxidação de ácidos graxos e suprimindo o efluxo pela VLDL. Tais eventos são favorecidos pela subjacente hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência hepática à insulina. A Gordura na dieta também contribui para o conteúdo hepático de triacilgliceroltotais (TG) através da entrega de quilomícrons a partir do intestino. O segundo hit causa a progressão para EHNA e é promovido pelos níveis plasmáticos elevados de TNF- α e IL-6, hiperleptinemia e hipo adiponectinemia. 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 EHNA.

Fonte: Adaptado de Kopelman, 2010.

Alterações funcionais e estruturais de mitocôndrias hepáticas afetam a oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias, aumentam a peroxidação lipídica em peroxissomos e microsossomos e o resultam no aumento do estresse oxidativo, fatos que já foram relatados em animais portadores de esteatose microvesicular (Rao e Reddy, 2004). Em decorrência da disfunção mitocondrial, há uma redução da oxidação de AGL, diminuição do citocromo C e da enzima carnitina palmitoil-CoA transferase-1 (CPT-1) no fígado. Em contrapartida, o excesso de lipídios no fígado promove a formação de espécies reativas de oxigênio, levando à peroxidação lipídica, inflamação e fibrose (Perez-Carreras et al., 2003; Serviddio et al., 2008). A oxidação de AGL nas mitocôndrias dos hepatócitos decorre de uma gama de substratos energéticos essenciais ao metabolismo e está via metabólica encontra-se reduzida na esteatose (Flamment et al., 2012).

Evidências indicam que a esteatose hepática relacionada à resistência à insulina é causada pelo acúmulo de proteína de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP-1c), que está elevada em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. A homeostase de lipídios em células é regulada pela SREBP-1c e o aumento da expressão da SREBP-1c nos casos de resistência à insulina promove acréscimo da transcrição de genes de enzimas envolvidas na síntese dos AGL, entre elas a acetilCoA carboxilase, que converte a acetilCoA em malonilCoA e a ácido graxo sintetase (FAS), que converte a malonilCoA em palmitato (Shimomura et al., 1999; Sakakura et al., 2001).

Sabe-se que a esteatose hepática em indivíduos sensíveis à insulina, estimula a produção de SREBP-1c em períodos pós-prandiais, quando há excesso de carboidrato circulante e níveis maiores de insulinemia (Sakakura et al., 2001; Zhang et al., 2014). Apesar de na resistência à insulina a maioria das ações desse hormônio ser comprometida, essa resistência à sua ação é seletiva e a capacidade da insulina em aumentar a produção de SREBP-1c é mantida. Logo, a expressão de SREBP-1c é proporcional à insulinemia, sendo maior nos casos de resistência à insulina, o que está associado ao aumento da lipogênese hepática, além da redução da oxidação mitocondrial de ácidos graxos (Shimomura et al., 1999; Smith e Adams, 2011).

Um importante alvo para NAFLD são os PPARs, que representam uma família de fatores de transcrição de receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomo. Assim sendo, atuam como sensores de ácidos graxos no controle de

muitos genes envolvidos na homeostase energética e da glicose, incluindo a diferenciação dos adipócitos, inflamação, metabolismo de lipoproteínas e oxidação de ácidos graxos. Os PPARs são expressos em diferentes tecidos e podem ser apresentar em três isotipos: alfa, beta e gama (Berger et al., 2005).

O isotipo alfa é expresso no fígado, coração, rins, músculo esquelético e intestino grosso. No fígado, desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico, induzindo a expressão de numerosos genes envolvidos na captação, ativação, transporte e oxidação de ácidos graxos, também é requerido na cetogênese. O PPAR-alfa é estimulado pela adiponectina e ativa seu gene alvo, a CPT-1 (Chakravarthy *et al.*, 2009).

O isotipo gama é expresso no tecido adiposo com grande intensidade, mas também se expressa no fígado, rins, intestino delgado, cólon, macrófagos, coração, e músculo esquelético, este último em muito baixa concentração. É o principal regulador no controle de genes envolvidos em vias lipogênicas, promovendo a captação de ácidos graxos e diferenciação de adipócitos (Kersten, 2002; Bellafante *et al.*, 2013). Aumento na expressão de PPAR-gama é uma característica da esteatose hepática e vários estudos o atribuem um papel causal por mecanismos que envolvem a ativação de genes lipogênicos e do GLUT2 (Pettinelli e Videla, 2011).

O aumento da SREBP-1c e do PPAR-gama induzem as vias lipogênicas, podendo ocorrer, concomitantemente à redução de PPAR-alfa e conseqüente diminuição da oxidação de ácidos graxos através da CPT-1, o que permite estabelecer uma razão entre os níveis desses fatores de transcrição (Pettinelli *et al.*, 2009). A diminuição da razão PPAR-alfa/SREBP-1c revela distúrbios metabólicos que favorecem a lipogênese ao invés da oxidação de ácidos graxos, provocando esteatose hepática, obesidade e resistência à insulina. Esta ação pró-esteatose pode ser reforçada pelo aumento na expressão de PPAR-gama, favorecendo a captação e transporte hepático de lipídios, o que representa um mecanismo lipogênico complementar à indução de SREBP-1c (Videla e Pettinelli, 2012).

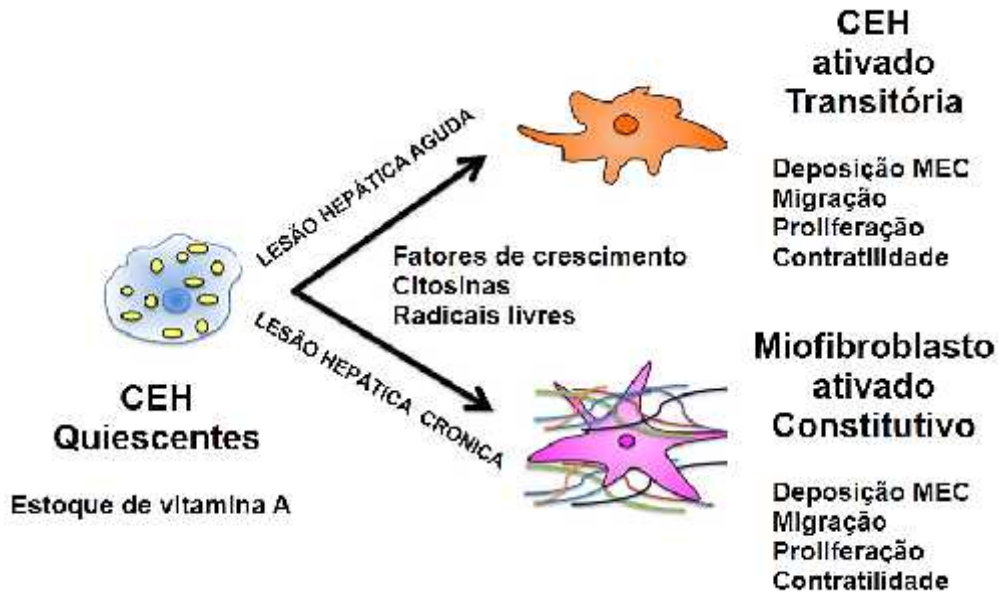
O FAT/CD36 é expresso numa grande variedade de células incluindo macrófagos, miócitos, adipócitos, enterócitos e hepatócitos. Esta proteína de transmembrana desempenha um papel importante na facilitação da absorção e tráfico intracelular dos AGL, bem como a esterificação do triacilglicerol no coração e células do músculo esquelético. Esta função é em grande parte dependente da sua

translocação de depósitos intracelulares para a membrana plasmática (Miquilena-Colina *et al.*, 2011). A expressão hepática FAT/CD36 é normalmente fraca, mas sua expressão é aumentada em roedores com esteatose hepática (Inoue *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores têm demonstrado que os níveis de RNAm FAT/CD36 aumentar concomitantemente com o aumento de triacilglicerol hepático em diferentes modelos de animais com esteatose hepática. No entanto, pouco se sabe sobre o significado do FAT/CD36 em doenças de fígado humano (Degrace *et al.*, 2006; Buque *et al.*, 2010; Berlanga *et al.*, 2014).

1.3 Células Estreladas Hepáticas

Evidências indicam que a ativação das CEH desempenha um papel-chave na iniciação da fibrose do fígado (Giraudi *et al.*, 2015). As CEH, também conhecidas como células de "Ito", perisinusoidais e células de armazenamento de gordura, se encontram quiescentes no espaço de Disse (localizado entre os hepatócitos e os sinusoides) armazenando vitamina A em gotículas lipídicas (Wake, 1971; Granzow *et al.*, 2014). Após lesão hepática, as células tornam-se ativas e adquirem uma morfologia do tipo miofibroblástico, que é caracterizado por uma exacerbada proliferação e secreção da matriz extracelular (Figura 4). A vitamina A armazenada é perdida e há um aumento na expressão alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) (Reeves *et al.*, 1996; Friedman, 2008b).

Figura 4 - Alteração fenotípica da célula estrelada hepática durante as lesões hepáticas agudas e crônicas

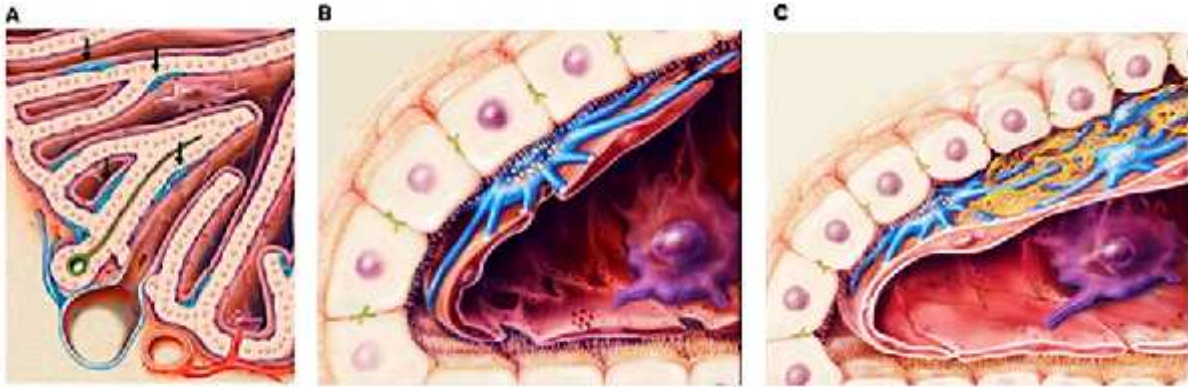


Legenda:: Após a lesão hepática, as CEHs transitórias adquirem um fenótipo ativado, que inclui síntese, proliferação e migração da matriz extracelular (MEC). CEH deslocam-se do espaço de Disse aos locais de dano onde a CEH ativada contribuir para a reparação dos tecidos ao produzir grande quantidade de colágeno. A exposição prolongada a uma lesão crônica ativa as CEHs constitutiva a se tornarem miofibroblastos, que induzem a deposição de MEC e fibrose no fígado.

Fonte: Adaptado de Yoshida e Matsuzaki, 2012.

As CEHs estão localizadas no espaço subendotelial, entre a superfície basolateral dos hepatócitos e o lado anti-luminal das células endoteliais sinusoidais. As CEH têm corpos celulares fusiformes com núcleos ovais ou alongados (Figura 5a), ultraestruturalmente, possui retículo endoplasmático rugoso (RER), pequeno complexo de Golgi justa-nuclear e proeminentes prolongamentos citoplasmáticos (Figura 5b) (Wake, 1980; Friedman, 2008a).

Figura 5 - Morfologia das células estreladas hepáticas no fígado



Legenda: A: diagrama do sinusóide hepático demonstrando a orientação relativa das células estreladas (em azul, indicado com setas) dentro da arquitetura sinusoidal. B: melhor resolução do desenho de células estreladas situada no espaço subendotelial.

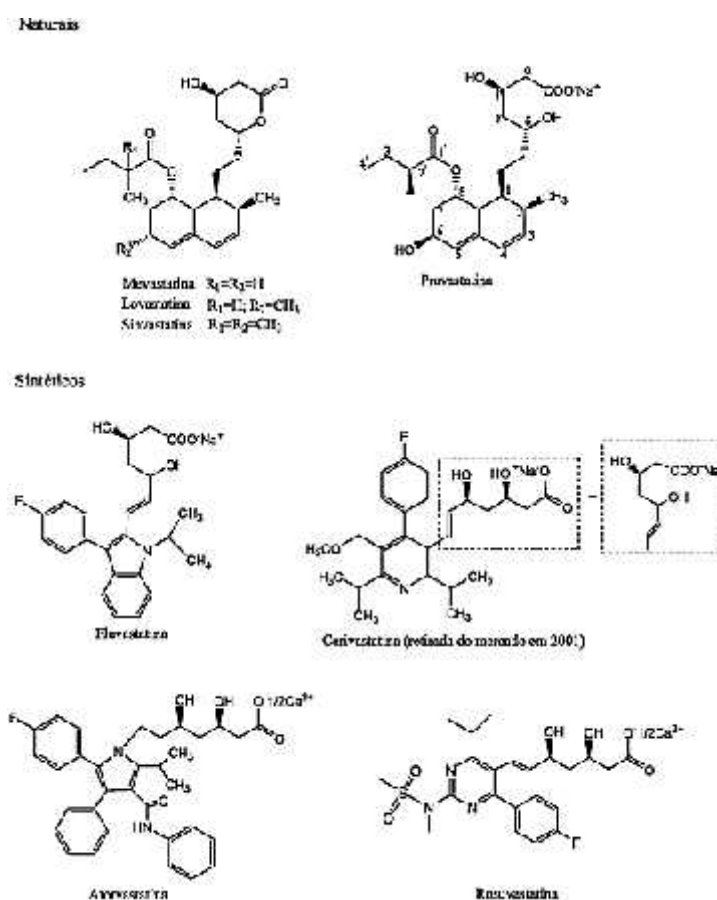
Fonte: Retirado de Friedman, 2008a; Mann J e Mann DA, 2009.

Após uma lesão hepática, os retinóides são perdidos e as CEH sofrem um processo conhecido como transdiferenciação ou ativação que gera um miofibroblastos com várias atividades pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (Figura 5c) (Mann J e Mann DA, 2009). Estas células reparar a lesão por deposição de matriz extracelular, formando uma cicatriz. Uma vez que lesão cessa, as CEH ativada são desligadas, presumivelmente por combinação de desativação de quiescência e/ou apoptose; a cicatriz também é remodelada para permitir a inversão da estrutura do fígado normal. O problema surge quando o estímulo prejudicial não pode ser desligado; os miofibroblastos persistem aumentando ainda mais a deposição de matriz extracelular que eventualmente leva à fibrose (Friedman, 2008a, Mann J e Mann DA, 2009).

1.4 Estatinas

Em 1976, isolou-se a primeira estatina a partir de uma colônia de *Penicillium Citrinium*, denominada como inibidoras da síntese do colesterol, em seguida foram chamadas de inibidores da HMG-CoA redutase. A Mevastatina foi a primeira estatina utilizada em seres humanos (Liao e Laufs, 2005), sendo descontinuada devido a problemas na morfologia intestinal de cachorros e toxicidade hepatocelular verificada em ratos (Wierzbicki et al., 2003). Em 1987, a alovastatina (ou mevinolina) foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* por pesquisadores da Merck, desde então esta classe de drogas vem sendo estudada por pesquisadores do mundo inteiro (Alberts et al., 1980). As estatinas podem ser naturais (sinvastatina e lovastatina) ou sintéticas (atrovastatina e Rosuvastatina) (Figura 6).

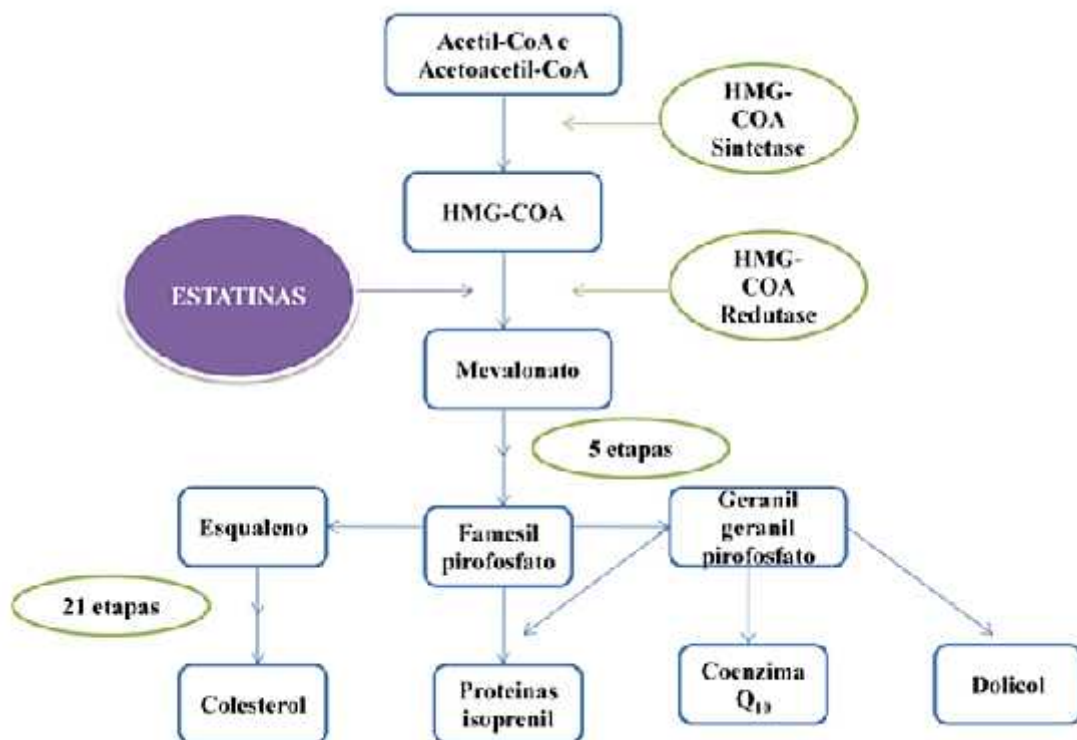
Figura 6 - Estrutura química das estatinas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase



Fonte: Retirada de Weitz-Schmidt, 2002.

As estatinas são agentes farmacológicos bem conhecidos, que têm sido amplamente utilizados para tratamento de hiperlipidemias através da inibição da HMG-CoA redutase. As estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase, bloqueando a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol (Figura 7) (Ginsberg, 2006). As estatinas exercem diversos efeitos pleiotrópicos, tais como ação reguladora na função endotelial, aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e inflamação e diminuição da resposta trombogênica. Também exercem resultados extra-hepáticos benéficos no sistema imune, nervoso, central e ósseo (Bostan et al., 2015). Muitos destes efeitos pleiotrópicos são mediados pela inibição de isoprenóides, que servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular (Liao e Laufs, 2005).

Figura 7 - Resumo dos mecanismos de ação das estatinas na via do Mevalonato



Fonte: Adaptado de Ginter e Simko, 2009.

As estatinas de primeira geração foram inseridas no mercado no final dos anos 1980 e 1990. São elas a lovastatina, pravastatina e fluvastatina, as quais possuem eficácia reduzida. E suas doses variam de 40-80 mg por dia para exceder uma redução de 30% nos níveis de colesterol LDL. As estatinas de segunda geração como: atorvastatina e sinvastatina são atualmente as estatinas mais vendidas no mundo. Elas melhoraram significativamente a eficácia na redução dos níveis de LDL-c em comparação com as estatinas anteriores. Por exemplo, para alcançar uma redução maior do que 30% nos níveis de LDL-c, requer utilizar 20 mg por dia de sinvastatina e somente 10 mg por dia de atorvastatina (Jones et al., 1998).

A Rosuvastatina (AstraZeneca), estatina de terceira geração, aprovada em agosto de 2003 pelo Food and Drug Administration (FDA), faz parte da nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, possuem características químicas que melhoram seu efeito contra a HMG-CoA redutase. Primeiro por possuir um grupo fenilo fluorado e um grupo metano sulfonamida, proporcionando múltiplos locais de atividade contra HMG-CoA, resultando em uma maior eficácia terapêutica (Istvan e Deisenhofer, 2001). Em segundo lugar, a Rosuvastatina e atorvastatina têm melhor entalpia (refere-se à força da interação entre o inibidor e a enzima alvo) de ligação para inibidores de HMG-CoA redutase (Carbonell e Freire, 2005). Em terceiro lugar, a natureza hidrófila da Rosuvastatina pode também reduzir o número de interações fármaco-fármaco, eliminando a dependência de conversão metabólica de uma molécula solúvel em água (Holdgate et al., 2003).

A Rosuvastatina possui diversos efeitos pleiotrópicos tais como restabelecimento da função endotelial e redução na pressão arterial sistólica, melhora da resistência à insulina em humanos (Fraulob et al., 2012), aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, redução do estresse oxidativo e inflamação, e melhora da resposta trombogênica (Liao e Laufs, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento com Rosuvastatina em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, causando DHGNA, focando marcadores hepáticos da lipogênese, -oxidação e ativação de CEH em camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as adipocinas (adiponectina e leptina);
- b) Analisar o colesterol total e triacilglicerol hepático e plasmático;
- c) Avaliar o metabolismo carboidratos (glicose e insulina);
- d) Dosar as enzimas hepáticas (AST, ALT e GGT);
- e) Avaliar o remodelamento hepático através da quantificação da esteatose hepática;
- f) Avaliar a lipogênese e -oxidação através das técnicas moleculares Western blot e qRT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, dieta e medicamento

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no guia convencional para experimentação com animais (Publicação NIH Nº 85-23, revisado em 1996), e todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/016/2013).

Neste estudo foram utilizados machos C57BL/6 (com 12 semanas de idade), mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, $60\% \pm 10\%$ de umidade e 12h de luz / 12h de ciclo escuro) e com livre acesso a ração e água. Inicialmente, quarenta camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos ($n=20$ cada grupo) e receberam dietas diferentes durante 12 semanas: dieta padrão (ração padrão (SC), 10% de energia a partir de lipídios) ou dieta HF (ração hiperlipídica (HF), 50% de energia a partir de lipídios). O conteúdo de energia da dieta padrão era de 3.811 kcal/g, e a dieta hiperlipídica era de 5.000 kcal/g. A ração dos animais foi preparada pela empresa Prag Soluções (Jau, São Paulo, Brasil).

Os teores de minerais e de vitaminas das dietas eram idênticos seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) (Reeves et al., 1993), ver Tabela 1. Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=10$ cada), a fim de iniciar o tratamento com Rosuvastatina (Crestor, AstraZeneca, Cotia, SP, Brasil). Os grupos foram:

- a) SC (dieta padrão);
- b) SCR (dieta padrão tratados com Rosuvastatina);
- c) HF (dieta hiperlipídica);
- d) HFR (dieta hiperlipídica tratado com Rosuvastatina).

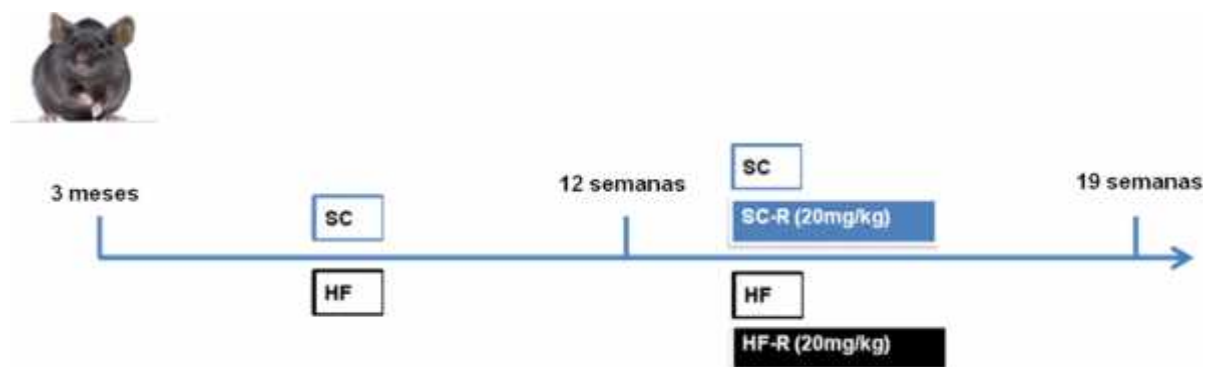
O tratamento durou sete semanas e a droga foi adicionada às dietas na dose final de 20 mg/kg/dia conforme demonstrado na Figura 8. A ração foi ofertada diariamente e qualquer resto do dia anterior foi descartado. A ingestão alimentar foi avaliada diariamente e a massa corporal (MC) foi aferida semanalmente.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

COMPOSIÇÃO (g/Kg)	DIETA PADRÃO	DIETA HIPERLIPÍDICA
Caseína	140,0	175,0
Amido de milho	620,7	348,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	238,0
Fibras	50,0	50,0
Mix de Vitaminas	10,0	10,0
Mix de Minerais	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Energia (kcal)	3804	5000
Antioxidantes	0,008	0,008
Carboidrato (%)	76,0	36,0
Proteína (%)	14,0	14,0
Gordura (%)	10,0	50,0

Nota: Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo recomendação da AIN-93-M (Reeves et al., 1993) dieta padrão (standard chow) e dieta hiperlipídica (high-fat).

Figura 8 - Desenho experimental



Nota: Animais do estudo que receberam dieta padrão (SC) ou hiperlipídica (HF) a partir de três meses de vida até seis meses, perfazendo um total de 12 semanas de dietas experimentais. Posteriormente, foram subdivididos e receberam o tratamento com Rosuvastatina por mais sete semanas, quando foram sacrificados.

Fonte: A autora, 2015

3.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado em dois momentos, após as 12 semanas iniciais do experimento e ao final do tratamento. Após 6h de jejum foi feita uma pequena incisão na cauda do animal para verificar a glicemia de jejum (tempo zero), em seguida foi administrada uma quantidade conhecida de glicose (25% em soro fisiológico estéril, NaCl a 0,9%) a uma dose de 1 g/kg através de sonda orogástrica para provocar a sobrecarga de glicose. Após este procedimento o sangue foi novamente coletado através da ordenha da cauda nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos. A glicose no sangue foi medida usando um glicosímetro (Accu-CEHK, Roche, São Paulo, SP, Brasil). A área sob a curva (ASC) em unidades arbitrárias (UA) foi determinada versão 6.05 para Windows, GraphPad Software (La Jolla, CA, EUA).

3.3 Eutanásia e bioquímica

Após o tratamento, os animais foram mantidos em jejum durante 6h, o tórax foi aberto, o sangue foi coletado por punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação (120 rpm por 20 min) em temperatura ambiente e armazenado a -20°C até a realização das análises. O fígado foi dissecado e pesado, fracionado tanto para a análise histológica ou rapidamente congelado à -80° C para análises moleculares.

3.4 Determinação das concentrações de lipídios plasmáticos

Os valores plasmáticos de colesterol total e triacilglicerol foram determinados utilizando um método colorimétrico cinético de acordo com as instruções do fabricante (Sistema de BIOCLIN II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.5 Insulina, leptina e adiponectina

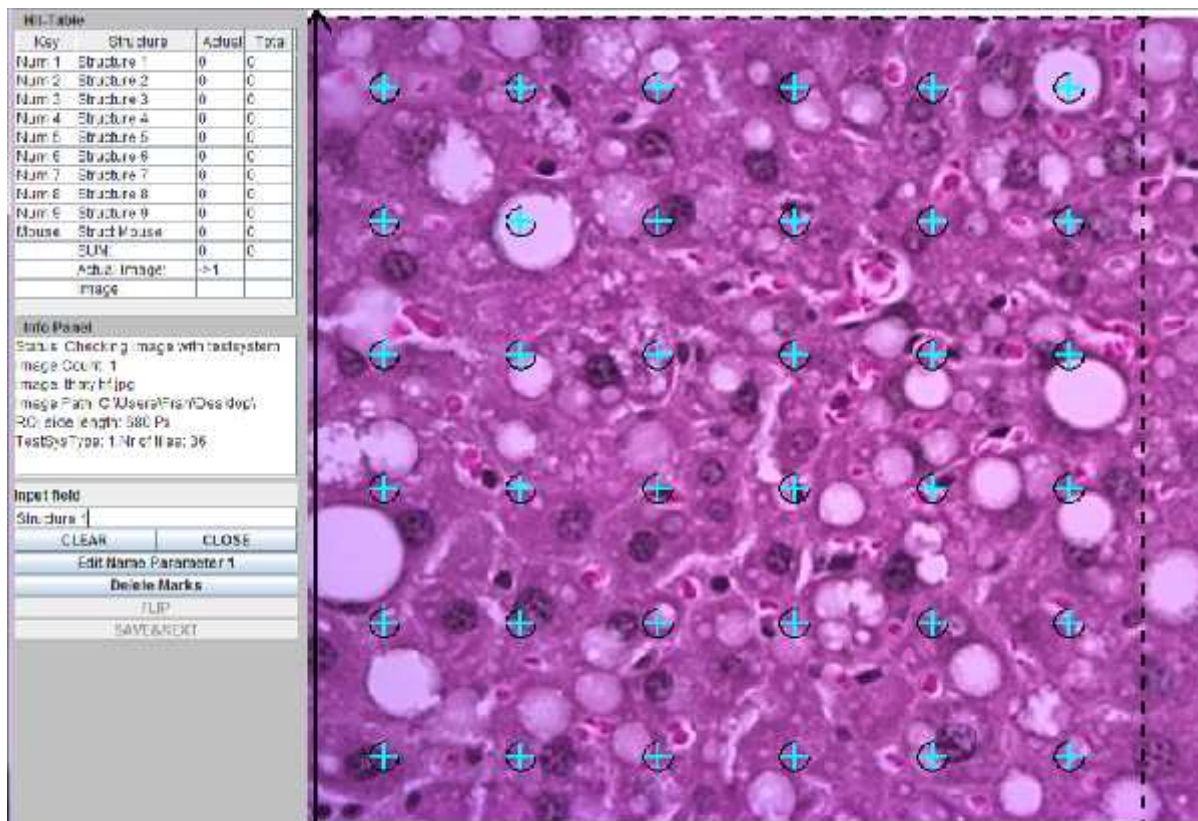
Concentrações de insulina, leptina e adiponectina plasmáticas foram medidas usando kit de ensaio imunoenzimático (adiponectina ELISA Cat kit. # EZMADP-60K, insulina Cat. kit #EZRMI-13K e leptina ELISA Cat kit. # EZML-82K, Millipore, Missouri, EUA) com o equipamento Termoplate (TP-READER ELX800, Biotek Instruments, USA).

3.6 Fígado

3.6.1 Estrutura

Fragments aleatórios do fígado foram mantidos em fixador recentemente preparado (formaldeído a 4% w/v, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) por 48h, em temperatura ambiente. Depois foi incluído em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Mo, EUA), seccionados com espessura de cinco micrômetros, corado com hematoxilina e eosina ou por imunohistoquímica conforme detalhado mais adiante. Fotomicrografias foram feitas com o microscópio BX51 (Olympus Co, Tóquio, Japão) com câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co, Ottawa, Canadá). As imagens foram obtidas em formato JPEG, 24 bits e resolução de 2592x1944 pixels. Sete animais por grupo compõem a amostra. De cada animal adquiriu-se 10 imagens de forma aleatória, totalizando 70 imagens por grupo. As imagens foram analisadas utilizando o software STEPanizer (www.stepanizer.com) com sistema-teste de 36 pontos, onde foram contatos os pontos-teste sobre as gotículas de gordura intra-hepatócitos. A densidade de volume de esteatose (Vv [esteatose]) foi avaliada através da contagem de pontos utilizando 10 campos por animal, como descrito anteriormente Figura 9 (Aguila et al., 2003; Catta-Preta et al., 2011).

Figura 9 - Sistema teste gerado pelo software Stepanizer, para análise de esteatose do fígado



Fonte: A autora, 2015

3.6.2 Bioquímica

O colesterol e triglicerídeo hepático foram medidos em tecido hepático em conformidade com os protocolos de rotina. Resumidamente, as amostras congeladas (50 mg) foram colocadas num processador de ultrassom (modelo LB-130 PB, Labormetric, Miami, FL, EUA) com 1 ml de isopropanol e o homogeneizado foi centrifugado a 2000 G. Depois, 5 uL do sobrenadante foi analisado com um analisador automático (K55, BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil), utilizando um kit para medir triacilglicerol ou colesterol. Além disso, as enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e gama glutamil transpeptidase foram medidos no plasma, utilizando um método colorimétrico cinético (BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.6.3 Células estreladas hepáticas

Cortes do fígado foram desparafinados e hidratado, após foi realizada a recuperação antigênica utilizando tampão citrato, pH 6,0 a 60° C durante 20 minutos e bloqueadas com cloreto de amônio, glicina a 2%. Os cortes de fígado foram incubados com anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso (Ab7817, mouse monoclonal, Abcam) diluído em PBS/BSA 1%, 1:100 durante 2h. Subsequentemente, as amostras foram tratadas com um anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa-546 (Invitrogen donkey anti-IgG mouse, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 1h, depois lavado em PBS, seguido por coloração dos núcleos com DAPI. As lâminas foram montadas com SlowFade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), a fim de manter a fluorescência. As imagens foram capturadas usando microscópio confocal de Varredura a Laser (Nikon, modelo C2, Tóquio, Japão).

3.6.4 Western Blot

A extração de proteína foi realizada a partir de tecidos homogeneizados de fígado, e as proteínas totais foram avaliadas utilizando a técnica de transferência de Western. Inicialmente, 100 mg de fígado congelados foram homogeneizados em tampão contendo inibidores de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 40 C, os sobrenadantes foram recolhidos, e as proteínas totais foram determinada utilizando um kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Quantidades iguais de proteína total foram separadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida. A membrana foi bloqueada por incubação em 5% (peso/volume) de leite desnatado seco em solução salina tamponada com Tris (20 mmol/L de Tris/HCl pH 7,4 e 500 mmol/L NaCl). Incubou-se durante a noite a 40 C, com os seguintes anticorpos primários: a) para a lipogênese hepática (SREBP1-c 68kDa; SC-367 e PPAR-gama 67kDa, SC-7273); b) para -oxidação hepática (PPAR-alfa 55 kDa, SC-9000); c) para as células estreladas hepáticas ativadas (alfa-actina de musculo liso;

43kDa; Ab7817). Todos os anticorpos foram adquiridos a partir de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), exceto a alfa-actina de musculo liso (Abcam).

As membranas também foram incubadas com anti-actina (anticorpo monoclonal; 43 kDa; SC-81178; 1: 1000). Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubados com anticorpo secundário por 1h à temperatura ambiente, com agitação constante. Para a detecção das imagens foi utilizado o reagente ECL e as imagens foram obtidas pelo Bio-Rad Image ChemiDoc XRS Molecular System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas de quimiluminescência foi quantificada utilizando o software ImageJ (versão 1.48, NIH imagej.nih.gov/ij, EUA).

3.6.5 qRT-PCR

A expressão do RNAm no fígado foi medida por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR). O RNA total foi extraído a partir de cerca de 50 mg de tecido do fígado utilizando reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, foram adicionados 200µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C) e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. A essa porção foram adicionados 500µL de isopropanol que reagiu por 10 minutos para que o RNA precipitasse e logo após foi centrifugado (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C). O isopropanol foi retirado, o pellet formado foi ressuspendido com 500µL de etanol 75% e, logo após, centrifugado (11.200 rpm, durante 5 minutos a 4°C). O etanol foi retirado e o pellet ressuspendido em 20µL de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas ao banho seco (50°C por 5 minutos) e quantificadas no equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Para transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA), 1,0µg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada utilizando Oligo (dT) iniciadores para RNAm e Superscript III da transcriptase reversa (ambos da Invitrogen). O qRT-PCR foi realizada utilizando um reciclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e o mix SYBRGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Os primers para qRT-PCR (CPT-1, PPAR-alfa, SREBP-1c, PPAR-gama, CD36 e -actina) foram concebidos utilizando o software Primer3 on-line e são indicados na Tabela 2. A -actina foi utilizada para normalizar a expressão dos genes selecionados. Eficiências de RTPCR-q para o gene alvo endógeno e o de controle foram aproximadamente iguais e foram calculados por meio de uma série de diluição de cDNA.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas como se segue: depois de uma pré-desnaturação a ativação da polimerase foi programada para (4 min a 95°C), quarenta ciclos cada que consistem em 95°C durante 10 seg e 60°C durante 15 seg foram seguidos por um programa de curva de fusão (60-95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais cDNA foi substituído por água deionizada. A razão entre expressão de RNAm relativa (RQ) foi calculado usando a equação $2^{-ct - ct}$ expressos como a diferença entre o número de ciclos (CT) do gene alvo endógeno e o de controle.

Tabela 2 - Primers usados no estudo

Primers	Nome	Sequência
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase-1	FW GCAGAGCACGGCAAATGA RV GGCTTTTCGACCCGAGAAGAC
FAT/CD36	Transportador de ácido graxo translocase	FW CCCTCCAGAATCCAGACAAC RV TGCATTTGCCAATGTCTAGC
PPAR alfa	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa	FW CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC RV GCCGAATAGTTCGCCGAAA
PPAR gama	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama	FW CACAATGCCATCAGGTTTGG RV GCTGGTTCGATATCACTGGAGATC
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador do esteroil	FW AGCAGCCCCTAGAACAAACA RV TCTGCCTTGATGAAGTGTGG
-actina	-actina	FW TGTTACCAACTGGGACGACA RV GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

Fonte: A autora, 2015.

3.6.6 Análise estatística

Os dados foram analisados para a distribuição normal e homocedasticidade dos desvios, e, em seguida, as diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de um fator e o pós-teste de Holm-Sidak. O ANOVA de dois fatores

examinou o efeito da dieta, do tratamento e a possível interação entre os fatores. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (DP). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Prism versão 6.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal (MC)

Os animais iniciaram o experimento sem diferença significativa na MC. Após 12 semanas, o grupo HF, mostrou diferença significativa em comparação com a MC do grupo SC ($P < 0,0001$). Após sete semanas de tratamento com Rosuvastatina, o grupo SCR mostrou uma redução significativa da MC em comparação com o grupo SC ($P = 0,0046$), e o grupo HFR mostrou redução na MC em comparação com o grupo HF ($P < 0,0001$), no entanto, o grupo HFR foi mais pesado do que o grupo SCR ($P = 0,0067$). No final do estudo, dieta e tratamento mostraram um efeito na MC dos animais ($P < 0,0001$, ANOVA de dois fatores) (Figura 10).

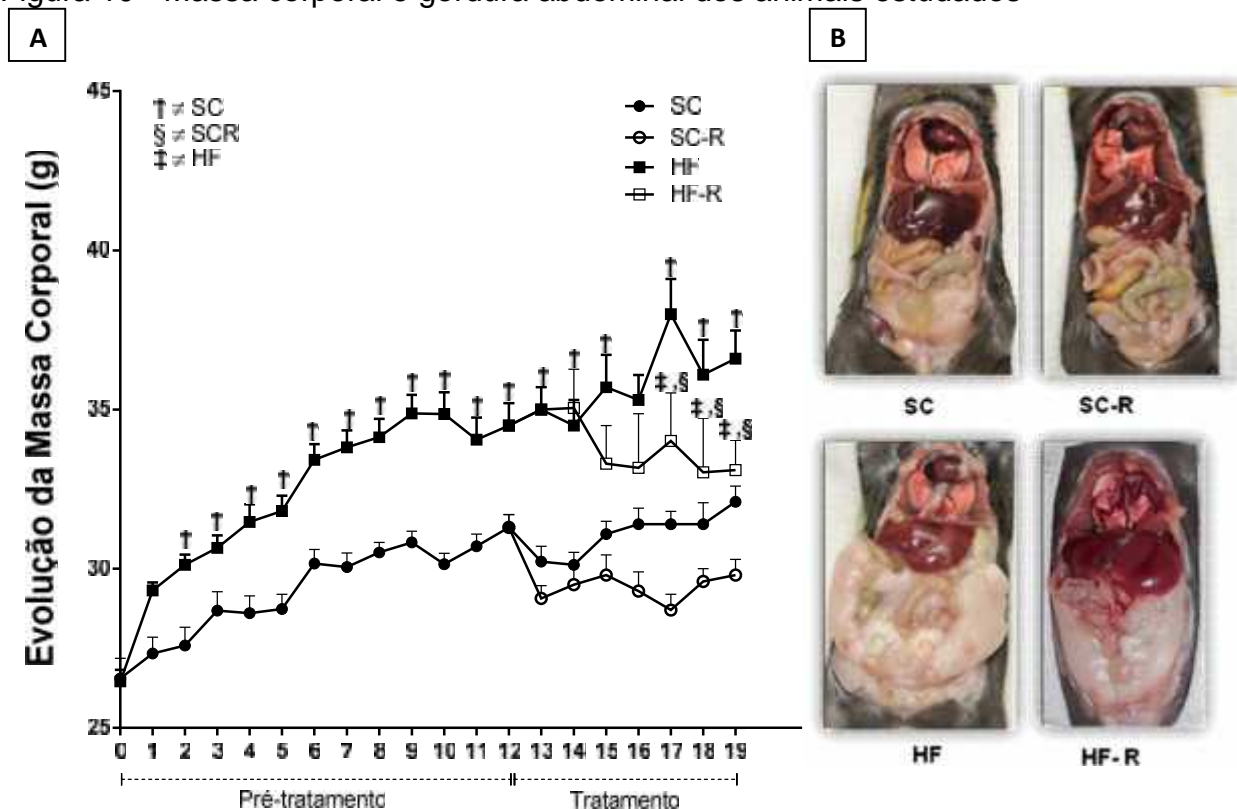
4.2 A Rosuvastatina melhora o metabolismo da glicose

Antes do tratamento, com base na análise do TOTG, a dieta HF levou à intolerância à glicose no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P = 0,0014$).

Após o tratamento, o grupo HF continuou a mostrar a intolerância à glicose em relação ao grupo SC ($P < 0,0001$), porém o tratamento melhorou a intolerância à glicose no grupo HFR em comparação com o grupo HF ($P = 0,0021$). As concentrações de insulina foram maiores no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P < 0,0001$), e o grupo HFR mostrou a insulina reduzida em relação ao grupo HF ($P < 0,0001$). É notável que a insulina foi similar nos grupos SC, SCR e HFR (Tabela 3).

A glicemia foi afetada pela dieta ($P = 0,0045$, ANOVA de dois fatores), enquanto o TOTG foi afetado pela dieta e pela interação entre dieta e tratamento ($P = 0,0053$, ANOVA de dois fatores). A insulina foi influenciada por dois fatores (dieta e tratamento, $P < 0,0001$) e esses fatores interagiram significativamente ($P < 0,0001$, ANOVA de dois fatores).

Figura 10 - Massa corporal e gordura abdominal dos animais estudados



Legenda: A: Evolução de massa corporal dos animais estudados. Pré-tratamento corresponde ao período até 12^a semana, quando começa o tratamento e se estendeu até 19^a semana. Figura 10 B. Foto da gordura abdominal dos animais do experimento onde o HF apresenta uma maior quantidade de gordura quando comparados aos outros grupos. Os valores são média \pm desvio padrão, símbolos representam diferenças significativas em relação \dagger SC, \S SC-R e \ddagger HF, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina).

Fonte: A autora, 2015

4.3 A Rosuvastatina controla os níveis de lipídios

A dieta HF levou ao aumento do colesterol total e triacilglicerol em comparação com a dieta padrão para roedores. O tratamento com Rosuvastatina não alterou o colesterol total e triacilglicerol no grupo SCR, mas diminuiu significativamente no grupo HFR em comparação com o grupo HF (Tabela 3).

O colesterol total foi influenciado por fatores de forma independente (dieta e tratamento), mas uma interação entre esses fatores foi significativa ($P < 0,0005$, ANOVA de dois fatores). Os triacilglicerol foram afetados pela dieta e pela interação entre a dieta e tratamento ($P < 0,007$, ANOVA de dois fatores).

4.4 Adipocinas

A leptina foi maior no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P=0,017$). Após o tratamento, o grupo HFR mostrou uma redução de leptina em comparação com o grupo de HF ($P=0,009$). A adiponectina foi menor no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P=0,025$) (Tabela 3). A leptina foi afetada pela dieta (ANOVA de dois fatores, $P<0,0001$).

Tabela 3 - Comportamento alimentar e bioquímica

Dados	SC	SCR	HF	HFR
Comportamento Alimentar				
Ingestão alimentar (g/dia)	3,3±0,11	3,2±0,16	3,1±0,15	3,1±0,10
Pré-tratamento				
Massa corporal (g)	30,2±1,07	29,5±2,02	35,5±3,42†	36,2±3,73§
Glicose (mmol/L)	7,5±1,18	-	9,3±1,10†	-
TOTG (AUC, a,u,)	103,0±7,80	-	122,3±14,19†	-
Pós-tratamento				
Massa corporal (g)	32,1±1,24	30,2±0,73†	36,6±2,00†	33,1±1,86§‡
Glicose (mmo/L)	7,3±0,38	7,2±0,68	8,8±0,88†	7,8±0,89
TOTG (AUC, a,u,)	80,3±3,18	95,4±12,7	136,0±16,73†	102,2±12,45‡
Insulina (IU/L)	7,1±0,73	7,2±0,39	11,1±0,71†	7,0±0,40‡
Colesterol Total (mg/dL)	71,0±12,0	72,7±9,82	143,7±7,34†	103,8±8,68§‡
Triacilglicerol (mg/dL)	71,8±6,51	75,8±2,48	86,7±6,13†	74,0±2,31‡
Leptina (102pg/mL)	6,6±0,41	5,9±0,47	21,20±2,83†	17,54±3,87§‡
Adiponectina (106pg/mL)	5,3±0,30	4,8±0,35	4,1±0,45†	4,8±0,38

Legenda: Os valores indicam a média ± desvio padrão. Símbolos representam diferenças significativas em relação † SC, §SC-R e ‡ HF, P<0,05 (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina).

Fonte: A autora, 2015

4.5 Fígado

4.5.1 Massa hepática, colesterol e triacilglicerol

Foi observada uma diferença na massa do fígado entre os grupos (dados não apresentados), sendo maior no grupo HF em comparação aos grupos SC e HFR. O colesterol e triacilglicerol hepáticos têm um comportamento semelhante no estudo. Eles foram maiores no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P=0,036$ para o colesterol; $P<0,001$ para triacilglicerol), o tratamento com Rosuvastatina reduziu os lipídios no grupo HFR em comparação com o grupo HF ($P=0,016$ para o colesterol, $P<0,001$ a triacilglicerol) (Tabela 4).

O colesterol hepático foi influenciado pelos dois fatores dieta ($P=0,010$) e tratamento ($P=0,0044$) ANOVA de dois fatores, sem interação entre os fatores. O triglicerídeo hepático foi influenciado pelos dois fatores (dieta e tratamento) e os fatores interagiram afetando os resultados ($P<0,0001$ para todas as análises, ANOVA de dois fatores).

4.5.2 As enzimas hepáticas

As enzimas hepáticas apresentaram valores mais elevados no grupo HF comparado com o grupo SC (ALT, $P=0,0035$; AST, $P=0,0005$; GGT, $P=0,0054$). O tratamento com Rosuvastatina foi eficiente na redução de AST e GGT no grupo HFR em comparação com o grupo HF (AST, $P=0,0153$; GGT, $P=0,0221$) (Tabela 4).

A dieta afetou os valores de ALT ($P=0,0003$) e GGT ($P=0,028$). A AST foi afetada pelos dois fatores dieta ($P<0,0001$) e tratamento ($P=0,011$) ANOVA de dois fatores.

4.5.3 Arquitetura do fígado e células estreladas hepáticas (CEH)

Podemos observar o efeito deletério da dieta hiperlipídica, causando maior deposição de lipídios no fígado do grupo HF, com conseqüente maior esteatose em comparação com o grupo SC (aumento superior a 350%, $P < 0,0001$). No entanto o tratamento com Rosuvastatina mostrou se eficaz na redução da esteatose hepática, observada no grupo HFR que apresentou redução significativa da esteatose hepática em 21% quando comparado com o grupo HF ($P = 0,0032$) (Tabela 4 e Fig. 11).

Tabela 4 - Dados do fígado

Dados	SC	SCR	HF	HFR
Colesterol (mg/dL)	0,74±0,03	0,69±0,02	0,85±0,11†	0,76±0,02‡
Triacilglicerol (mg/dL)	2,0±0,58	1,8±0,17	4,1±0,34†	1,7±0,21‡
ALT (U/L)	18,0±2,44	16,2±3,56	27,2±4,08†	22,2±4,55
AST (U/L)	79,0±12,3	71,8±16,3	134,0±14,4†	98,2±22,3‡
GGT (IU/L)	15,0±5,34	15,0±5,47	25,7±5,34†	16,0±5,47‡
Esteatose (%)	10,2±1,52	10,9±3,56	48,8±5,70†	38,8±4,75§‡

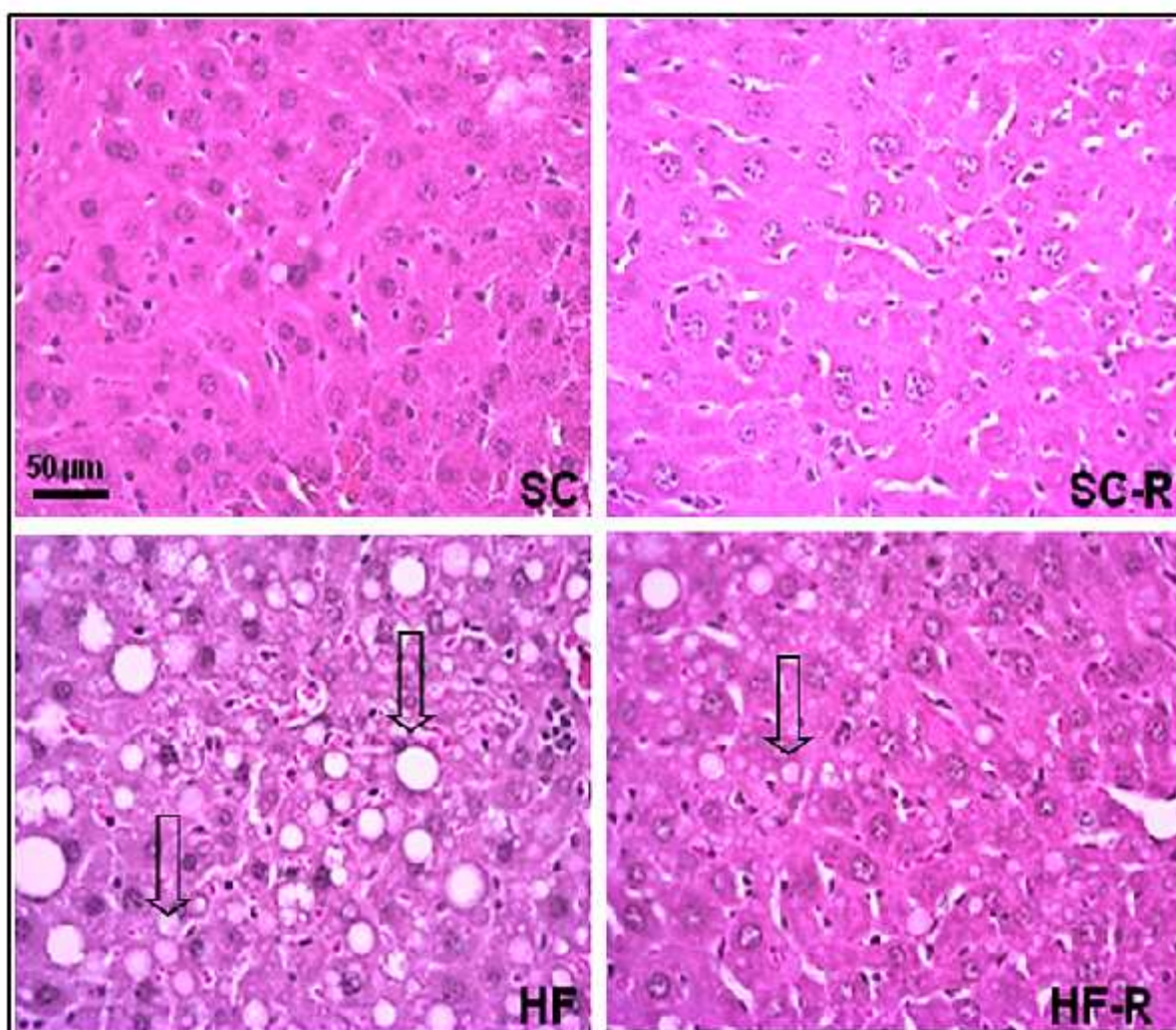
Legenda: Os valores são média ± desvio padrão. Símbolos representam diferenças significativas em relação a: † SC, §SC-R e ‡ HF, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina). Abreviaturas: alanina aminotransferase, ALT; aspartato aminotransferase, AST; gama glutamil transpeptidase, GGT.

Fonte: A autora, 2015.

Em resposta à lesão hepática, as CEH são ativadas. CEHs ativadas foram amplamente observadas no grupo HF, mas não nos grupos controles. O grupo HFR, apresentou algumas áreas do tecido hepático com uma marcação de anti alfa-actina do músculo liso (alfa-SMA), um marcador de CEHs, mais atenuada quando comparado ao grupo HF (Figura 12). Além disso, o aumento da expressão da proteína de alfa-SMA foi detectado significativamente maior no fígado do grupo HF em comparação com o grupo SC ($P = 0,0001$), o grupo HFR ($P = 0,0132$) mostrou uma expressão reduzida quando comparado ao HF conforme Figura 13.

A esteatose hepática foi influenciada pela dieta ($P < 0,0001$) e tratamento ($P = 0,034$) e ambos os fatores interagiram nos resultados ($P = 0,01$, ANOVA de duas vias). A expressão da proteína alfa-SMA foi afetada pela dieta ($P < 0,0001$) e embora, o tratamento não afete no resultado, houve uma interação entre os dois fatores ($P = 0,014$, ANOVA de dois fatores).

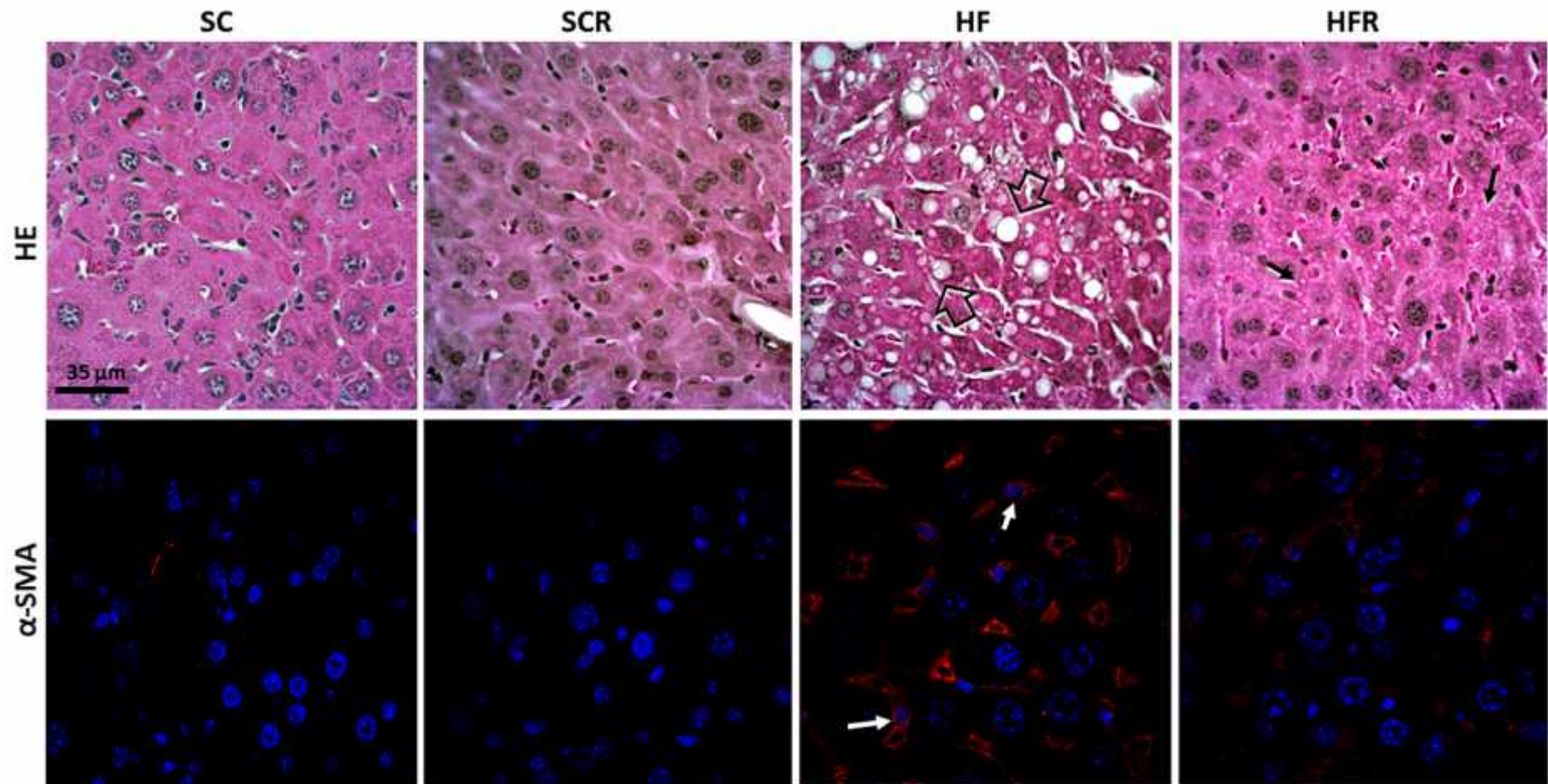
Figura 11 - Fotomicrografias do parênquima hepático



Nota: Presença de esteatose hepática, setas representativas mostrando macro e micro gotículas de gordura (esteatose) no grupo HF e redução das gotículas no grupo HFR. Coloração de Hematoxilina Eosina, mesmo aumento em todas as fotomicrografias (ver também a Figura 12).

Fonte: A autora, 2015.

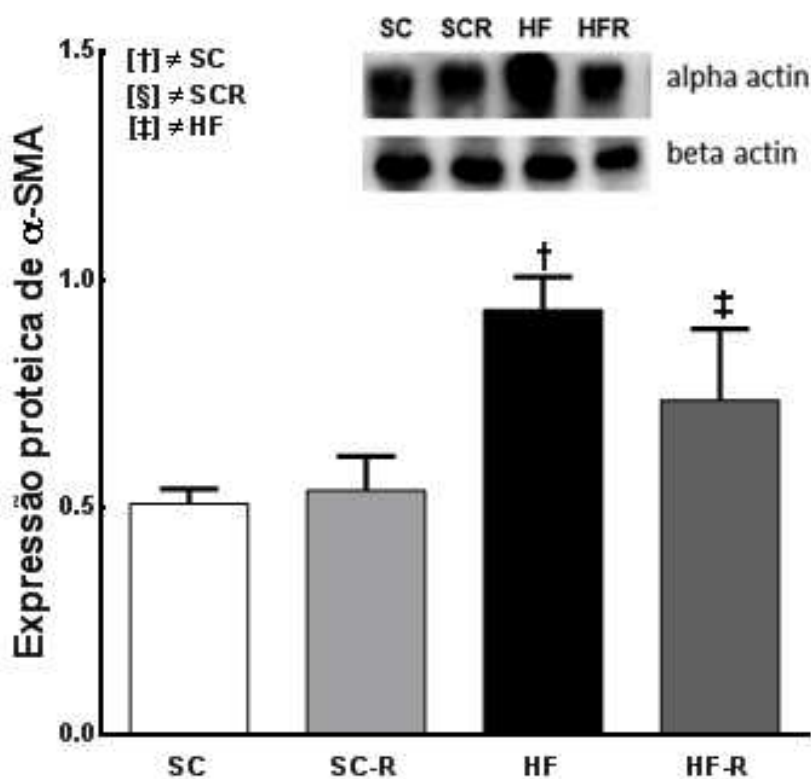
Figura 12 - Estrutura hepática



Legenda: Linha superior, coloração por hematoxilina e eosina (HE): gotículas de gordura de micro e macro esteatose melhor visualizado no grupo HF (setas abertas) que foi reduzido por tratamento com Rosuvastatina no grupo HF-R (setas). Linha inferior, imunofluorescência para alfa-actina de músculo liso (SMA): células estreladas hepáticas foram observadas no grupo HF (setas), mas praticamente desapareceram no grupo de HF-R (mesma ampliação para todas as fotomicrografias)

Fonte: A autora, 2015.

Figura 13 - Bandas representativas da expressão hepática de anti alfa-actina de músculo liso



Legenda: Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina). Símbolos representam diferenças significativas em relação † SC, §SC-R e ‡ HF, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak).

Nota: Expressão hepática de anti alfa-actina de músculo liso corrigido por β -actina, expressa em unidades arbitrárias. Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak).

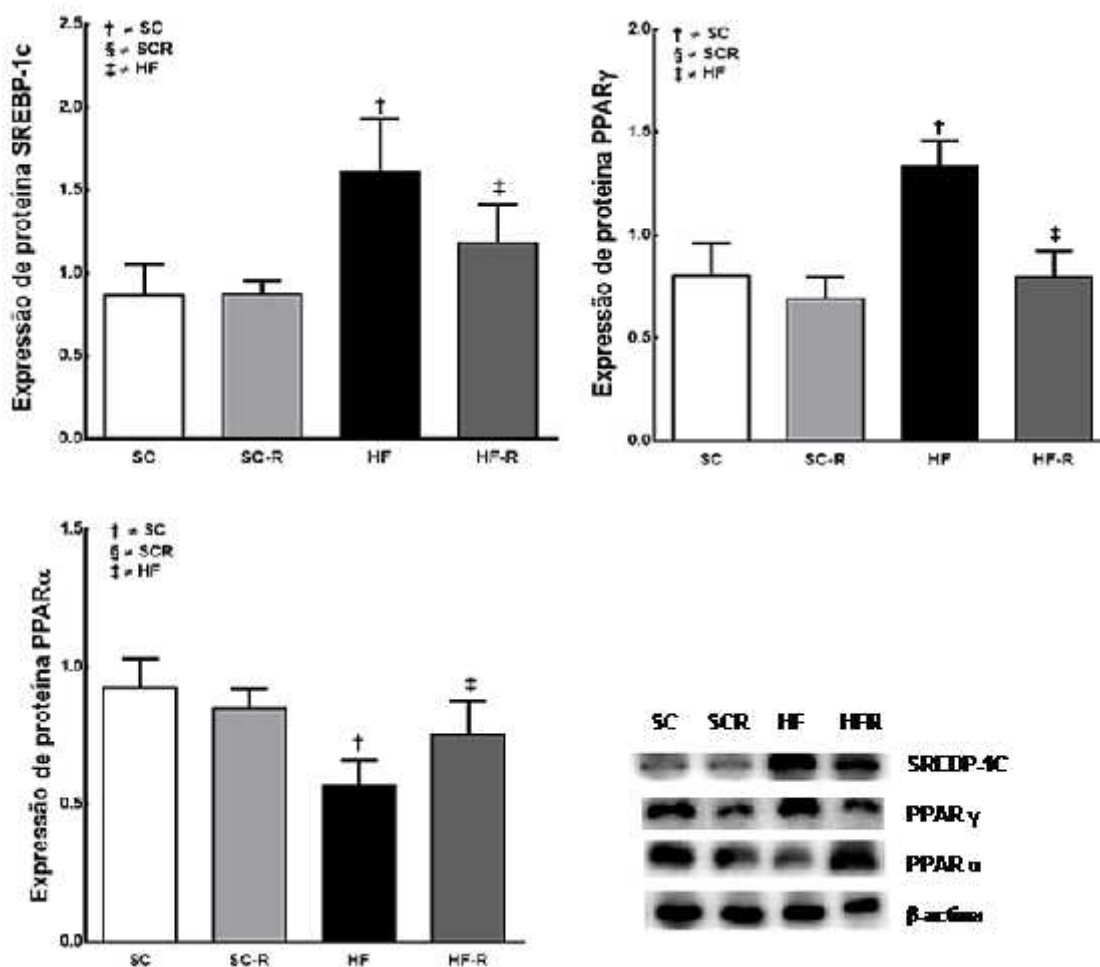
Fonte: A autora, 2015

4.5.4 Análises moleculares

As expressões de proteínas no fígado foram analisadas para SREBP1c, PPAR-gama, e PPAR-alfa (Figura 14). Observou-se o mesmo padrão de expressão de SREBP-1 e PPAR-gama: um aumento significativo no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P < 0,0001$) e uma redução no grupo HFR em comparação com o grupo HF ($P < 0,0001$). Pelo contrário, a expressão da proteína PPAR-alfa no fígado mostrou uma redução significativa no grupo HF em comparação com o grupo SC

($P=0,0002$) e um aumento no grupo HFR em comparação com o grupo HF ($P=0,0042$) (Figura 14).

Figura 14 - Expressão da proteína do fígado



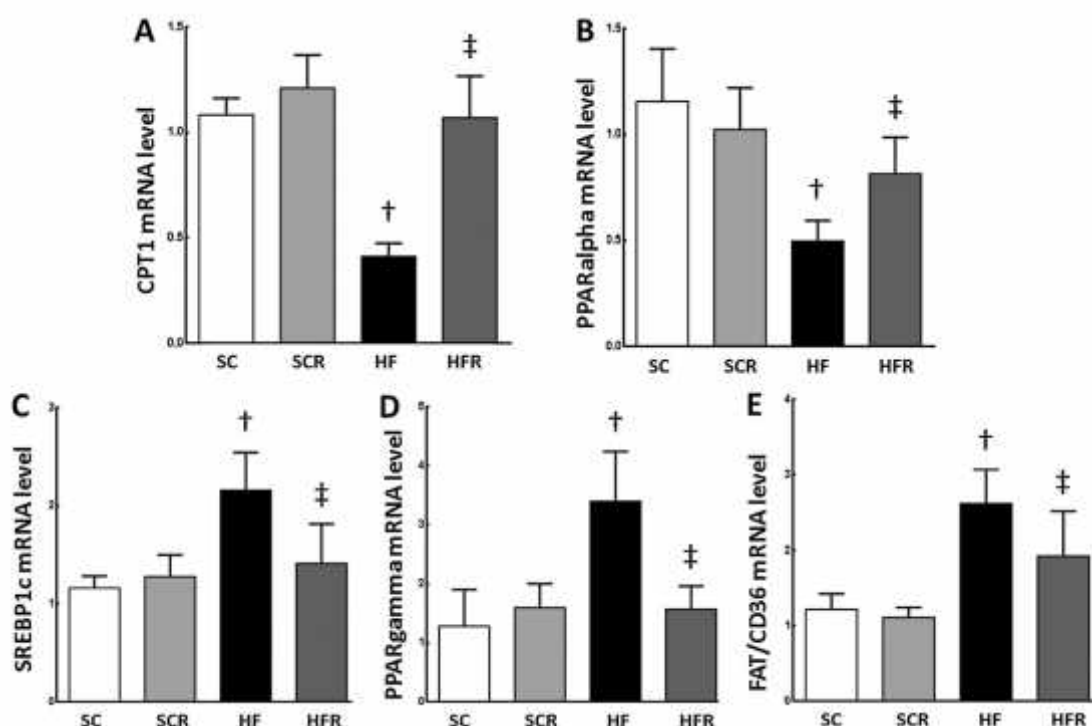
Legenda: Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (A) de PPAR-alfa, (B) de PPAR-gama, (C) esterol reguladora da proteína de ligação ao elemento (SREBP-1c), a expressão hepática foi corrigida pela β -actina, e expressa em unidades arbitrárias (UA). Nos casos sinalizados, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós teste de Holm-Sidak). Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina). Sob as seguintes condições: [†] em comparação com o grupo SC e [‡] em comparação com o grupo HF.

Fonte: A autora, 2015.

As expressões de mRNA no fígado foram analisadas por CPT-1, PPAR-alfa, SREBP1c, PPAR-gama, e para FAT/CD36 (Figura 15). As expressões de mRNA CPT1 e PPAR-alfa seguiram um padrão semelhante, diminuíram no grupo HF quando comparado com o grupo SC (CPT1, $P < 0,0001$ e PPAR-alfa, $P = 0,0002$) e suas expressões foram aumentados no grupo HFR em comparação com o grupo HF

(CPT1, $P < 0,0001$ e PPAR-alfa, $P = 0,0475$). Ao contrário, as expressões gênicas de SREBP1c, PPAR-gama e FAT/CD36 foram elevados no grupo HF em comparação com o grupo SC ($P = 0,0037$, $P = 0,0006$ e $P = 0,0002$ respectivamente) e diminuíram no grupo HFR em comparação com o grupo HF ($P = 0,0192$, $P = 0,0019$ e $P = 0,0351$ respectivamente).

Figura 15 - Medição quantitativa de RT-PCR dos genes expressos no fígado



Legenda: CPT-1 - Carnitine palmitoiltransferase-1 (A), PPAR-alfa – receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (B), SREBP-1c - Esterol reguladora da proteína-1 de ligação ao elemento (C), PPAR-gama - receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (D), (FAT)/CD36- transportador de ácido graxo translocase (E). -actina foi utilizada para normalizar a expressão dos genes selecionados, expressa em unidades arbitrárias, nos casos sinalizados, $P < 0,05$ (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). Grupos: SC (dieta padrão), SCR (SC + Rosuvastatina), HF (dieta rica em gordura), HFR (HF + Rosuvastatina). Sob as seguintes condições: [†] em comparação com o grupo SC e [‡] em comparação com o grupo HF.

Fonte: A autora, 2015.

O ANOVA de dois fatores mostrou dados interessantes. Para expressões de proteínas (SREBP1c, PPAR-gama e PPAR-alfa): a dieta afetou a expressão de todas as proteínas ($P < 0,0001$); o tratamento afetou apenas PPAR-gama ($P < 0,0001$); houve uma interação entre os dois fatores em todas as proteínas (SREBP1c, $P = 0,041$; PPAR-gama, $P = 0,0016$; PPAR-alfa, $P = 0,0066$). Para expressões de

mRNA (CPT-1, PPAR-alfa, SREBP1c, PPAR-gama): a dieta afetou as expressões de genes de todos os dados ($P < 0,0001$ para todos, mas $P = 0,0011$ para PPAR-gama); o tratamento afetou as expressões gênicas de CPT1 ($P < 0,0001$), SREBP1c ($P = 0,033$) e PPAR-gama ($P = 0,011$). Houve interação entre os dois fatores em todas as análises (CPT-1, $P = 0,0004$; PPAR-alfa, $P = 0,013$; SREBP1c, $P = 0,0064$; PPAR-gama, $P = 0,0009$).

Tabela 5 - Análise estatística de dois fatores

	Dieta	Medicamento	Interação
Massa corporal	S	N	X
Totg	S	N	S
Adiponectina	S	N	S
Colesterol total	S	S	S
Triacilglicerol plasmático	S	N	S
FÍGADO			
Esteatose	S	S	S
ALT	S	N	N
AST	S	N	N
GGT	S	S	N
Colesterol hepático	S	S	N
Triacilglicerol hepático	S	S	S
WB			
Alfa actina	S	N	S
PPAR alfa	S	N	S
PPAR gama	S	S	S
SREBP1-c	S	N	S
PCR			
PPAR alfa	S	N	S
PPAR gama	S	S	S
SREBP1-c	S	S	S
CPT-1	S	S	S
FAT/CD36	S	S	N

Legenda: (S) Houve interação, (N) não teve interação.

Fonte: A autora, 2015

5 DISCUSSÃO

O presente estudo com Rosuvastatina demonstrou redução da MC nos camundongos obesos induzidos por dieta, bem como melhora do metabolismo da glicose e redução da esteatose hepática com consequente controle da ativação das células estreladas hepáticas. Além disso, a Rosuvastatina apresentou efeitos benéficos sobre os parâmetros envolvidos na lipogênese e β -oxidação, bem como nas adipocinas. Estes foram efeitos pleiotrópicos da Rosuvastatina, independentemente da propriedade da redução de lipídios, considerando que as estatinas são usadas para a prevenção de doenças cardiovasculares (Mihos et al., 2014).

Na literatura tem muitas descrições de efeitos pleiotrópicos das estatinas. No nosso grupo, a administração de sinvastatina e pravastatina em ratos espontaneamente hipertensos impediu a elevação da pressão arterial e, conseqüentemente, atenuou a hipertrofia ventricular esquerda comum neste animal e melhorou a revascularização do miocárdio com a diminuição da fibrose intersticial (Bezerra e Mandarin-de-Lacerda, 2005). Além disso, a atorvastatina mostrou efeitos benéficos melhorando a vascularização do miocárdio através da diminuição da fibrose e perda de cardiomiócitos em ratos programados pela restrição proteica materna (Bezerra et al., 2008).

Nosso estudo demonstrou que a Rosuvastatina reduziu significativamente os níveis plasmáticos e hepáticos de colesterol total e triacilglicerol, como se esperava. Estes resultados podem ser explicados, pois o principal mecanismo de ação da estatina é reduzir o LDL por inibição da função da enzima HMG-CoA redutase (Rosenson, 2003; McKenney, 2005).

A terapia com estatina tem sido associada a efeitos nocivos sobre a homeostase da glicose e resistência à insulina já há alguns anos (Kostapanos et al., 2010; Koh et al., 2011), mesmo que os mecanismos pelos quais as estatinas atuam no metabolismo da glicose permanecem incertos e conflitantes (Koh et al., 2011). Mais recentemente o tratamento com estatinas foi relacionado com o expressivo aumento do risco de desenvolver diabetes tipo 2 em 46% das pessoas que tomam a droga. Isto é atribuído a uma redução na produção e diminuição da sensibilidade à insulina (Cederberg et al., 2015).

Devemos ressaltar que, no presente estudo observou-se uma melhora no metabolismo da glicose com tratamento com Rosuvastatina no grupo HFR. Além disso, uma análise da “Justificativa para o Uso de Estatinas na Prevenção Primária: Ensaio Avaliando a Intervenção da Rosuvastatina (JUPITER)” indicou que os benefícios da terapia com estatinas são maiores em eventos cardiovasculares superando qualquer possível risco de diabetes (Ridker et al., 2012). As abordagens terapêuticas para este problema e/ou a criação de uma nova geração de estatina sem tais efeitos secundários podem ajudar (Brault et al., 2014; Chan et al., 2015).

A Rosuvastatina pode ter um potencial menor para causar toxicidade no fígado em comparação com outras estatinas (Rosenson, 2003). A incidência de elevação das enzimas hepáticas no soro dos pacientes em tratamento com estatinas geralmente varia de 2% a 3% (de Denus et al., 2004). Diante disso, nossos resultados demonstraram que o tratamento com Rosuvastatina não reduziu os valores de ALT; no entanto, AST e GGT foram reduzidos após o tratamento, de acordo com estudos anteriores (Karpisek et al., 2007; Fraulob et al., 2012).

As estatinas têm um papel benéfico na fibrose do fígado, diminuindo a ativação das CEHs (Moreno et al., 2009; Trebicka et al., 2010). Estudo prévio relatou a ação da sinvastatina e lovastatina na inibição da proliferação do CEH e consequente diminuição do colágeno (Rombouts et al., 2003), que está de acordo com os dados obtidos neste trabalho. De modo semelhante, num modelo de carcinoma hepatocelular, a Rosuvastatina diminuiu a expressão de alfa-SMA nas CEHs quando comparado com um grupo não tratado com carcinoma hepatocelular (Tijeras-Raballand et al., 2010).

Concomitante com os efeitos da redução de células estreladas hepáticas ativadas, no presente estudo observou-se uma atenuação significativa na esteatose hepática, bem como em triacilglicerol hepático após o tratamento com Rosuvastatina. Nossos resultados estão de acordo com estudos experimentais, os quais revelaram que as estatinas podem reduzir o triglicérideo hepático (Roglans et al., 2002) e melhorar a esteatose hepática (Egawa et al., 2003; Fraulob et al., 2012). Este importante achado levou a uma proposição da terapia com estatinas em pacientes com esteatose hepática com alto risco cardiovascular (Riche et al., 2014).

Observou-se que a dieta hiperlipídica contribui para elevar a esteatose hepática, o gene e a proteína do PPAR gama e de SREBP-1. Estes últimos são fatores de transcrições que regulam as enzimas lipogênicas, as quais estavam

aumentadas em resposta à dieta HF, resultando no acúmulo de lipídios no fígado (Barbosa-da-Silva et al., 2013). Inversamente, a Rosuvastatina reduziu a expressão gênica e proteica dos elementos citados acima, contrariando a lipotoxicidade hepática. Além disso, a dieta HF levou a uma diminuição da expressão gênica de CPT-1, uma enzima oxidativa lipídica e o seu fator de transcrição o PPAR-alfa, ambos os quais foram significativamente elevados após o tratamento com Rosuvastatina, implicando em maior β -oxidação hepática. Além disso, os ácidos graxos livres são absorvidos pelos hepatócitos através de proteínas de transporte como a (FAT)/CD36 (Zhang et al., 2003), um transportador muito importante no processo, o que poderia levar a esteatose hepática quando excessivamente expressos. Observou-se que a expressão gênica de (FAT)/CD36 foi menor nos grupos tratados com Rosuvastatina.

As estatinas são capazes de reduzir a transcrição de SREBP1-c por meio da reduzida expressão do PPAR-gama (Choi et al., 2008). Além disso, as estatinas podem restaurar a β -oxidação peroxissomal prejudicada dos ácidos graxos mediada através da via de sinalização do PPAR-alfa, confirmando que esta classe de fármacos é suficientemente potente para melhorar a esteatose hepática (Sun et al., 2006; Choi et al., 2008). Na verdade, um achado relevante do presente estudo foi mostrar uma influência significativa do tratamento com Rosuvastatina sobre a expressão gênica e proteica do PPAR-gama e expressão do gene PPAR-alfa, afetando o equilíbrio PPAR no fígado, de modo a favorecer a β -oxidação (efeito PPAR-alfa) em vez de lipogênese (efeito PPAR-gama).

CONCLUSÃO

O tratamento com Rosuvastatina deve ser considerado como uma opção relevante para tratar a esteatose hepática, além de ter suas propriedades hipolipemiantes intrínsecas. A Rosuvastatina apresentou a vantagem de inibir significativamente a ativação das células estreladas hepáticas em um modelo de obesidade induzida por dieta, uma causa comum de DHGNA em humanos. O estudo sugere que o efeito da Rosuvastatina está associado ao desequilíbrio dos PPARs devido à regulação negativa do PPAR-gama e do SREBP-1c concomitante à regulação positiva do PPAR-alfa e do seu gene alvo (CPT-1), reduzindo a lipotoxicidade e evitando a progressão da DHGNA para EHNA neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

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

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

Ahmed MH, Barakat S, Almobarak AO. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: has the time come for cardiologists to be hepatologists? *J Obes* 2012; 2012:483135.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23:469-480.

Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:3957-3961.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70 Suppl 3:52-56.

Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev* 2007; 65:S57-63.

Averna M, Missault L, Vaverkova H, Farnier M, Viigimaa M, Dong Q et al. 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.

Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res* 2013; 44:450-459.

Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2084-2089.

Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Latorre D, Villani G, Moschetta A. Hepatic-specific activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1beta protects against steatohepatitis. *Hepatology* 2013; 57:1343-1356.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7:221-239.

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.

Bostan C, Yildiz A, Ozkan AA, Uzunhasan I, Kaya A, Yigit Z. Beneficial effects of rosuvastatin treatment in patients with metabolic syndrome. *Angiology* 2015; 66:122-127.

Braamskamp MJ, Kusters DM, Avis HJ, Smets EM, Wijburg FA, Kastelein JJ et al. Long-term statin treatment in children with familial hypercholesterolemia: more insight into tolerability and adherence. *Paediatr Drugs* 2015; 17:159-166.

Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS. Statin treatment and new-onset diabetes: A review of proposed mechanisms. *Metabolism* 2014; 63:735-745.

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.

Buque X, Martinez MJ, Cano A, Miquilena-Colina ME, Garcia-Monzon C, Aspichueta P et al. A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats. *J Lipid Res* 2010; 51:500-513.

Cantiello F, Cicione A, Salonia A, Autorino R, De Nunzio C, Briganti A et al. Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review. *Int J Urol* 2015; 22:22-32.

Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry* 2005; 44:11741-11748.

Catta-Preta M. 2011. Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos. In: Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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.

Cederberg H, Stancakova A, Yaluri N, Modi S, Kuusisto J, Laakso M. Increased risk of diabetes with statin treatment is associated with impaired insulin sensitivity and insulin secretion: a 6 year follow-up study of the METSIM cohort. *Diabetologia* 2015; 58:1109-1117.

Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. *Cell* 2009; 138:476-488.

Chan DC, Pang J, Watts GF. Pathogenesis and management of the diabetogenic effect of statins: a role for adiponectin and coenzyme Q10? *Curr Atheroscler Rep* 2015; 17:472.

Choi HC, Song P, Xie Z, Wu Y, Xu J, Zhang M et al. Reactive nitrogen species is required for the activation of the AMP-activated protein kinase by statin in vivo. *J Biol Chem* 2008; 283:20186-20197.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114:842-845.

de Denus S, Spinler SA, Miller K, Peterson AM. Statins and liver toxicity: a meta-analysis. *Pharmacotherapy* 2004; 24:584-591.

de Keyser CE, Koehler EM, Schouten JN, Visser LE, Hofman A, Janssen HL et al. Statin therapy is associated with a reduced risk of non-alcoholic fatty liver in overweight individuals. *Dig Liver Dis* 2014; 46:720-725.

de Onis M, Blossner M. Prevalence and trends of overweight among preschool children in developing countries. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1032-1039.

Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, Gresti J, Du ZY, Chardigny JM et al. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR^{-/-} apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res* 2006; 47:2647-2655.

Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010; 103:71-83.

Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:525-540.

Duan XY, Zhang L, Fan JG, Qiao L. NAFLD leads to liver cancer: do we have sufficient evidence? *Cancer Lett* 2014; 345:230-234.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-1428.

Egawa T, Toda K, Nemoto Y, Ono M, Akisaw N, Saibara T et al. Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar^{-/-}) mice. *Lipids* 2003; 38:519-523.

Faria TS, Pereira-Silva DC, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, CA. M-d-L. 2013. Adipocytes: biology, regulation and health impact. In: Weber MJ, Hoffmann JM, editors. Nova Science Publisher.: New York. p 188.

Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B et al. Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem* 2012; 68:335-344.

Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123:259-270.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008a; 88:125-172.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008b; 134:1655-1669.

Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32 Suppl 7:S109-119.

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

Ginter E, Simko V. Statins: the drugs for the 21st century? *Bratisl Lek Listy* 2009; 110:664-668.

Giraudi PJ, Becerra VJ, Marin V, Chavez-Tapia NC, Tiribelli C, Rosso N. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Exp Mol Pathol* 2015; 98:85-92.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129:e28-e292.

Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Kowallick B, Huss S, Linhart M et al. Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology* 2014; 60:334-348.

Hammond RA, Levine R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2010; 3:285-295.

Holdgate GA, Ward WH, McTaggart F. Molecular mechanism for inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:528-531.

Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336:215-222.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292:1160-1164.

Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *J Hepatol* 2011; 55:227-228.

Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998; 81:582-587.

Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H, Kollar P, Janoutova G, Ochmanova R et al. Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:637-642.

Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32:1431-1437.

Kersten S. Effects of fatty acids on gene expression: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, liver X receptor alpha and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:371-374.

Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2008; 75:721-728.

Kimm SY, Obarzanek E. Childhood obesity: a new pandemic of the new millennium. *Pediatrics* 2002; 110:1003-1007.

Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis* 2011; 215:1-8.

Kopelman P. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions. Foresight Report: the obesity challenge ahead. *Proc Nutr Soc* 2010; 69:80-85.

Kostapanos MS, Liamis GL, Milionis HJ, Elisaf MS. Do statins beneficially or adversely affect glucose homeostasis? *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8:612-631.

Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic Fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28:339-350.

Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol* 2007; 47:142-156.

Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 2008; 43:419-428.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:89-118.

Lin L, Teng M, Zhao YJ, Khoo AL, Seet RC, Yong QW et al. Long-term Cost-effectiveness of Statin Treatment for Primary Prevention of Cardiovascular Disease in the Elderly. *Cardiovasc Drugs Ther* 2015; 10.1007/s10557-015-6584-7.

McKenney JM. Efficacy and safety of rosuvastatin in treatment of dyslipidemia. *Am J Health Syst Pharm* 2005; 62:1033-1047.

Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:656-665.

Mihos CG, Pineda AM, Santana O. Cardiovascular effects of statins, beyond lipid-lowering properties. *Pharmacol Res* 2014; 88:12-19.

Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV, Fernandez-Bermejo M, Lozano-Rodriguez T et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 2011; 60:1394-1402.

Moreno M, Ramalho LN, Sancho-Bru P, Ruiz-Ortega M, Ramalho F, Abraldes JG et al. Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296:G147-156.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; 384:766-781.

Onnerhag K, Nilsson PM, Lindgren S. Increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer during long-term follow-up of patients with biopsy-proven NAFLD. *Scand J Gastroenterol* 2014; 49:1111-1118.

Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:999-1007.

Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G et al. 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.

Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1424-1430.

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118:829-838.

Rao MS, Reddy JK. PPARalpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40:783-786.

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* 1993; 123:1939-1951.

Riche DM, Fleming JW, Malinowski SS, Black CA, Miller KH, Wofford MR. Resistant nonalcoholic Fatty liver disease amelioration with rosuvastatin and pioglitazone combination therapy in a patient with metabolic syndrome. *Ann Pharmacother* 2014; 48:137-141.

Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet* 2012; 380:565-571.

Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998; 339:953-959.

Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:232-239.

Rombouts K, Kisanga E, Hellemans K, Wielant A, Schuppan D, Geerts A. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 38:564-572.

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 et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:176-183.

Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:46-53.

Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; 29:22-35.

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* 1999; 96:13656-13661.

Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48:97-113.

Sun W, Lee TS, Zhu M, Gu C, Wang Y, Zhu Y et al. Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation* 2006; 114:2655-2662.

Svensson E, Nielsen RB, Hasvold P, Aarskog P, Thomsen RW. Statin prescription patterns, adherence, and attainment of cholesterol treatment goals in routine clinical care: a Danish population-based study. *Clin Epidemiol* 2015; 7:213-223.

Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36:4-12.

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.

Tijeras-Raballand A, Hainaud-Hakim P, Contreres JO, Gest C, Le Henaff C, Levy BI et al. Rosuvastatin counteracts vessel arterialisatation and sinusoid capillarisation, reduces tumour growth, and prolongs survival in murine hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010:640797.

Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, Shir K, Klein S, Granzow M et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010; 53:702-712.

Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR Functioning and Its Pathogenic Consequences Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Human Obesity. *PPAR Res* 2012; 2012:107434.

Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132:429-462.

Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 1980; 66:303-353.

Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:482-486.

Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008; 28:386-395.

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

Yoshida K, Matsuzaki K. Differential Regulation of TGF-beta/Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Front Physiol* 2012; 3:53.

Zhang X, Fitzsimmons RL, Cleland LG, Ey PL, Zannettino AC, Farmer EA et al. CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Lab Invest* 2003; 83:317-332.

Zhang X, Liu J, Su W, Wu J, Wang C, Kong X et al. Liver X receptor activation increases hepatic fatty acid desaturation by the induction of SCD1 expression through an LXRA α -SREBP1c-dependent mechanism. *J Diabetes* 2014; 6:212-220.

ANEXO A – Comitê de ética e 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 CEUA/016/2013 sobre "Efeitos benéficos do tratamento com Rosuvastatina sobre o remodelamento cardíaco e aórtico em camundongos obesos induzidos por dieta", sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/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 20/05/2013. Este certificado expira em 20/05/2017.

Rio de Janeiro, 20 de Maio de 2013.

Patricia Lisboa

Israel Felzenszwalb

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Ass. Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof. Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ

Matricula 34765 (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Termo de submissão do artigo científico à publicação

Experimental and Toxicology Pathology

Pathology_ExpToxicPathol@cultex-laboratories.com

para mandarim@uerj.br

Ms. Ref. No.: ETP-D-15-00189

Title: How beneficial Rosuvastatin is to non-alcoholic fatty liver disease and activation of hepatic stellate cells in mice?

Experimental and Toxicologic Pathology

Dear Prof Mandarin,

Your submission "How beneficial Rosuvastatin is to non-alcoholic fatty liver disease and activation of hepatic stellate cells in mice?" will be handled by Editorial Office Christine Weidl

You may check the progress of your paper by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/etp/>.

Your username is: mandarim@uerj.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ETP/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Experimental and Toxicologic Pathology