Daniel Ferraz de Campos Mazo

**Efeito anti-fibrogênico do doador de óxido nítrico
S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na esteato-hepatite
não alcoólica experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Gastroenterologia Clínica
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Pinto
Marques Souza de Oliveira

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mazo, Daniel Ferraz de Campos

Efeito anti-fibrogênico do doador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na esteato-hepatite não alcoólica experimental / Daniel Ferraz de Campos Mazo. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Gastroenterologia Clínica.

Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.S-nitroso-N-acetilcisteína 2.Fibrose 3.Células estreladas do fígado 4.Esteatohepatite 5.Estresse oxidativo 6.Óxido nítrico 7.Modelos animais

USP/FM/DBD-393/11

Dedicatória

Para meus pais João Carlos e Maria
Aparecida, meus irmãos Juninho e
Mariana e minha esposa Anna Rita,
pelo carinho e amor.

Agradecimentos

A Deus.

À minha família, que sempre me apoiou com muito amor e paciência, compreendendo os momentos em que estive ausente (não foram poucos).

À minha esposa Anna Rita, pelo amor e suporte. Eu te amo.

À Dra Claudia Oliveira, que me recebeu de coração aberto no seu grupo de estudo desde a residência médica e que, pelas suas atitudes, cativa quem está ao seu redor. O seu papel foi muito além de orientadora da tese. Reforçou em minha vida a importância da amizade, humildade, eficiência e determinação. Exemplo de sucesso. Muito obrigado.

Ao Tadeu, Isabel, Vicência, Bruno, Edson e Fabíola pela ajuda na confecção deste trabalho. Certamente sem o apoio de vocês isto seria impossível.

Ao Prof Flair pela confiança em mim depositada.

À Fabiana pela dedicação com que analisou as minhas lâminas e ao Prof Venâncio, por ter possibilitado o meu contato com a anatomia patológica.

Ao Prof Marcelo e Gabriela pela síntese e fornecimento do SNAC, além do apoio científico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.2 Patogênese da DHGNA/ EHNA	2
1.2.1 Resistência insulínica	3
1.2.2 Estresse oxidativo	4
1.2.3 Lipotoxicidade	6
1.2.4 Tecido adiposo e citocinas inflamatórias	7
1.3 Fibrogênese	10
1.3.1 Composição da matriz extracelular (MEC) do fígado normal e fibrótico.	11
1.3.2 Fontes celulares de MEC no fígado normal e fibrótico	14
1.3.3 Células estreladas hepáticas (HSCs)	15
1.3.4 Síndrome metabólica, ativação da HSC e fibrose	22
1.3.5 Resolução da fibrose	24
1.4 Óxido nítrico (NO)	28
1.4.1 Isoformas da óxido nítrico sintase e expressão no fígado	28
1.4.2 Interação molecular	29
1.4.3 NO e apoptose	31
1.4.4 Efeito antioxidante e no metabolismo lipídico	32
1.4.5 NO e fibrose	32
1.4.6 S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)	33
2. Objetivos	36

3. Métodos	37
3.1 Local	37
3.2 Animais	37
3.3 Procedimentos experimentais e delineamento do estudo	38
3.4 Síntese do S-nitrosotiol SNAC	38
3.5 Análise histológica: estadiamento	39
3.6 Análise histológica: quantificação de colágeno	40
3.7 Expressão Gênica	42
3.7.1 Extração do RNA Tecidual	42
3.7.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total	43
3.7.3 Curva de eficiência de amplificação dos genes alvo e do controle interno	45
3.7.4 Método de pré-amplificação gênica	46
3.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa Quantitativa Relativa (RT-qPCR)	47
3.7.6 Método de Análise da expressão Gênica	49
3.8 Análises Estatísticas	50
4. Resultados	52
4.1 Ingestão de dieta e ganho de peso	52
4.2 Macroscopia hepática	52
4.3 Análise histológica: estadiamento	54
4.4 Análise histológica: quantificação do colágeno	56
4.5 Expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo	56
4.6 Expressão de genes envolvidos na fibrogênese	57
5. Discussão	59
6. Conclusões	79
7. Referências	80

Lista de abreviaturas

α SMA -	actina de músculo liso- α
AG -	ácidos graxos
AGEs -	produtos finais de glicosilação avançada
AGL -	ácidos graxos livres
Akt -	proteína quinase B
apoB-100 -	apolipoproteína B-100
AT1 -	angiotensina I
Bcl-2 -	"B cell lymphoma 2"
BRA -	bloqueador do receptor de angiotensina
BSNO -	S-nitrosoalbumina
CCl ₄ -	tetracloreto de carbono
CDA -	deficiente em colina / L-aminoácido definida
C/EBP- β -	CCAAT/"enhancer binding protein- β "
CTGF -	fator de crescimento de tecido conjuntivo
CysNO -	S-nitroso-L-cisteína
DCM -	deficiente em colina e metionina
DHGNA -	doença hepática gordurosa não-alcoólica
DM2 -	diabetes mellitus tipo 2
EDRF -	fator relaxante derivado do endotélio
EGF -	fator de crescimento epidérmico
EHNA -	esteato-hepatite não-alcoólica
eNOS -	óxido nítrico sintase endotelial
ERK -	"extracellular signal-regulated kinase"
EROS -	espécies reativas de oxigênio
ET-1 -	endotelina 1
FGF -	fator de crescimento de fibroblasto
GSNO -	S-nitrosoglutationa
H ₂ O ₂ -	peróxido de hidrogênio
HNE -	4-hidroxinonenal
HSC -	célula estrelada hepática
HSP -	proteína de choque térmico
HVPG -	gradiente de pressão venosa hepática

IGF -	fator de crescimento tipo insulina
IKK- β -	inibidor da quinase do fator nuclear κ -B subunidade β
IL -	interleucina
iNOS -	óxido nítrico sintase induzível
IRS-1 -	receptor de insulina-1
JNK -	quinase c-Jun N-terminal
KC -	células de Kupffer
LPS -	lipopolissacárides
MCP-1 -	“monocyte chemoattractant protein-1”
MDA -	malondialdeído
MEC -	matriz extracelular
MF -	miofibroblastos hepáticos
MMP -	metaloproteinase de matriz
MTMBBD -	matriz tipo membrana basal de baixa densidade
MTP -	proteína de transferência de triglicérides microssomal
NF κ B -	fator nuclear κ B
NOX -	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
nNOS -	óxido nítrico sintase neuronal
N ₂ O ₃ -	trióxido de nitrogênio
NAC -	N-acetilcisteína
NO -	óxido nítrico
NO ₂ -	dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻ -	nitrito
NOS -	óxido nítrico sintase
O ₂ -	oxigênio
O ₂ ⁻ -	radical superóxido
ONOO ⁻ -	peroxinitrito
PAI -	inibidor do ativador de plasminogênio
PDGF -	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K -	fosfatidil inositol 3 quinase
PKC-3 -	proteína quinase C-3
PPAR- α -	“peroxisomal proliferator-activated receptor- α ”
PPAR- γ -	“peroxisomal proliferator-activated receptor- γ ”
r β PDGF -	receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas
RE -	retículo endoplasmático
RI -	resistência insulínica

RNA -	ácido ribonucléico
RNA _m -	ácido ribonucléico mensageiro
RSNOs -	S-nitrosotióis
RT-qPCR -	reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa quantitativa relativa
SNAC -	S-nitroso-N-acetilcisteína
SNAP -	S-nitroso-N-penicilamina
Smads -	“Smoe and mad related protein”
SRA -	sistema renina-angiotensina
SREBP-1 -	“sterol regulatory element binding protein-1”
SM -	síndrome metabólica
TAV -	tecido adiposo visceral
TG -	triglicerídeos
TGF- β 1 -	fator de crescimento transformador- β 1
TIMP-1 -	inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1
TIMP-2 -	inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2
TLR -	receptores “toll-like”
TNF- α -	fator de necrose tumoral- α
UDCA -	ácido ursodesoxicólico
VEGF -	fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL -	lipoproteínas de densidade muito baixa

Lista de figuras

Figura 1.	Fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica	9
Figura 2.	Alterações celulares e de matriz na fibrose hepática.....	14
Figura 3.	Vias de ativação da célula estrelada.....	21
Figura 4.	Expressão temporal das metaloproteinases de matriz e suas inibidoras teciduais na recuperação da fibrose hepática	28
Figura 5.	A compensação do óxido nítrico (NO) para as espécies reativas de oxigênio (EROS)	31
Figura 6.	Seleção das áreas de fibrose no tecido hepático	41
Figura 7.	Detecção colorimétrica das fibras colágenas coradas em vermelho ..	41
Figura 8.	Quantificação do colágeno marcado.....	42
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose 2%	44
Figura 10.	Curva de dissociação dos genes HSP-60, HSP-90, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e β -actina	46
Figura 11.	Mediana da ingestão diária de dieta nos animais do grupo SNAC e EHNA	52

Figura 12. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo Controle(RD93)	53
Figura 13. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo SNAC (RD66) ..	53
Figura 14. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo EHNA (RD74) ..	53
Figura 15. Aspectos macroscópicos hepáticos representativos e achados histológicos.....	55
Figura 16. Quantificação do colágeno nos animais Controle, SNAC e EHNA.....	56
Figura 17. Expressão de RNAm dos genes HSP-60 e HSP-90 nos animais do grupo SNAC e EHNA.....	57
Figura 18. Expressão de RNAm dos genes MMP-2, MMP-9 e MMP-13 nos animais do grupo SNAC e EHNA	58
Figura 19. Expressão de RNAm dos genes TIMP-1, TIMP-2, TGF β -1 e colágeno 1 α nos animais do grupo SNAC e EHNA.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1.	Identificação, concentração, absorbância e relação $A_{260/280}$ dos RNAs totais extraídos de amostras do tecido hepático de alguns animais.	44
Tabela 2.	Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados dos genes TIMP-1, TIMP-2, MMP-9, HSP-60 e HSP-90.	48
Tabela 3.	Identificação dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes β -actina, Colágeno 1 α (I), TGF β -1, MMP-2 e MMP-13.	49
Tabela 4.	Histologia hepática dos animais nos diferentes grupos.	54

Resumo

Mazo DFC. **Efeito anti-fibrogênico do doador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na esteato-hepatite não alcoólica experimental** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: Já foi mostrado que o óxido nítrico (NO) age como um potente inibidor da peroxidação lipídica, um dos principais contribuintes para a fibrogênese na esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA). O S-Nitroso-N-acetilcisteína (SNAC), um doador de NO, modula a ativação de células estreladas hepáticas e tem mostrado efeitos benéficos na EHNA experimental. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do SNAC como um agente anti-fibrogênico na EHNA experimental.

Métodos: Ratos Sprague-Dawley adultos foram alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina e expostos a dietilnitrosamina (DEN) durante 8 semanas. Dez animais receberam SNAC (1,4 mg/ kg) por gavagem diariamente (grupo SNAC) e 10 receberam veículo (grupo EHNA). Três animais receberam somente dieta padrão e veículo (grupo Controle). Após este período, os animais foram sacrificados e o tecido hepático retirado para avaliação histológica, quantificação do colágeno e análises de expressão gênica. Genes relacionados à fibrose [metaloproteinase de matriz (MMP)-2, 9 e 13, e, TGF β -1, colágeno-1 α , inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP)-1 e 2] e genes relacionados ao estresse oxidativo [proteínas de choque térmico (HSP)-60 e 90] foram avaliados.

Resultados: O SNAC levou a atenuação da fibrose hepática verificada pela quantificação de colágeno, e este efeito foi associado com supra-regulação da MMP-13, MMP-9 e infra-regulação da HSP-60, TIMP-2, TGF β -1 e colágeno-1 α .

Conclusões: O SNAC apresenta propriedades anti-fibrogênicas no modelo de EHNA empregado, infra-regula moléculas pró-fibrogênicas e supra-regula a MMP-13, um fator determinante da degradação do colágeno intersticial. Nossa hipótese é que o SNAC, pela redução do estresse oxidativo, leva a um padrão de expressão gênica que favorece uma maior remoção de colágeno, com conseqüente atenuação da fibrose hepática na EHNA, sugerindo que SNAC é um potencial agente anti-fibrogênico neste contexto.

Descritores: S-nitroso-N-acetilcisteína; Fibrose; Células estreladas do fígado; Esteatohepatite; Estresse oxidativo; Óxido nítrico; Modelos animais.

Abstract

Mazo DFC. **Anti-fibrogenic effect of the nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) in experimental non-alcoholic steatohepatitis.** [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: Nitric oxide (NO) has already been shown to act as a potent inhibitor of lipid peroxidation, a major contributor for fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). S-Nitroso-N-acetylcysteine (SNAC), an NO donor, modulates hepatic stellate cells activation and has shown beneficial effects on experimental NASH. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of SNAC as an antifibrogenic agent in experimental NASH.

Methods: Adult Sprague-Dawley rats were fed choline-deficient high fat diet and exposed to diethylnitrosamine during 8 weeks, during which 10 animals received SNAC (1.4 mg/kg) by daily gavage (SNAC group) and 10 animals received vehicle (NASH group). Another group (Control; n=3) received only standard diet and vehicle. After this period, liver tissue was obtained for histological study, collagen quantification and gene expression analyses. Genes related to fibrosis [matrix metalloproteinase (MMP)-13, 9 and 2, TGF β -1, collagen-1 α , tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and 2] and genes related to oxidative stress [heat-shock protein (HSP)-60 and 90] were evaluated.

Results: SNAC led to attenuation of liver fibrosis, verified through collagen quantification, and this effect was associated with up-regulation of MMP-13, MMP-9 and down-regulation of HSP-60, TIMP-2, TGF β -1 and collagen-1 α .

Conclusions: SNAC shows antifibrogenic properties in the NASH model employed, down-regulates profibrogenic molecules and up-regulates MMP-13, a key determinant of interstitial collagen degradation. We hypothesize that SNAC, through oxidative stress lowering, leads to a gene expression pattern that favors greater collagen removal, with consequent attenuation of liver fibrosis in NASH. Our findings suggest that SNAC is a potential antifibrogenic agent in this setting.

Descriptors: S-nitroso-N-acetylcysteine; Fibrosis; Hepatic Stellate Cells; Fatty Liver; Oxidative Stress; Nitric Oxide; Models, Animal.

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a doença hepática mais comum do mundo moderno. Refere-se a um amplo espectro de danos no fígado, que vão desde esteatose e esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA) até fibrose avançada e cirrose¹. Há evidência ampla e convincente da associação entre DHGNA e componentes da síndrome metabólica (SM), principalmente obesidade central e resistência insulínica/ Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)².

A fibrose hepática é um dos principais desfechos da DHGNA, e geralmente, precede a hepatocarcinogênese³. Os achados fisiopatológicos combinados da DHGNA e carcinoma hepatocelular associado à fibrose proporcionaram um interesse crescente na pesquisa na área da hepatologia, com o objetivo de se identificar os mecanismos celulares e moleculares básicos associados com a inflamação hepática crônica e suas diversas conseqüências. Neste contexto, os modelos animais podem permitir a descoberta de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da DHGNA e também impedir a sua evolução para estádios mais avançados.

Entre as vias centrais de sinalização inflamatória que governam a transição da lesão hepática crônica para fibrose e carcinoma hepatocelular, o estresse oxidativo é frequentemente reconhecido por estar envolvido na gênese e progressão da DHGNA^{4 5}.

1.2 Patogênese da DHGNA/ EHNA

A fisiopatologia da DHGNA não está completamente esclarecida. Somente cerca de 10-25% dos pacientes com DHGNA desenvolvem EHNA⁶ e os fatores responsáveis pela mudança de esteatose para EHNA são tema de extensa investigação e especulação, mas ainda permanecem desconhecidos.

Em 1998, Day e colaboradores propuseram o modelo de “dois impactos” (“two hits”)⁷, a primeira tentativa de fornecer uma base racional fisiopatológica para a progressão do dano hepático⁸. Neste modelo, o primeiro impacto (“first hit”) seria o acúmulo de ácidos graxos (AG) nos hepatócitos e o segundo impacto (“second hit”) seria o aumento do estresse oxidativo e endotoxemia crônica, desencadeando inflamação e fibrose. Atualmente, a maioria dos autores acredita na teoria dos múltiplos impactos (“multiple hits”), destacando-se a resistência insulínica (RI) como condição inicial para o acúmulo de AG no hepatócito, uma vez que favorece a lipogênese e inibe a lipólise, aumentando excessivamente o aporte de AG a esse órgão, seguida de uma seqüência de eventos como o aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e endotoxemia crônica (múltiplos impactos)⁹. Este fígado esteatótico se tornaria vulnerável aos múltiplos impactos, culminando com lesão hepatocelular, inflamação e fibrose⁷.

Essa visão tem sido contestada por recentes achados sugerindo que os mesmos estímulos nocivos podem determinar tanto a infiltração de gordura como necroinflamação e fibrose hepática, e que o acúmulo hepático de triglicerídeos (TG) pode de fato proteger os hepatócitos da toxicidade dos ácidos graxos livres (AGL)^{10 11}.

A seguir serão apresentados os principais componentes envolvidos na patogênese da DHGNA, assim como conceitos emergentes. É importante enfatizar que os componentes descritos a seguir muitas vezes ocorrem de maneira simultânea, sendo aqui divididos em tópicos para fins didáticos.

1.2.1 Resistência insulínica

Existe uma forte associação entre RI e deposição excessiva de TG nos hepatócitos^{12 13}. Entretanto, ainda é motivo de debate se a RI causa a DHGNA ou se o acúmulo excessivo de TG ou seus precursores na via sintética precedem e promovem RI^{14 15}.

A RI gera diversas alterações no metabolismo lipídico que predispõe à esteatose hepática. No tecido adiposo a RI acentua a lipólise de TG e inibe a esterificação de AGL, resultando em um aumento dos níveis circulantes de AGL, que são captados pelo fígado. Adicionalmente nos hepatócitos, a hiperinsulinemia aumenta a síntese *de novo* de AGs e inibe sua β -oxidação. A consequência destas ações ocasionadas pela insulina é o acúmulo de AGL dentro dos hepatócitos. Além disso, a síntese hepática de TG é guiada pelo aumento do conteúdo de AGL nos hepatócitos e favorecida pela supra-regulação, mediada pela insulina, de enzimas lipogências, como “peroxisomal proliferator-activated receptor- γ ” (PPAR- γ) e “sterol regulatory element binding protein-1” (SREBP-1)¹⁶.

Por outro lado, o excesso de AGL contribui para a RI por meio da infra-regulação do receptor de insulina (IRS-1) assim como via mecanismos envolvendo a ativação da proteína quinase C-3 (PKC-3), quinase c-Jun N-

terminal (JNK), inibidor da quinase do fator nuclear κ -B subunidade β (IKK- β) e fator nuclear κ B (NF κ B)¹⁷. A ativação do fator de transcrição NF κ B leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina (IL)-6], que podem causar RI hepática e sistêmica^{18 19}.

A RI hepática facilita o deslocamento dos AGL para β -oxidação, o influxo de AGLs dentro da mitocôndria (com defeito da fosforilação oxidativa), a indução de lipoxigenases do citocromo P-450 e a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), fatores desencadeantes de lesão hepatocelular e fibrose^{20 21 22}, tema que será abordado posteriormente. A RI também bloqueia a secreção de TG dos hepatócitos pelo aumento da degradação intracelular de VLDL e apolipoproteína B-100 (apoB-100) e bloqueia a exocitose de vesículas contendo VLDL^{23 24}. A exportação dos TG também pode ficar prejudicada pela diminuição da síntese de apoB ou decorrente da ligação reduzida do TG na apoB pela proteína de transferência de triglicérides microssomal (MTP)²⁵.

Desta maneira é possível observar que a entrada e síntese *de novo* de AGL no fígado ultrapassam sua oxidação e secreção de TG, resultando em um efeito em cascata de acúmulo hepático de gordura, podendo explicar o papel chave da RI no desenvolvimento da esteatose hepática e potencialmente na EHNA.

1.2.2 Estresse oxidativo

Tanto as EROS como as espécies reativas de nitrogênio e outros radicais livres são intermediários críticos na fisiologia e fisiopatologia dos hepatócitos. Quando o equilíbrio entre a geração de EROS e a defesa

antioxidante da célula é rompido, ocorre o estresse oxidativo²⁶. As EROS ou as espécies reativas de nitrogênio provenientes da mitocôndria, do retículo endoplasmático e dos peroxissomos apresentam um papel importante na patogênese da EHNA²⁷ e serão discutidos a seguir.

O estresse oxidativo e a formação de produtos bioativos de peroxidação lipídica são amplamente implicados como sendo anormalidades chave responsáveis pela lesão hepática e progressão da doença na EHNA²⁸. Estudos experimentais e em humanos têm demonstrado aumento do estresse oxidativo e de produtos de peroxidação lipídica na circulação e no fígado de diferentes modelos animais e pacientes com EHNA^{29 30 31 32}.

A β -oxidação no fígado normal ocorre na mitocôndria, porém no contexto da DHGNA, este processo pode ficar sobrecarregado como resultado do aumento da carga de AGL, originando as EROS^{33 34}. As EROS podem agir nos ácidos graxos poliinsaturados e iniciar a peroxidação lipídica, resultando na formação de moléculas de longa duração e com capacidade de atingir locais distantes. Na depleção da oxidação mitocondrial mecanismos alternativos de oxidação são ativados como a β -oxidação nos peroxissomos e a ω -oxidação microsomal resultando na formação adicional de EROS³⁵. Este aumento das EROS e conseqüente peroxidação lipídica podem gerar produtos intermediários que são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as células estreladas hepáticas (HSCs), favorecendo a fibrogênese^{36 37}.

Além da origem hepatocitária, as EROS e estresse oxidativo nos pacientes obesos também podem se originar no tecido adiposo (tanto nos adipócitos como em macrófagos infiltrando o tecido adiposo)^{38 39}. As EROS também aumentam a expressão de ligantes Fas nos hepatócitos causando

apoptose⁴⁰ e iniciam a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias [TNF- α , fator de crescimento transformador- β (TGF- β), IL-6 e 8], que também parecem ter um papel importante na patogênese da DHGNA^{41 42}.

Desta forma, a progressão de esteatose para EHNA e fibrose poderia ocorrer por três mecanismos principais: peroxidação lipídica, indução de citocinas pró-inflamatórias e também indução de ligantes Fas (e apoptose)²⁷. A peroxidação de lípidos deflagrada pelas EROS causa necrose celular ou induz apoptose. Ela também é responsável pela liberação de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), que podem se ligar a proteínas hepatocitárias (formando neoantígenos e iniciando uma resposta imune potencialmente danosa), gerar citoqueratinas de ligação cruzada para formar corpúsculos hialino de Mallory ou ativar HSCs promovendo síntese de colágeno e estímulo de quimiotaxia de neutrófilos^{43 44}.

1.2.3 Lipotoxicidade

Dados recentes indicam que o acúmulo de TG por si só não é prejudicial para os hepatócitos e pode representar na verdade um mecanismo de proteção contra a lipotoxicidade^{10 11 45}. No entanto, o armazenamento de TG como gotículas de gordura é apenas uma medida temporária. Os AGs no TG devem ser liberados em algum momento, e se a célula ainda for incapaz de lidar com eles adequadamente por outras vias metabólicas, os TG armazenados podem ainda servir como uma fonte de intermediários lipotóxicos⁴⁶.

O aumento dos níveis de AGL pode ser diretamente tóxico aos hepatócitos por diversos mecanismos: desestabilização lisossomal, estimulação de TNF- α ⁴⁷ e supra-regulação de isoenzimas do citocromo P450, levando ao aumento da geração de EROS e peroxidação lipídica⁴⁸. Este aumento da concentração de AGL também pode levar a uma sustentada supra-regulação do “peroxisomal proliferator-activated receptor- α ” (PPAR- α). O PPAR- α promove oxidação de AGs e sua eliminação, mas também aumenta o estresse oxidativo pela produção de derivados do ácido dicarboxílico, e também pode predispor à carcinogênese⁴⁹. Os AGs saturados também podem servir como ligantes ativadores para os receptores “toll-like” (TLR) tipo 4, levando a uma cascata de eventos precipitando apoptose⁵⁰.

1.2.4 Tecido adiposo e citocinas inflamatórias

O tecido adiposo é hoje reconhecido não apenas como um local de depósito de gordura, mas como um órgão endócrino ativo que secreta diversas moléculas, descritas como adipocitocinas (adiponectinas, leptina, resistina, TNF- α , etc)^{51 52}. O tecido adiposo visceral (TAV) é mais biologicamente ativo que o subcutâneo, liberando quantidades maiores de adipocitocinas. Estas adipocitocinas têm sido relacionadas à RI hepática e parecem contribuir para o desenvolvimento de fibrose⁵³. Diferentemente da leptina e da adiponectina, a maioria das citocinas pró-inflamatórias liberadas do tecido adiposo vem a partir da fração não-adipócitos, e o TAV é uma fonte abundante dessa fração⁵⁴. Assim, macrófagos recrutados desempenham um papel fundamental na inflamação associada à obesidade. O tecido adiposo infiltrado por macrófagos

representa a maior fonte de TNF- α , que está associado ao antagonismo da adiponectina e fator contribuidor da RI. O TNF- α e a IL-6 podem ativar o NF κ B e a JNK, interferindo diretamente na transdução do sinal de insulina. A superprodução de TNF- α no fígado parece exercer um papel patogênico na DHGNA⁵⁵.

Além destes componentes, também têm sido implicados na patogênese da DHGNA/ EHNA o supercrescimento bacteriano e endotoxemia derivada do trato gastrointestinal^{56 57}, as alterações mitocondriais⁵⁸ e recentemente a proliferação hepatocitária inadequada^{34 59}.

Desta maneira, é possível observar que a patogênese da DHGNA/ EHNA é multifatorial. A figura 1 mostra um esquema resumido da fisiopatogênese da DHGNA/ EHNA.

Figura 1.

Fisiopatogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica.

(Adaptado de Cheung O, Sanyal AJ⁶⁰). A RI (resistência insulínica) periférica decorrente de fatores ambientais e genéticos leva ao aumento da oferta de AGLs (ácidos graxos livres) para o fígado, resultando em um desequilíbrio entre a oxidação e exportação dos mesmos, e sua captação e síntese, promovendo assim a esteatose hepática. A produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) do metabolismo de AGL via oxidação causa apoptose e desencadeia lesão inflamatória e ativação das HSCs (células estreladas hepáticas) levando à fibrose hepática. O aumento dos AGLs hepáticos também resulta em estresse do RE (retículo endoplasmático), inflamação hepatocelular e apoptose pela ativação da JNK (quinase c-Jun N-terminal). O tecido adiposo secreta adipocitocinas, como a leptina, que tem um papel direto na regulação do metabolismo dos adipócitos e em vários processos mediado pela insulina. Já a adiponectina é antiinflamatória e anti-esteatótica, tendo sua secreção parcialmente regulada pelo TNF- α (fator de necrose tumoral α) cuja síntese é mediada pelo NF κ B (fator nuclear κ B).

1.3 Fibrogênese

A fibrose hepática é uma resposta de cicatrização reversível caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC) após lesão hepática⁶¹. Apesar de até mesmo lesões agudas ativarem os mecanismos de fibrogênese, os sinais sustentados originados pela doença hepática crônica causada por infecções, drogas, desordens metabólicas ou sistema imune são necessários para o acúmulo de fibrose significativa⁶². Este processo resulta em cirrose, a consequência final da fibrose progressiva, com distorção do parênquima hepático e da arquitetura vascular, podendo ter um desfecho clínico ruim e com alta mortalidade. A principal característica patológica da cirrose é a formação de nódulos regenerativos de parênquima cercados por septos fibróticos, que podem incorporar vênulas hepáticas terminais e tratos portais quando os nódulos são especialmente grandes. Desvios porto-sistêmicos e oclusão venosa geralmente ocorrem, levando à deficiência na função hepática e ao desenvolvimento de hipertensão portal. A formação de septos fibrosos vascularizados que conectam os tratos portais e as veias centrais é estimulada pela angiogênese e contribui para o desvio porto-sistêmico⁶³.

Embora a fibrose seja reversível em seus estágios iniciais, a fibrose progressiva pode levar à cirrose. O ponto exato em que a fibrose se torna irreversível não é completamente compreendido. No entanto, cada vez mais evidências sugerem que mesmo os estágios iniciais de cirrose podem ser reversíveis^{64 65 66 67}. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na fibrogênese pode permitir o desenvolvimento de intervenções destinadas a impedir ou reverter a fibrose hepática, pois até o momento ainda não existe

nenhuma droga anti-fibrótica aprovada para uso clínico em pacientes com doença hepática avançada.

1.3.1 Composição da matriz extracelular (MEC) do fígado normal e fibrótico

As HSCs residem no espaço subendotelial de Disse, que contém uma matriz tipo membrana basal de baixa densidade (MTMBBD) essencial para a manutenção da função diferenciada das células parenquimatosas e suficientemente porosa para permitir a troca metabólica entre a corrente sanguínea e os hepatócitos⁶¹.

A MEC refere-se a um grupo de macromoléculas que compõem o arcabouço do fígado normal e fibrótico. Estas macromoléculas incluem colágenos, glicoproteínas não-colágenas, fatores de crescimento ligados à matriz, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas de matriz celular. Além de fornecer o arcabouço do fígado, as moléculas da matriz são hoje reconhecidas por apresentarem outras funções, como por exemplo, serem transdutoras transmembrana de sinais extracelulares. No fígado normal, a MEC é um substrato muito dinâmico, com um balanço precisamente regulado entre síntese e degradação. Durante a lesão hepática crônica a produção de MEC excede a degradação, e a fibrose hepática se desenvolve como resultado do progressivo espessamento de septos fibróticos e das ligações químicas cruzadas do colágeno.

No fígado normal, colágenos tipos I, III, V e XI (por vezes referidos como colágenos formadores de fibrilas) são principalmente encontrados na cápsula, em torno de grandes vasos, e na tríade portal, enquanto fibrilas dispersas

contendo apenas colágeno tipo I e III podem ser encontradas no espaço subendotelial. Pequenas quantidades de outros colágenos, incluindo os tipos IV, VI, XIV e XVIII também podem ser encontradas. Também estão presentes glicoproteínas e proteínas de matriz celular, incluindo depósitos subendoteliais de fibronectina, laminina, tenascina e fator de Von Willebrand. Os proteoglicanos consistem principalmente de proteoglicanos de sulfato de heparan, como o perlecan⁶⁸. A MTMBBD do espaço de Disse no fígado normal é composta principalmente de colágeno tipo IV e VI⁶¹.

Conforme será descrito posteriormente, com a lesão hepática as HSCs tornam-se ativadas e secretam grandes quantidades de MEC, resultando em espessamento progressivo dos septos. O conteúdo total de colágeno aumenta 3 a 10 vezes⁶⁹. Nesta situação ocorre alteração da matriz, com aumento dos colágenos formadores de fibrila (Tipos I, III e V), de alguns colágenos não formadores de fibrila (Tipos IV e VI) e de uma série de glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos⁷⁰. Ocorre uma mudança dos proteoglicanos para aqueles contendo condroitina e sulfato de dermatan. Esses processos representam uma mudança no tipo de MEC no espaço subendotelial da MTMBBD normal para matriz do tipo intersticial.

Essas mudanças quantitativas e qualitativas na composição da MEC alteram o microambiente da matriz e podem estimular diretamente a fibrogênese^{61 68}. Além disso, a deposição de MEC no espaço de Disse leva à perda das fenestrações normais que são características do revestimento endotelial, o que provoca o comprometimento da troca metabólica bidirecional normal entre o fluxo venoso portal e os hepatócitos (Figura 2). Este processo é chamado de capilarização dos sinusóides⁷¹.

Fígado normal

Fígado fibrótico

Figura 2.

Alterações celulares e de matriz na fibrose hepática.

(Adaptado de Hernandez-Gea V, Friedman SL⁶¹). Os sinusóides são separados dos hepatócitos por uma matriz tipo membrana basal de baixa densidade confinada ao espaço de Disse, o que assegura as trocas metabólicas. Com a lesão, as HSCs (células estreladas hepáticas) tornam-se ativadas e secretam grandes quantidades de matriz extracelular, resultando em espessamento progressivo dos septos. A deposição de matriz extracelular no espaço de Disse leva à perda das fenestrações endoteliais e dos microvilos dos hepatócitos, o que resulta tanto no comprometimento das trocas metabólicas entre o fluxo venoso portal e os hepatócitos como também leva ao desenvolvimento de hipertensão portal. KC (células de Kupffer).

A próxima fase na fibrogênese é caracterizada pela expansão da MEC do espaço porta ou veia centro lobular levando à “fibrose em ponte”, que é acompanhada de angiogênese. Quando a maioria dos espaços vasculares está interconectada, a cirrose ocorre. Desta maneira, a fibrose causa distorção arquitetural, alteração na função hepática, redistribuição vascular e hipertensão portal⁷². Na EHNA, o padrão de fibrose inicial que ocorre é perissinusoidal e, ou também, pericelular⁷³. Neste contexto, a deposição excessiva de MEC é vista primeiro no espaço de Disse e leva ao padrão peculiar de tela de galinheiro (“chicken-wire”).

1.3.2 Fontes celulares de MEC no fígado normal e fibrótico

A descoberta da ativação de HSCs, com trans-diferenciação a partir de uma célula quiescente armazenadora de vitamina A para um miofibroblasto proliferativo permanece entre as descobertas mais informativas até o momento na elucidação das bases da fibrogênese hepática⁶². As HSCs (anteriormente chamadas de lipócitos, células de Ito, células armazenadoras de gordura ou célula perissinusoidais) são a principal fonte de MEC no fígado normal e fibrótico. Entretanto, outras células também podem trans-diferenciar em miofibroblastos (MFs), embora sua exata contribuição para a doença humana permaneça desconhecida. Essas células incluem células derivadas da medula óssea, fibroblastos portais e transição epitélio-mesenquimal de hepatócitos e colangiócitos.

1.3.3 Células estreladas hepáticas (HSC)

A célula estrelada hepática (HSC), primeiramente descrita por Kupffer em 1876, tem se mostrado nos últimos 25 anos como uma célula mesenquimal extremamente versátil, vital para a função hepatocelular e a resposta do fígado à lesão⁷⁴. As HSCs representam cerca de um terço da população de células não parenquimatosas e 15% do número total de células residentes no fígado normal. O seu traço mais característico no fígado normal é o armazenamento citoplasmático de gotas de vitamina A (retinóides). Em condições fisiológicas, a HSC mostra um retículo endoplasmático rugoso moderadamente desenvolvido, um complexo de Golgi pequeno e longos processos citoplasmáticos que envolvem os sinusóides no espaço de Disse. Estes processos apresentam numerosas microsaliências que servem como sensores para a transmissão de sinais quimiotáticos⁷⁵. Além disso, as HSCs estão em contato direto com as terminações nervosas, confirmando suas interações neuro-humorais⁷⁵.

A ativação das HSCs refere-se à transformação de uma célula rica em vitamina A em repouso para um estado proliferativo, fibrogênico e contrátil. Embora seja cada vez mais claro que outras populações de células mesenquimais também possam contribuir para o acúmulo de MEC, a ativação de HSCs continua a ser a via mais dominante levando à fibrose hepática. A ativação consiste de duas grandes fases: a iniciação e perpetuação, seguida pela resolução da fibrose caso o insulto seja retirado⁷⁴. As fases da ativação das HSCs serão descritas a seguir.

1.3.3.1 Iniciação

1.3.3.1.1 Estímulos de ativação

Esta fase de iniciação se refere a alterações precoces do fenótipo e expressão gênica das HSCs, que as tornam sensíveis a citocinas e estímulos. Os estímulos desencadeadores da ativação das HSCs incluem sinais parácrinos, tais como EROS e citocinas. Nesta fase ocorre também rápida indução do receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (r β PDGF) e da expressão gênica de colágeno tipo I⁶².

1.3.3.1.1.1 Células vizinhas: endoteliais, KC, hepatócitos e plaquetas

As primeiras alterações observadas durante a ativação das HSCs resultam da estimulação parácrina por todos os tipos de células vizinhas, incluindo endotélio sinusoidal, KC, hepatócitos, colangiócitos e plaquetas. A lesão precoce de células endoteliais estimula a produção de fibronectina celular, que tem um efeito ativador sobre as HSCs. Além disso, as células endoteliais também são cogitadas de participarem na conversão de TGF- β latente para ativo, pró-fibrogênico. As plaquetas são outra fonte importante de estímulo parácrino, via fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β 1 e fator de crescimento epidérmico (EGF). O TGF- β 1 derivado tanto de fontes parácrinas quanto autócrinas é a citocina fibrogênica mais potente e bem caracterizada. A infiltração e ativação das KC também contribuem para a ativação das HSCs. As KCs estimulam a síntese de matriz, proliferação celular

e liberação de retinóides pelas HSCs através das ações de citocinas, especialmente TGF- β 1, e intermediários reativos de oxigênio e, ou também, peróxidos lipídicos⁷⁶. Os hepatócitos também são fonte potente de peróxidos lipídicos fibrogênicos. Apesar da necrose de hepatócitos associada à peroxidação lipídica ser considerada um estímulo inflamatório clássico e fibrogênico, a apoptose também tem sido implicada na resposta fibrogênica, seja pela ativação das HSCs via *Fas* ou pelo desmembramento do mediador anti-apoptótico Bcl-xL⁷⁷.

1.3.3.1.1.2 Espécies reativas de oxigênio (EROS)

É possível observar que qualquer perturbação crônica da homeostase hepática pode desencadear os sinais necessários para estimular a fibrogênese. Uma família destes mediadores estabelecidos são as EROS. Estes compostos instáveis incluem os radicais superóxido e hidroxila, peróxido de hidrogênio e produtos finais aldeídicos, incluindo o HNE. Estes mediadores são gerados pela peroxidação lipídica e podem derivar de hepatócitos, macrófagos, HSCs e células inflamatórias. A via clássica de geração de EROS nos hepatócitos resulta da indução do citocromo P450 2E1, especialmente na EHNA⁷⁸, levando à lesão pericentral (zona 3). Além disso, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase [NADPH oxidase (NOX)] serve de mediadora na ativação fibrogênica das HSCs, bem como, nas KC pela geração de estresse oxidativo⁷⁹.

EROS, HNE e outros mediadores relacionados ao estresse oxidativo podem afetar diretamente o comportamento das HSCs⁷³, promovendo sua

ativação⁴⁴. De fato, EROS e HNE têm sido associados à supra-regulação de genes pró-fibrogênicos críticos, como o pró-colágeno tipo I, o inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1 (TIMP-1) e a citocina inflamatória “monocyte chemoattractant protein-1” (MCP-1), possivelmente pela ativação de uma série de vias críticas de transdução de sinais e fatores de transcrição, incluindo a ativação de JNKs e no caso das EROS, NF- κ B⁷³.

1.3.3.1.1.3 Mudanças na MEC e sistema imune

Os eventos iniciais de ativação das HSCs estão ocorrendo em um contexto de mudanças progressivas na MEC no espaço de Disse. Além do efeito da fibronectina celular na ativação da HSC descrito previamente, as mudanças progressivas na MEC com o acúmulo de fibrose instigam diversas vias de retroalimentação positiva que amplificam ainda mais a fibrose⁶². Estas vias envolvem receptores de membrana, como as integrinas⁸⁰, proteínas ligadoras de guanosina trifosfato conectadas à membrana (Rho e Rac)⁸¹, ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs)⁶⁸ e estímulo para ativação da HSC pelo aumento da rigidez da matriz⁸².

As HSCs parecem também estar envolvidas na resposta imune hepática, uma vez que elas expressam TLRs e outras proteínas ligadas à membrana que são críticas na regulação da imunidade inata e adaptativa. HSCs ativadas expressam TLR4, CD14 e MD2, que juntos formam o complexo receptor de lipopolissacárides (LPS), permitindo interagir com a superfície bacteriana e funcionar como célula apresentadora de antígeno. A seguir será descrita a fase de perpetuação da ativação das HSCs.

1.3.3.2 Perpetuação

A perpetuação da ativação das HSCs envolve alterações no comportamento celular: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação de matriz, perda de retinóide e liberação de citocinas e, ou também, quimioatrativos de leucócitos⁷⁴.

Proliferação: O PDGF é o mitógeno de HSC mais potente identificado, principalmente a isoforma D⁸³. Vias sequenciais ao PDGF incluem a sinalização de fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), JNK, e “extracellular signal-regulated kinase” (ERK)⁶². A lista dos mitógenos identificados nas HSCs tem sido crescente, incluindo também endotelina 1 (ET-1), trombina e seu receptor, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF) e fator de crescimento epidérmico^{62 74 84}.

Quimiotaxia: As HSCs podem migrar na direção de citocinas quimioatrativas como PDGF e MCP-1.

Fibrogênese: As HSCs geram fibrose não só pelo número aumentado de células, mas também pelo aumento da produção de matriz por cada célula⁷⁴. O componente melhor estudado de cicatriz hepática é o colágeno tipo I, cuja produção é estimulada principalmente pelo TGF- β , derivado de fontes tanto parácrinas como autócrinas, que também estimula a produção de outros componentes da matriz como fibronectina celular e proteoglicanos. As HSCs são a fonte mais importante de TGF- β 1 na fibrose hepática, porém as KC e plaquetas também secretam essa citocina. Sinais seqüenciais ao TGF- β incluem uma família de moléculas bifuncionais conhecidas como “Smoe and mad related protein” (Smads)⁸⁵. As Smads 2 e 3 são estimulatórias, enquanto

a Smad 7 é inibitória. O fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF/CCN2) também é um potente sinal fibrogênico para a HSC, que é supra-regulado por hiperglicemia e hiperinsulinemia. Sinalização neuro-humoral também contribui para as respostas da HSC. Os canabinóides são potentes mediadores de esteatose hepática, ativação de HSC e fibrose⁸⁶.

Contratibilidade: A contratilidade das HSCs pode ser um dos principais determinantes do aumento precoce e tardio da resistência portal durante a fibrose hepática. No processo de tornarem-se contráteis, as HSCs apresentam expressão aumentada de actina de músculo liso- α (α -SMA)⁷⁴. Com a ativação da HSC, ocorre uma mudança no tipo predominante de receptor de endotelina e aumento da sensibilidade autócrina à ET-1, considerada o principal estímulo para a contração da HSC. Substâncias vasodilatadoras localmente produzidas [particularmente o óxido nítrico (NO)] podem neutralizar os efeitos constritivos da ET-1^{62 87}.

Perda de retinóide: A ativação das HSCs é acompanhada pela perda das gotas de retinóide perinuclear.

Sinalização inflamatória e quimioatração de leucócitos: As HSCs tem se mostrado moduladoras centrais da inflamação hepática e imunidade, e não apenas alvos passivos de citocinas inflamatórias⁶².

Degradação da matriz: Como as HSCs expressam praticamente todos os componentes necessários para a degradação da matriz patológica, têm um papel fundamental não só na produção da matriz, mas também na sua degradação. A ruptura inicial da matriz hepática normal pelas MMPs ocorre previamente à sua reposição por matriz cicatricial. A degradação neste contexto é referida como sendo “patológica”, enquanto a reabsorção do

excesso de matriz nas doenças hepáticas crônicas está associada à resolução e, ou também, reversão da fibrose, onde assumem papel importante as MMPs e suas inibidoras teciduais. Este processo será descrito posteriormente. As vias de ativação das HSCs são mostradas resumidamente na figura 3^{62 88}.

Figura 3. Vias de ativação da célula estrelada.

(Adaptado de Kawada N⁸⁸ e Friedman SL⁶²). As características de ativação da célula estrelada podem ser distinguidas entre aquelas que estimulam a iniciação e aquelas que contribuem para a perpetuação. A iniciação é provocada por estímulos solúveis que incluem intermediários de estresse oxidativo, corpúsculos apoptóticos, lipopolissacarídeos e estímulo parácrino de células vizinhas (células de Kupffer, endotelial sinusoidal e hepatócitos). A perpetuação é caracterizada por inúmeras alterações fenotípicas específicas da célula estrelada.

1.3.4 Síndrome metabólica, ativação da HSC e fibrose

A associação entre a SM e fibrose hepática sugere fortemente que os mediadores desta síndrome também sejam efetores ou moduladores da fibrose⁸⁹. A seguir serão descritas associações entre os componentes da SM e a ativação da HSC.

1.3.4.1 Hiperglicemia

A hiperglicemia causa supra-regulação do CTGF⁹⁰, um potente sinal fibrogênico para a HSC. Os AGLs liberados em excesso pelos adipócitos resistentes à insulina causam dano aos hepatócitos, promovendo estímulo à ativação das HSCs, além disso, também promovem supra-regulação do TGF- β e da TIMP-1⁹¹. As HSCs expressam receptores de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), cuja ativação leva a formação de EROS e indução da via da quinase de proteína mitogênica ativada e da via do NF κ B⁹². Adicionalmente, derivados dos gliceraldeídos e outros AGEs induzem genes relacionados com inflamação e fibrogênese, e expressão de proteínas como o TGF- β e MCP-1 em culturas de HSCs^{92 93}.

1.3.4.2 Adiposidade - Inflamação e adipocitocinas

A fibrogênese está intrinsecamente dependente de inflamação. Como descrito previamente, o tecido adiposo, além de liberar grandes quantidades de AGLs, também produz um padrão alterado de adipocitocinas. Além disso,

macrófagos ativados são recrutados para o tecido adiposo, amplificando a produção de citocinas e o estado inflamatório. A adiponectina tem propriedades anti-fibróticas específicas⁸⁹. As HSCs expressam receptores de adiponectina e ela inibe proliferação, migração e expressão de genes fibrogênicos⁹⁴. A leptina tem propriedades pró-fibróticas, induz a produção de TGF- β 1 e CTGF pelas KCs, além de estimular angiogênese e fazer com que as células endoteliais proliferem e produzam EROs⁸⁹.

1.3.4.3 Hipertensão - Sistema renina-angiotensina (SRA)

O SRA é um regulador da homeostase da pressão arterial. O angiotensinogênio é sintetizado pelos hepatócitos, transformado em angiotensina I (AT1) pela renina e após, clivado pela enzima conversora de angiotensina em angiotensina II, que se liga ao receptor de AT1 e induz vasoconstrição. O receptor de AT1 está presente nas HSCs e quando ativado, estimula a secreção de MEC, proliferação da HSC, liberação de citocinas e fatores de crescimento e inibe a degradação do colágeno, promovendo fibrose hepática⁹⁵. Além disso, a ativação do receptor de AT1 estimula a contração das HSCs, um evento que participa na hipertensão portal.

1.3.5 Resolução da fibrose

Embora o conceito de reversão da fibrose e cirrose hepática tenha sido primeiramente introduzido há aproximadamente 40 anos⁹⁶, o postulado da “irreversibilidade” tem sido realmente desafiado apenas recentemente, a partir de dados obtidos em modelos animais de fibrose e em estudos clínicos⁷³. Modelos animais experimentais de fato mostram regressão da fibrose com a retirada do agente lesivo⁹⁷, o mesmo sendo demonstrado em humanos após tratamento bem sucedido do agente causal da lesão hepática subjacente^{65 98}.

A fibrogênese não é inevitável, mas dinâmica, com fases de deposição de matriz ou degradação da mesma, levando à progressão ou regressão da doença, respectivamente⁷². Os modelos experimentais também possibilitaram definir situações onde a reversibilidade da fibrose hepática é menos provável^{99 100}: nos septos fibrosos com maiores quantidades do componente elastina na MEC, nas cicatrizes com reticulação do colágeno (pela ação da lisil oxidase e transglutaminase tecidual) e nas cicatrizes espessas e maduras [pela ação da “A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type repeats metalloproteinase with thrombospondin type I motif” (ADAMST2)], que se tornariam progressivamente insolúveis e resistentes à digestão por proteases. Além disto, cicatrizes relativamente paucicelulares (contendo menos MFs ativos e macrófagos) podem apresentar menor reversibilidade devido à redução de liberação de enzimas que degradam matriz na área.

1.3.5.1 Metaloproteinases de matriz (MMPs)

No fígado saudável, a homeostase da MEC é caracterizada por um remodelamento (“turnover”) permanente regulado precisamente pelas MMPs e suas inibidoras específicas, as TIMPs⁷². As MMPs constituem uma grande família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes que são responsáveis pela degradação de proteínas da MEC¹⁰¹. São desta forma enzimas proteolíticas que, embora exibam um amplo espectro de substrato, são divididas de acordo com seus principais substratos em: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, metaloelastase, MMPs tipo membrana e outras^{72 102}. Assim como outras proteases, são produzidas como formas inativas, zimogênios, sendo ativadas após liberação das células. A estrutura básica de uma MMP consiste de um domínio catalítico contendo zinco. Na forma inativa, o sítio catalítico contido neste domínio fica inacessível devido à sua cobertura por um pró-peptídeo, que previne sua interação com o substrato. Durante a ativação este pró-peptídeo é clivado, e o sítio catalítico fica acessível ao substrato. Essa estrutura modular permite que as MMPs especificamente interajam com seus inibidores, as TIMPs. Estas últimas se ligam às MMPs pelo reconhecimento de dois diferentes locais: um localizado nos domínios tipo-emopexina e o outro no sítio catalítico. Um grupo especial de MMPs são as ligadas à membrana (MT-MMPs), que possuem uma sequência transmembrana adicional e uma cauda C-terminal intracitoplasmática.

Neste controle do remodelamento constante da MEC, as MMPs são reguladas em vários níveis: são secretadas como pró-enzimas inativas, apresentam controle transcripcional complexo e, são moduladas pelas TIMPs⁶¹.

Quatro TIMPs foram identificadas até o momento, TIMP-1, TIMP-2,

TIMP-3 e TIMP-4, e todas as MMPs conhecidas podem ser inibidas por pelo menos uma delas¹⁰². As mais avaliadas no processo de fibrose hepática são a TIMP-1 principalmente, e a TIMP-2. A TIMP-1 apresenta um papel importante na fibrose hepática, pois além de inibir a degradação da matriz pelas MMPs, também tem um efeito anti-apoptótico nas HSCs, prevenindo a depuração das HSCs ativadas durante a lesão e promovendo a sua sobrevivência por indução da “B cell lymphoma 2” (Bcl-2)¹⁰³. O papel das TIMPs é, de fato, de regular as MMPs, tanto na atividade como na localização espacial, assegurando o término da atividade de protease¹⁰¹. As concentrações de TIMPs e a razão MMPs/ TIMPs são críticas na determinação da real atividade de protease: baixas concentrações de TIMP ou alta razão MMPs/ TIMPs permitem a ativação das MMPs, enquanto altas concentrações de TIMPs levam à inibição da ativação das MMPs. Diversos estudos demonstraram variação na expressão destas enzimas ao longo da deposição e degradação dos componentes da MEC.

1.3.5.2 MMPs e progressão da fibrose

Nas fases precoces da lesão hepática, as HSCs expressam de maneira transiente MMP-3, MMP-13 e ativador de uroplasminogênio (uPA), exibindo um fenótipo de degradação de matriz. Nos estádios mais avançados da lesão hepática, entretanto, o padrão muda, e as células expressam uma combinação de MMPs com habilidade de degradação da matriz normal, enquanto inibem a degradação do colágeno fibrilar que acumula na fibrose hepática. Este padrão é caracterizado pela combinação da expressão de pró-MMP-2 e MT1-MMP, que aciona a geração peri-celular de MMP-2 ativada e a degradação local da

matriz hepática normal. Além disso, existe um aumento acentuado na expressão de TIMP-1, levando a uma inibição global da degradação do colágeno fibrilar pelas collagenases intersticiais (MMP-1/ MMP-13)¹⁰¹. Apenas uma collagenase intersticial em roedor foi identificada até o momento, a MMP-13, que compartilha o maior grau de homologia com a collagenase-3 humana (MMP-1)¹⁰⁴. Estas vias têm um papel significativo na progressão da fibrose hepática¹⁰¹.

1.3.5.3 MMPs e fibrólise

A apoptose da HSC ativada somente não é suficiente para a resolução adequada da fibrose, sendo necessária também a degradação da matriz pela ação das MMPs. Durante a recuperação da fibrose hepática, a atividade de collagenase atinge um máximo no segundo dia após a descontinuação do agente nocivo, e diminui para níveis normais dentro de 7 dias⁷². As MMPs 1, 2, 8, 13 e 14 são as únicas MMPs capazes de degradar colágenos nativos (tipos I, II, III e X) e podem ter um papel chave na degradação da MEC. Aqui, a clivagem inicial do colágeno tipo I parece ser crucial para a regressão global da fibrose hepática¹⁰⁵. A TIMP-1, em particular, é rapidamente infra-regulada, com aumento da atividade de collagenase, degradação da matriz e regressão da fibrose hepática. A figura 4 mostra um sumário esquemático temporal da expressão das MMPs e TIMPs na recuperação da fibrose hepática.

Figura 4.

Expressão temporal das metaloproteinases de matriz e suas inibidoras teciduais na recuperação da fibrose hepática.

(Adaptado de Roderfeld M, et al⁷²). Somente estudos animais apresentando curso ao longo do tempo para expressão de ácido ribonucléico (RNA) de metaloproteinase de matriz (MMP), metaloproteinase de matriz ativada (MMPa) ou inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) ou expressão de proteínas foram levados em consideração. Após a retirada do estímulo nocivo existe diminuição da expressão relativa da TIMP-1, com aumento da MMP-13a e MMP-9a.

1.4 Óxido nítrico (NO)

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio hidrofóbica, difusível livremente, com uma meia vida de segundos²⁶. O NO atua como uma importante molécula sinalizadora biológica oxidativa em diversos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação imune¹⁰⁶.

1.4.1 Isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) e expressão no fígado

O NO é criado via óxido nítrico sintase (NOS), pela metabolização de arginina em citrulina. A NOS está presente em três formas: neuronal (nNOS),

endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), sendo todas elas encontradas no fígado. A eNOS é constitutiva, e produz relativamente pequenas quantidades de NO, associado à manutenção da perfusão sinusoidal hepática. Já a iNOS, também conhecida como isoforma inflamatória da NOS, é induzível. Diferentemente da eNOS que é dependente de cálcio, produz relativamente pequenos níveis de NO e tem uma constante de tempo muito rápida para ativação e inativação (segundos), a iNOS é cálcio independente, produz quantidades muito maiores de NO e tem atividade plena até que a proteína seja degradada. A iNOS no fígado pode ser induzida por estresse e inflamação, e as conseqüências dos altos níveis de produção de NO nos hepatócitos depende de uma série de fatores, sendo os mais importantes a quantidade e duração da exposição ao NO. Baixos níveis de NO são citoprotetores, enquanto altos níveis podem levar à citotoxicidade¹⁰⁷.

1.4.2 Interação molecular

O NO interage com múltiplos alvos moleculares, incluindo tióis, metais de transição (como o ferro), oxigênio e outros radicais livres. Ele se liga rapidamente ao heme, afetando desta forma a ativação ou inibição de várias proteínas. Especificamente, o NO ativa a guanilato ciclase, resultando em aumento da síntese de GMP cíclico. A interação do NO com oxigênio resulta em outra espécie reativa de nitrogênio, o trióxido de nitrogênio (N₂O₃), que pode nitrosar aminas produzindo N-nitrosaminas ou pode nitrosar cisteínas em várias proteínas para formar S-nitrosotióis, que podem transportar e armazenar NO. O NO também pode reagir com o radical superóxido, criando peroxinitrito

(ONOO-), um potente oxidante, que dependendo da quantidade e duração, pode ter efeitos benéficos (antimicrobiano) ou danosos (dano celular e, ou também, morte) na célula²⁶.

Para ajudar a compreender as propriedades do NO no contexto da biologia, foi desenvolvido o conceito da biologia química do NO¹⁰⁸. Essas reações podem ser divididas em duas categorias distintas, envolvendo os efeitos diretos e indiretos de NO. Os efeitos diretos são aquelas reações onde o NO reage diretamente com o alvo biológico (metais ou outros radicais, por exemplo). Já os efeitos indiretos são aqueles onde o NO reage primeiro com o oxigênio ou superóxido para formar espécies redox, que então levam a alterações de macromoléculas. Os efeitos indiretos podem ainda ser separados em reações que levam a modificações oxidativas ou nitrosativas¹⁰⁹. Os efeitos diretos requerem consideravelmente menos NO do que os efeitos indiretos, sugerindo que sob condições fisiológicas normais, os efeitos diretos são predominantes. Por outro lado, durante condições de inflamação onde a iNOS é supra-regulada, existe a possibilidade de que os efeitos indiretos tornem-se mais importantes. Deve ser salientado que por meio de seus efeitos diretos, o NO fornece poderosos efeitos antioxidantes em resposta ao estresse causado por EROS. Assim, o NO serve também como um contrapeso (compensação) para as EROS e contribui para o espectro de reações redox¹⁰⁹, conforme mostrado na figura 5.

Figura 5. A compensação do óxido nítrico (NO) para as espécies reativas de oxigênio (EROS). (Adaptado de Mancardi D, et al¹⁰⁹). Os efeitos do NO podem ser divididos em diretos e indiretos. Os efeitos diretos englobam reações onde o NO reage diretamente com o alvo biológico (metais ou outros radicais), sendo sugerido ser este o efeito predominante em condições fisiológicas normais (efeito antioxidante). Já os efeitos indiretos são aqueles onde o NO reage primeiro com o oxigênio ou superóxido para formar espécies redox, que então levam a alterações de macromoléculas (química oxidativa). Abreviaturas: NO: óxido nítrico; NO_2 : dióxido de nitrogênio; O_2^- : radical superóxido; O_2 : oxigênio; N_2O_3 : trióxido de nitrogênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; NO_2^- : nitrito; $ONOO^-$: peroxinitrito.

1.4.3 NO e apoptose

Foi demonstrado que o NO é capaz de inibir caspases via S-nitrosilação e, desta forma, inibir a apoptose¹¹⁰. Isto parece ser pelo menos em parte dependente da concentração. As baixas concentrações fisiológicas do NO podem inibir a apoptose. Em contraste, as concentrações mais elevadas podem levar à formação de produtos tóxicos, como o $ONOO^-$ ou outras EROs que levam à necrose celular e apoptose¹¹¹.

1.4.4 Efeito antioxidante e no metabolismo lipídico

Na sinalização celular os efeitos do NO são mediados pelos sítios redox-sensíveis, e incluem: inibição da proteína quinase C, ativação da tirosina quinase, inativação do NF- κ B e ativação das proteínas G¹¹². O NO age como potente inibidor da peroxidação lipídica por meio da remoção de radicais peroxil e inibe as enzimas peroxidases, potenciais iniciadoras da peroxidação lipídica¹¹³. Contudo, como foi descrito previamente, na presença do radical superóxido, o NO forma o superóxido, capaz de iniciar a peroxidação lipídica. Assim, o balanço de NO e o radical pode ter implicações importantes inclusive na progressão da DHGNA¹¹⁴. Além disso, o NO também regula a agregação de neutrófilos¹¹⁵, a adesão plaquetária¹¹⁶, a citotoxicidade de macrófagos¹¹⁷ e pode ser um novo mediador fisiológico para o controle da gordura corporal¹¹⁸ e do metabolismo lipídico hepático¹¹⁹. Foi demonstrado também que o NO está envolvido na lipólise induzida por leptina em adipócitos brancos obtidos de ratos, um conhecido modulador da gordura corpórea. Este estudo expõe a possibilidade de que o NO possa atuar como um importante regulador fisiológico autócrino, facilitando a lipólise induzida por leptina¹²⁰.

1.4.5 NO e fibrose

O papel do NO na formação de fibrose não é tão claramente compreendido¹²¹. Estudos animais experimentais mostram diminuição da função da eNOS na cirrose^{122 123}, com diminuição da biodisponibilidade de NO, que também pôde ser atribuída às EROS e estresse oxidativo¹²⁴. Esta diminuição do NO poderia levar à falta de inibição do estresse oxidativo e

potencial fibrogênese assim como, pelo estado relativo de vasoconstrição que proporciona, poderia prejudicar o fluxo sanguíneo hepático e também promover lesão hepática e fibrose. A deficiência de iNOS em camundongos com fibrose hepática induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) teve um efeito protetor na fibrose, decorrente da falta de formação de peroxinitrito e aumento da apoptose¹²⁵. Desta maneira é possível resgatar dos estudos experimentais que a progressão da fibrose hepática resulta de uma mudança na expressão tanto da iNOS como da eNOS. O aumento da expressão de iNOS gera estresse oxidativo e um estado pró-inflamatório enquanto a expressão reduzida de eNOS afeta a microcirculação hepática^{123 126}.

Em pacientes com cirrose hepática, a biodisponibilidade diminuída do NO tem sido associada ao aumento da resistência ao fluxo sanguíneo portal. Estudo que avaliou a capacidade antioxidante e nível sérico de NO em cirróticos evidenciou diminuição da atividade da superóxido dismutase no grupo com cirrose descompensada, sendo sugerido pelos autores que distúrbios nos mecanismos antioxidantes podem diminuir a resistência hepática ao estresse oxidativo e, desta forma, contribuir para o desenvolvimento da fibrogênese¹²⁷.

1.4.6 S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)

Desde a descoberta que as células dos mamíferos produzem NO como um mensageiro intracelular de vida curta, e sua identificação como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), o interesse nas funções fisiológicas do NO expandiu muito rapidamente. Devido ao fato do ambiente plasmático e celular conter espécies reativas que podem rapidamente inativar o NO livre, em

contraste com a relativa meia vida longa do EDRF, tem sido considerado que o NO seja estabilizado por uma molécula carreadora que prolonga a sua meia vida e preserva sua atividade biológica¹²⁸. Os S-Nitrosotióis (RSNOs) são os melhores candidatos para o armazenamento endógeno e transporte de NO¹²⁸. O NO covalentemente ligado ao átomo de enxofre nos RSNOs resiste à inativação oxidativa pela oxi-hemoglobina e tem as mesmas propriedades fisiológicas do NO livre, incluindo a sua ação protetora no estresse oxidativo¹²⁹. Alguns destes compostos como a S-nitrosoalbumina (BSNO), S-nitroso-L-cisteína (CySNO) e S-nitrosoglutathione (GSNO) ocorrem naturalmente “in vivo”, já outros como a S-nitroso-N-penicilamina (SNAP) e S-nitrosocaptopril, têm sido sintetizados. Os RSNOs são considerados potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de patologias nas quais o NO pode estar envolvido¹³⁰.

O S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) está entre os RSNOs que podem ser sintetizados, pela S-nitrosação do tiol livre correspondente (no caso a N-acetilcisteína)¹³¹, apresentando-se relativamente estável e com propriedade vasodilatadora potente¹³². O RSNO passa por decomposição térmica em solução, gerando NO livre e um dissulfeto de acordo com a seguinte reação:

Comparados com os tióis livres, os RSNOs podem ser terminadores mais poderosos das reações de propagação em cadeia de radicais pela reação diretamente com radicais ROO $\cdot$, gerando derivados de nitrogênio (ROONO) como produtos finais, assim como dímeros RS-SR^{133 134}. Levando em consideração as propriedades do SNAC, os efeitos do NO como inibidor

potente da reação em cascata da peroxidação lipídica¹¹³ e o papel do estresse oxidativo na DHGNA, este composto foi avaliado como agente terapêutico neste contexto. O SNAC foi avaliado em modelo experimental de DHGNA induzido por dieta deficiente em colina em ratos Wistar¹³³. A quantificação das concentrações plasmáticas da veia porta dos animais mostrou maiores concentrações de nitrato após a administração de SNAC via oral do que peritoneal, sendo a via oral utilizada como protocolo para atingir maior absorção da medicação. Neste estudo foi constatado que a administração de SNAC via oral na dose de 1,4 mg/Kg/dia preveniu o desenvolvimento de esteatose hepática, efeito não observado com a N-acetilcisteína (NAC), e o grupo tratado com SNAC mostrou redução de marcadores de peroxidação lipídica. Estudo subsequente avaliou o papel do SNAC em camundongos ob/ob submetidos a dois modelos experimentais distintos de EHNA [dieta deficiente em colina e metionina (DCM) e dieta hiperlipídica]¹³⁵. O tratamento com SNAC resultou em prevenção e reversão da EHNA nestes modelos experimentais. Em trabalhos adicionais experimentais de EHNA, foi possível identificar a modulação de diversos genes relacionados ao metabolismo lipídico e a atividade mitocondrial pelo SNAC¹³⁶, assim como a modulação da MTP¹³⁷.

2. Objetivos

1. Avaliar o efeito anti-fibrogênico do doador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) em ratos Spraguey-Dawley, induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina associada à Dietilnitrosamina.
2. Avaliar a expressão de mRNA dos genes relacionados à fibrose [metaloproteinase de matriz (MMP)-2 , MMP-9, MMP-13, inibidor tecidual da metaloproteinase (TIMP)-1 e 2, TGF β -1 e Colágeno 1 α] e estresse oxidativo [proteína de choque térmico (HSP)-60 e 90] neste modelo experimental de EHNA.

3. Métodos

3.1 Local

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 Animais

Esse estudo seguiu as orientações recomendadas da Declaração de Helsinki de 1975 [publicada por "US National Institute of Health-Guide for care and use of laboratory animals" (NIH Publication, n° 85-23, revisada em 1996)] e do Serviço de Experimentação em animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP, sob protocolo de pesquisa n° 0737/08.

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, machos, provenientes do Biotério Central da FMUSP. Os animais foram mantidos em local com temperatura, umidade e ventilação controlada, com ciclos de luz/ escuro de 12 horas.

3.3 Procedimentos experimentais e delineamento do estudo

Esteato-hepatite não alcoólica com fibrose foi induzida pela combinação de dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHC) [35% de gordura total, enriquecida com 54% de ácidos graxos *trans* (Rhoster Ltda, Brasil)] e dietilnitrosamina (DEN) (Sigma Chemical, IUPAC *nitrosodiethylamine*, Missouri, EUA) na dose de 135 mg/ L na água de beber conforme descrito previamente¹³⁸, por 8 semanas. Os animais foram aleatorizados e divididos em três grupos: EHNA (n=10), SNAC (n=10) e Controle (n=3). Animais do grupo EHNA e SNAC receberam a dieta descrita acima e DEN. Animais do grupo SNAC receberam desde o início SNAC 1000 μ mol diariamente por gavagem (8 μ mol/ kg = 1,4 mg/ kg) enquanto os animais do grupo EHNA receberam veículo (solução de Ringer) também por gavagem. Animais do grupo Controle foram alimentados com dieta padrão (Nuvilab[®] Nutrientes Ltda, Colombo, Brasil) *ad libitum*, e também receberam veículo por gavagem. Após período de 8 semanas os animais foram anestesiados utilizando-se cloridrato de Ketamina (0,1mL/ Kg) intraperitoneal e sacrificados. Espécimes de fígado foram obtidos para análise histopatológica (estadiamento e quantificação do colágeno) e de expressão gênica.

3.4 Síntese do S-nitrosotiol SNAC

O SNAC foi sintetizado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por reações de S-nitrosação dos resíduos de cisteína dos peptídios precursores [N-acetil-L-cisteína (Sigma Chemical, St.

Louis, MO)], com ácido nitroso de acordo com procedimentos já descritos anteriormente^{128 132}. Soluções armazenadas de SNAC foram ainda diluídas em solução fisiológica basal para $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (pH 7,4) antes da administração.

3.5 Análise histológica: estadiamento

Fragmentos de tecido hepático previamente fixado em solução de formol a 4% foram processados e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson e Picrossírius. As amostras de fígado foram avaliadas de maneira cega por um patologista hepático experiente utilizando um sistema modificado da classificação padronizada por Kleiner e colaboradores (2005)¹³⁹, conforme demonstrado no quadro 1. As variáveis histológicas estudadas foram esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4). A avaliação da presença de reação ductular (0=ausente; 1=leve; 2=moderada e 3=acentuada) também foi incluída na análise.

Quadro 1. Classificação histológica.

Grau de Esteatose		Inflamação lobular		Balonização hepatocelular		Reação ductular		Escore de fibrose	
Grau	Descrição	Grau	Descrição	Grau	Descrição	Grau	Descrição	Estádio	Descrição
0	<5%	0	Ausente	0	Ausente	0	Ausente	0	Ausente
1	5-33%	1	<2 focos / 20X campos óptico	1	Leve; pouca	1	Leve; pouca	1	Fibrose perissinusoidal
2	34-66%	2	2-4 focos/20x campo óptico	2	Moderada / Acentuada	2	Moderada	2	Fibrose perissinusoidal (com ou sem fibrose portal), com septos
3	>66%	3	>4 focos/20x campo óptico	-	-	3	Acentuada	3	Transformação nodular (esboço de nódulo)
-	-	-	-	-	-	-	-	4	Cirrose

Modificado de Kleiner e colaboradores¹³⁹.

3.6 Análise histológica: quantificação de colágeno

A quantificação do colágeno foi realizada por um patologista hepático experiente a partir de cortes histológicos corados por Picrossirius e analisados sob microscopia de luz (Nikon E-800), de maneira cega. Resumidamente, foram selecionados 10 campos histológicos por animal em aumento de 100x (área total de 3.031.614 μm^2). As áreas de fibras colágenas coradas em vermelho pelo Picrossirius foram identificadas visualmente (figura 6) e marcadas de verde (figura 7). A seguir, estas áreas de fibras colágenas marcadas foram quantificadas (figura 8) com o programa Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc, EUA), como descrito previamente¹⁴⁰. Os resultados foram expressos como percentagem de área ocupada por colágeno em relação ao campo total. Esta porcentagem é equivalente à proporção volumétrica de colágeno presente no fígado¹⁴¹. Como houve uma distribuição heterogênea de deposição de colágeno nas amostras, com diferentes padrões de danos, esta marcação e posterior quantificação do colágeno foi realizada nas áreas de maior deposição do mesmo. Este critério de seleção foi utilizado em todos os animais analisados. Locais de deposição fisiológica de colágeno, como ao redor dos grandes vasos no espaço porta e regiões de cápsula hepática e subcapsulares foram excluídas desta análise.

Figura 6. Seleção das áreas de fibrose no tecido hepático. Na coloração de Picrosirius em aumento de 100x foram selecionadas áreas de fibrose (fibras colágenas coradas em vermelho).

Figura 7. Detecção colorimétrica das fibras colágenas coradas em vermelho. Nesta fase, as fibras foram identificadas visualmente e marcadas em verde. Esta seleção foi realizada manualmente e individualmente para cada imagem capturada, pois os tons da coloração podem variar de uma lâmina para outra.

Figura 8.

Quantificação do colágeno marcado.

Após identificação das fibras colágenas marcadas em verde, o programa mensurou a área ocupada pelas fibras colágenas, a qual foi somada aos demais campos selecionados de cada animal, obtendo uma somatória de valores. Após isso, a porcentagem ocupada pelo colágeno foi calculada em relação ao campo total observado (3.031.614,00 μm^2).

3.7 Expressão Gênica

3.7.1 Extração do RNA Tecidual

O material recebido em nitrogênio líquido foi fragmentado em pulverizador de tecidos (Mikro-Dismembrenator II B. Braun. Melsugen, RFA). Após a pulverização, foi adicionado 1,0 mL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e essa mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. À solução, foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Merck), e a mesma foi agitada vigorosamente por 15 s, seguido de incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugada durante 15 min, 12.000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5417-R, Hamburg, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e o RNA foi precipitado com

500 µL de isopropanol (Merck). A mistura foi deixada em repouso durante 10 min e centrifugada por 15 min, 12.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o botão de RNA lavado com 1,0 mL de etanol (Merck) 70%, centrifugado novamente e ressuspenso em um volume apropriado de água estéril [UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)].

3.7.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total

A concentração dos RNAs totais extraídos foi determinada por espectrofotometria [NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)]. A preparação do RNA foi considerada livre de proteínas quando a relação $A_{260/280}$ encontrava-se entre 1,8 e 2,0 (Tabela 1). Para as amostras que não atingiram estes valores, foram realizadas purificações utilizando-se o *kit* RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A integridade e a pureza dos RNAs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Somente foram utilizadas as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18 e 28 S mostraram-se íntegras à análise sob luz ultravioleta (Figura 9). Os RNAs foram mantidos a -80 °C até sua utilização.

Tabela 1. Identificação, concentração, absorbância e relação $A_{260/280}$ dos RNAs totais extraídos de amostras do tecido hepático de alguns animais.

Amostra	ng/ uL	A260	A280	260/ 280	Cursor abs.
Grupo SNAC 1000μmol					
62	813	20,325	10,794	1,88	37,483
63	1010,11	25,253	13,348	1,89	44,813
64	919,5	22,987	12,252	1,88	46,232
65	1357,27	33,932	17,585	1,93	47,993
66	810,6	20,265	10,742	1,89	35,105
67	1063,26	26,582	14,098	1,89	56,272
68	997,54	24,939	13,256	1,88	48,923
69	986	24,65	13,157	1,87	46,093
70	448,53	11,213	6,006	1,87	13,643
71	715,02	17,876	9,334	1,92	21,839
Grupo EHNA					
72	380,44	9,511	5,114	1,86	11,023
73	1344,63	33,616	17,369	1,94	38,131
74	907,95	22,699	11,476	1,98	14,847
75	929,42	23,236	12,14	1,91	29,24
76	575,82	14,396	7,313	1,97	11,534
77	351,79	8,795	4,545	1,94	11,871
78	1243,86	31,097	16,183	1,92	36,771
79	1204,02	30,1	15,429	1,95	32,343

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2%. Observa-se a integridade de alguns dos RNAs totais extraídos de amostras de tecido hepático com visualização das bandas 28 e 18 S. Amostras 1 a 3 correspondem ao grupo SNAC e 4 a 6 ao grupo EHNA.

3.7.3 Curva de eficiência de amplificação dos genes alvo e do controle Interno

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada gene alvo e controle interno, foram construídas curvas a partir de uma amostra referência de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) com diluições seriadas (seis concentrações de RNA em duplicata: 500, 100, 20, 4, 0,8 e 0,16 ng/ μ L).

A eficiência de amplificação dos genes HSP-60, HSP-90, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 foi calculada pela subtração entre os valores do limiar do ciclo dos genes alvos e do gene β -actina, e esse resultado foi plotado em um gráfico contra o logaritmo da quantidade de RNAm inicialmente colocada. Se a inclinação da reta, ou "slope" = y, é menor que 0,1 (positivo ou negativo), a eficiência de amplificação entre os genes é considerada similar. Pôde-se observar que as eficiências de amplificação dos genes alvo foram semelhantes à da β -actina. A Figura 10 demonstra a curva de dissociação para os genes HSP-60, HSP-90, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e β -actina. A presença de apenas um pico demonstra a especificidade da reação.

Figura 10. Curva de dissociação dos genes HSP-60, HSP-90, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e β -actina. A presença de apenas um pico demonstra a especificidade da reação.

3.7.4 Método de pré-amplificação gênica

O gene da MMP-13 apresentou uma baixa amplificação, impossibilitando a sua análise pelo PCR em tempo real. Sendo assim, foi necessário realizar uma pré-amplificação das amostras de cDNA para possibilitar a detecção de sua expressão gênica. Previamente, foi realizado um agrupamento com todos os ensaios (“assays”) dos genes MMP-13, MMP-2, colágeno tipo I, TGF β -1 e β -actina, diluídos em TE 1x (1:98 μ L). Em seguida, foram incubados 12,5 μ L do agrupamento dos ensaios com 12,5 de cDNA puro de cada amostra e 25 μ L do reagente de pré-amplificação (*TaqMan[®] PreAmp Master Mix Kit, Applied Biosystems, California, USA*). Posteriormente, as amostras foram incubadas

em termociclador para as reações de ativação enzimática (10 min, a 95 °C), desnaturação (15 seg, a 95 °C) e anelamento/ extensão (4 min, a 60 °C), durante 10 ciclos. Após a amplificação, as amostras de cDNA foram submetidas à quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.

3.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa Quantitativa Relativa (RT-qPCR)

Para os genes MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, HSP-60 e HSP-90 as reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Austrália), utilizando-se o conjunto de reagentes SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme recomendação do fabricante.

A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelo valor de limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do fragmento começa a ser detectada. A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada com a finalidade de evitar qualquer amplificação inespecífica. A temperatura de anelamento para a amplificação de todos os genes foi 60 °C. Todas as reações de RT-q PCR foram realizadas em duplicata para cada amostra de tecido hepático, tanto para o gene alvo quanto para o controle β -actina.

Os oligonucleotídeos para os genes do TIMP-1, TIMP-2, MMP-9, HSP-60, HSP-90 e β -actina foram desenhados no programa *Primer3 Input* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O gene da β -actina foi utilizado como controle

endógeno. As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados para cada um dos genes estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados dos genes TIMP-1, TIMP-2, MMP-9, HSP-60 e HSP-90.

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos	
HSP-60	Forward	AGC AAA GGG GCT AAT CCA GT
	Reverse	TGA CAC CCT TTC TTC CAA CC
HSP-90	Forward	GAT TGA CAT CAT CCC CAA CC
	Reverse	CTG CTC ATC ATC GTT GTG CT
TIMP-1	Forward	TCC CCA GAA ATC ATC GAG AC
	Reverse	TCA GAT TAT GCC AGG GAA CC
TIMP-2	Forward	GCA TCA CCC AGA AGA AGA GC
	Reverse	GGG TCC TCG ATG TCA AGA AA
MMP-9	Forward	CAA ACC CTG CGT ATT TCC AT
	Reverse	AGA GTA CTG CTT GCC CAG GA

Para os genes MMP-2, MMP-13, TGF β -1 e Colágeno 1 α (I) a análise por PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção *ABI Prism* 7000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) o qual contém uma câmera CCD acoplada que captura a fluorescência emitida e analisa os dados utilizando um programa de detecção. Para avaliação da expressão foram colocados em tubos apropriados ("Optical Tubes Applied Biosystems"), 5 μ L de cada cDNA pré-amplificado, tampão *TaqMan* 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 200 nM de dATP/ dCTP/ dGTP, 400 mM dUTP, 200 nM dos oligonucleotídeos iniciadores ("primers") senso e anti-senso, 100 nM das sondas ("probes") *TaqMan*, 0,01U/ mL de *AmpErase* e 0,025 U/ μ L da DNA polimerase *AmpliTaQ Gold* em um volume total de 25 μ L. Após a completa mistura dos reagentes, cada tubo foi fechado com tampas *MicroAmp Optical* (*Applied Biosystems*). Todas as reações foram corridas em duplicata. As condições de amplificação utilizadas para todos os genes foram: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C; seguidos de 50 ciclos a 90 °C por

15 seg para desnaturação da fita de cDNA e a 60 °C por 1 min para sua extensão. Todos esses oligonucleotídeos iniciadores foram adquiridos da empresa *Applied Biosystems* e seus respectivos identificadores estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Identificação dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes β -actina, Colágeno 1 α (I), TGF β -1, MMP-2 e MMP-13

Genes	Identificadores
Beta-actina	4331348
Colágeno 1 α (I)	Rn 00801649_g1
TGF β -1	Rn 00572010_m1
MMP-2	Rn 01538167_m1
MMP-13	Rn 01448191_g1

3.7.6 Método de Análise da expressão Gênica

Para análise das expressões dos genes MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, HSP-60 e HSP-90 o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001) foi utilizado¹⁴². Este modelo utiliza os valores de eficiência obtidos nas curvas de expressão gênica e a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}}(\text{referência-amostra})}}{(E_{\beta\text{-actina}})^{\Delta CP_{\beta\text{-actina}}(\text{referência-amostra})}}$$

O valor do ponto de cruzamento (CP – “cross point”) representa a fluorescência do limiar da amostra na fase exponencial de amplificação, assim como o limiar do ciclo. Nessa análise também é considerado um RNA

referência (RNAm de fígado de um animal Sprague-Dawley submetido a dieta padrão). Sendo que a razão (R) descreve a expressão relativa entre o gene alvo e o gene controle (β -actina). A eficiência de amplificação (E) da reação, tanto do gene alvo como da β -actina é dada pela curva com diluições seriadas, conforme descrito anteriormente. O Δ CP do gene alvo, é a diferença entre o valor de CP do RNA referência e o CP da amostra, e o Δ CP da β -actina é a diferença do CP referência e o CP amostra. Em seguida, é calculada a razão entre o Δ CP gene alvo e Δ CP da β -actina.

Para os genes MMP-2, MMP-13, TGF β -1 e Colágeno 1 α (I) a interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito pelo método comparativo de Livak e Schmittgen (2001)¹⁴³, no qual a expressão relativa dos genes corresponde a $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.8 Análises Estatísticas

Todos os dados foram expressos como média ou mediana (dependendo do padrão de distribuição das variáveis). Foram colocados valores Mínimos (Min), Máximos (Max) e de Desvio Padrão (DP). Para variáveis de distribuição Gaussiana foram utilizados teste-t, one-way ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls de múltiplas comparações. Para variáveis de distribuição não-Gaussiana foram utilizados os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e o pós-teste Dunn's de comparações múltiplas. Para comparação dos escores histológicos entre os grupos SNAC e ENA, foram utilizados os testes de Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos

os cálculos e gráficos foram realizados com o software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism V5.0 (GraphPad Software Inc).

4. Resultados

4.1 Ingestão de dieta e ganho de peso

Os animais do grupo EHNA apresentaram menor mediana de ingestão diária da dieta em comparação com grupo SNAC ($10,83 \text{ g} \pm 0,56$ vs $11,99 \text{ g} \pm 1,27$; $p=0,002$), como mostrado na figura 11. Não houve diferença no ganho de peso entre estes dois grupos ($p= 0,393$). A mediana de ingestão alimentar diária do grupo Controle foi de $28,21 \text{ g}$.

Figura 11. Mediana da ingestão diária de dieta nos animais do grupo SNAC e EHNA.

4.2 Macroscopia hepática

Na análise macroscópica do fígado, os animais do grupo EHNA apresentaram fígado com aspecto brilhante, mais claro, de volume aumentado, consistência endurecida e superfície nodular em comparação com os fígados dos animais do grupo Controle, de aspecto macroscópico normal. Os animais do grupo SNAC também apresentavam fígado com aspecto brilhante e mais claro. As figuras 12 a 14 ilustram o aspecto macroscópico de alguns ratos nos diferentes grupos.

Figura 12. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo Controle (RD93). Fígado de aspecto normal.

Figura 13. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo SNAC (RD66). Fígado de aspecto esteatótico.

Figura 14. Aspecto macroscópico hepático de animal do grupo EHNA (RD74). Fígado de aspecto esteatótico, superfície nodular.

4.3 Análise histológica: estadiamento

Em ambos os grupos (EHNA e SNAC) foi observado na maioria dos animais esteatose grau 3, inflamação lobular grau 3, balonização grau 2, e reação ductular grau 3. Também foram observadas muitas mitoses em hepatócitos e várias células de Kupffer xantomatosas agrupadas ou agregadas em sinusóides. Fibrose estágio 4 (cirrose) foi vista em 3 animais do grupo EHNA e em 1 animal do grupo SNAC. Os animais Controles apresentaram histologia hepática normal (Tabela 4). A figura 15 ilustra o aspecto macroscópico hepático de alguns animais associados aos respectivos achados microscópicos.

Tabela 4. Histologia hepática dos animais nos diferentes grupos.

	Ratos (RD)	Esteatose 0-3	Balonização 0-2	Inflamação 0-3	Reação ductular 0-3	Fibrose 0-4
EHNA	72	3	2	3	3	2
	73	3	2	3	3	2
	74	3	2	3	3	4
	75	3	2	3	3	4
	76	3	3	3	3	3
	77	3	2	2	2	3
	78	3	2	3	3	3
	79	3	2	3	3	4
	80	3	2	3	3	3
	81	3	2	3	3	2
SNAC	62	3	2	3	3	3
	63	3	2	3	3	4
	64	3	2	3	3	2
	65	3	2	3	3	3
	66	3	2	3	3	2
	67	2	2	3	3	2
	68	2	2	3	3	3
	69	3	2	3	3	3
	70	3	2	3	3	3
	71	3	2	3	3	3
Controles	92	0	0	0	0	0
	93	0	0	0	0	0
	94	0	0	0	0	0

Figura 15. Aspectos macroscópicos hepáticos representativos (A, C e E) e achados histológicos (B, D e F, x200 magnificação, corado com Picrosirius). **A e B:** Rato do grupo Controle com fígado normal; **C e D:** Rato do grupo SNAC apresentando fígado esteatótico, com avaliação histológica evidenciando esteatose, balonização e septo fibroso entre as veias centro-lobulares (fibrose estágio 2); **E e F:** Rato do grupo EHNA com fígado de aspecto esteatótico e nodular, com histologia mostrando esteatose, balonização e fibrose avançada (estádio 4 - cirrose).

4.4 Análise histológica: quantificação do colágeno

Na morfometria do colágeno, a porcentagem média de área ocupada por colágeno em relação ao campo total no grupo Controle foi de 0,3624 (Min: 0,317; Max: 0,449; DP: 0,0752), no grupo SNAC foi 1,741 (Min: 1,261; Max: 2,108; DP: 0,279) e no grupo EHNA foi 2,654 (Min: 2,244; Max: 3,118; DP: 0,341). A diferença na quantificação do colágeno foi altamente significativa entre os grupos (ANOVA $p < 0,0001$), sendo que os animais que receberam SNAC apresentaram redução de 34,4% na proporção volumétrica ocupada pelo colágeno em relação aos animais do grupo EHNA, conforme mostrado na figura 16.

Figura 16. Quantificação do colágeno nos animais Controle, SNAC e EHNA.

4.5 Expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo

O gene HSP-60 mostrou-se significativamente menos expresso nos animais do grupo SNAC (mediana: 0,782; Min: 0,751; Máx: 0,812; DP: 0,019) em comparação com grupo EHNA (mediana: 0,982; Min: 0,959; Máx: 1,042 DP:

0,024), $p < 0,0001$. Entretanto, não houve diferença entre ambos os grupos na expressão da HSP-90 ($1,008 \pm 0,03$ vs $0,996 \pm 0,02$; $p = 0,326$). A figura 17 mostra a expressão gênica da HSP-60 e 90 nos grupos SNAC e EHNA.

Figura 17. Expressão de RNAm dos genes HSP-60 e HSP-90 nos animais do grupo SNAC e EHNA.

4.6 Expressão de genes envolvidos na fibrogênese

A expressão mediana da MMP-13 foi significativamente maior nos animais tratados com SNAC em comparação com animais do grupo EHNA ($1,699$; Min: $1,150$; Máx: $2,822$; DP: $0,49$ vs $0,982$; Min: $0,715$; Máx: $1,298$; DP: $0,19$, respectivamente; $p = 0.0005$), assim como também ocorreu para a MMP-9 ($1,897$; Min: $1,156$; Máx: $2,236$; DP: $0,3$ vs $0,8120$; Min: $0,519$; Máx: $1,051$; DP: $0,12$, respectivamente; $p < 0,0001$). Além disso, a expressão da TIMP-2 foi menor nos animais SNAC do que nos animais EHNA ($0,679 \pm 0,11$ vs $1,040 \pm 0,86$; $p < 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos com relação à expressão de TIMP-1 e MMP-2 ($p = 0,842$ e $p = 0,123$, respectivamente). Na avaliação da expressão gênica de TGF β -1, foi constatada uma expressão acentuadamente menor no grupo SNAC quando comparada com o grupo

EHNA ($0,613 \pm 0,14$ vs $0,915 \pm 0,41$; $p=0,0089$), o mesmo sendo observado com relação à expressão de colágeno 1α ($0,591 \pm 0,21$ vs $0,934 \pm 0,35$; $p=0,0207$). As figuras 18 e 19 ilustram a expressão destes genes relacionados à fibrogênese nos grupos SNAC e EHNA.

Figura 18. Expressão de RNAm dos genes MMP-2, MMP-9 e MMP-13 nos animais do grupo SNAC e EHNA.

Figura 19. Expressão de RNAm dos genes TIMP-1, TIMP-2, TGFβ-1 e colágeno 1α nos animais do grupo SNAC e EHNA.

5. Discussão

Neste modelo experimental de EHNA com fibrose induzido pela combinação de dieta hiperlipídica deficiente em colina associada à dietilnitrosamina por período de 8 semanas, em ratos Sprague-Dawley, a utilização do doador de óxido nítrico SNAC foi capaz de atenuar a fibrose hepática nos animais tratados.

O racional para o uso deste doador de NO se baseou nos potenciais benefícios sobre o estresse oxidativo, que junto com a geração de produtos bioativos de peroxidação lipídica, são considerados anormalidades centrais responsáveis pelo dano hepático e progressão de doença na EHNA^{28 31}.

Um aspecto interessante que pôde ser notado neste trabalho foi que a ingestão de dieta dos animais do grupo EHNA foi menor do que do grupo SNAC ($p=0.0002$). Uma das possíveis explicações para este achado seria a pior condição de saúde desenvolvida pelos animais do grupo EHNA ao longo do estudo, conforme constatado na quantificação do colágeno, onde grande parte dos animais tinha uma fibrose mais avançada que os do grupo SNAC. Os animais do grupo EHNA apresentaram uma porcentagem média de área ocupada por colágeno maior do que os animais do grupo SNAC, apesar da ingestão de dieta hiperlipídica deficiente em colina ter sido menor (dieta indutora de EHNA). Desta maneira, enfatiza-se a influência positiva da própria droga (SNAC) nos animais sob este modelo.

Com relação à análise histológica da fibrose hepática, algumas diferenças nos métodos empregados neste estudo (estadiamento e quantificação do colágeno) devem ser levadas em consideração. O

estadiamento histológico da fibrose, mesmo quando realizado por um patologista experiente, considera apenas o padrão de distribuição do colágeno no parênquima, mas não a quantidade de tecido fibroso. Embora não tenham sido encontradas diferenças na análise semiquantitativa dos estadiamentos da fibrose entre os grupos EHNA e SNAC ($p=0,582$), houve uma percepção visual clara da distinção entre eles no volume ocupado pelo colágeno no tecido hepático. Esta percepção foi confirmada com a morfometria das fibras colágenas coradas com Picrossirius. Esta técnica empregada, de fato, mostrou os efeitos benéficos do SNAC na fibrogênese, visto que nos animais que receberam a droga constatou-se redução de 34,4% do volume relativo ocupado pelo colágeno no fígado em comparação com os animais do grupo EHNA, uma diferença significativa ($p<0,0001$).

Métodos acurados como a morfometria do colágeno empregada neste trabalho têm sido recomendados na literatura sempre que a mensuração do efeito anti-fibrogênico de uma intervenção específica estiver em questão¹⁴⁴. O Picrossirius tem afinidade para a maioria dos colágenos hepáticos, incluindo os formadores de fibrila (tipos I e III)¹⁴⁵, então a avaliação quantitativa da fibrose pode ser realizada utilizando-se esta técnica de coloração, que mostrou-se confiável e reprodutível^{146 147}. Além disso, James e colaboradores (1990) demonstraram em ratos que a quantificação do colágeno corado com Picrossirius apresentou correlação altamente significativa com o conteúdo de hidroxiprolina obtido de homogenatos de fígado¹⁴⁸.

Por outro lado, a fibrose hepática é vista no momento como um processo dinâmico, que pode progredir ou regredir ao longo do tempo. Este conceito traz consigo a importância de se avaliar objetivamente a quantidade de fibrose

hepática, além do estadiamento da doença, que está relacionado tanto com fibrose como com mudanças arquiteturais no fígado. Recentemente, com o progresso no tratamento das doenças hepáticas, a exemplo das hepatites crônicas virais, alguns autores têm chamado atenção para a necessidade de uma subclassificação da cirrose hepática, ao invés de considerá-la um estágio único final da doença fibrótica hepática avançada¹⁴⁹. Trabalhos recentes mostram que a espessura do septo fibroso se correlaciona com o gradiente de pressão venosa hepática (HVPG) e esta espessura é uma preditora independente tanto de hipertensão portal significativa (HVPG > 10mmHg)¹⁵⁰ como de descompensação clínica^{151 152}. Desta forma é possível concluir que cirrose hepática não significa um estágio único, mas um processo biológico de angiogênese e fibrogênese progressiva, com espessamento dos septos, até formação de cicatriz insolúvel. A reversibilidade da fibrose hepática é menos provável quando se tem septos fibrosos com maiores quantidades do componente elastina na MEC, nas cicatrizes com reticulação do colágeno, nas cicatrizes espessas e maduras e nas relativamente paucicelulares^{99 100}. Estes achados se traduzem na constatação clínica de que os pacientes com septos mais espessos (e provavelmente maior obstrução passiva ao fluxo portal e maior HVPG) e pacientes com nódulos cirróticos menores (indicativos de maior dano hepático e maior distorção arquitetural com aumento da resistência intra-hepática) apresentam piores desfechos clínicos¹⁵⁰. Assim, o SNAC reduzindo o tamanho do septo fibroso demonstrou ser efetivo na redução da fibrose neste modelo.

Os dados obtidos com a expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo e fibrogênese hepática nos grupos EHNA e SNAC ajudam a entender

os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do SNAC na fibrose. É conhecido que EROS e outros mediadores ativos têm sido associados com supra-regulação de genes pró-fibrogênicos críticos, como o pró-colágeno tipo I, TIMP-1 e a citocina inflamatória MCP-1⁷³. Na lesão hepática crônica e ativação das HSCs, ocorre supra-regulação da expressão de TIMP-1 levando à inibição da atividade das MMPs e subsequente acúmulo de proteínas de matriz no espaço extracelular¹⁰². Além disso, a TIMP-1 também tem um efeito anti-apoptótico nas HSCs, prevenindo a depuração das HSCs ativadas durante a lesão e promovendo a sua sobrevivência pela indução da Bcl-2, conforme demonstrado por Murphy e col (2002)¹⁰³.

No presente trabalho foi demonstrado que o SNAC não interferiu negativamente na regulação da TIMP-1 e em adição, promoveu diminuição da expressão de TIMP-2. Visto que trabalhos prévios também mostram reduções significativas nos níveis de TIMP-2 durante a resolução da fibrose^{153 154}, com um aumento associado da atividade de collagenase global devido à mudança no balanço MMP-TIMP, resultando em degradação da MEC^{97 154}, esta constatação de infra-regulação da TIMP-2 induzida pelo SNAC merece ser destacada. Wang e col (2000) também demonstraram em modelo de lesão hepática tóxica em camundongos que a TIMP-2 seria ativadora da MMP-2 ocasionando degradação patológica do colágeno (degradação da matriz hepática normal)¹⁵⁵, ou seja, relacionada à progressão da fibrose hepática. Desta maneira a diminuição da expressão de TIMP-2 também favoreceria a resolução da fibrose por não ativação da MMP-2. Os resultados deste trabalho estão de acordo com estes achados e compatíveis com a atenuação da fibrose no grupo SNAC. O SNAC não causou supra-regulação da expressão da MMP-

2 e, além disto, promoveu infra-regulação da TIMP-2, ou seja, um perfil anti-fibrogênico de expressão gênica.

Entretanto, um dos achados de expressão gênica mais relevante do efeito benéfico do SNAC na fibrose hepática foi a supra-regulação da MMP-13 no grupo tratado ($p=0,0005$). A MMP-13 em roedores, considerada a homóloga da MMP-1 humana, é capaz de degradar colágenos fibrilares (como o tipo I, o principal colágeno depositado na fibrose hepática) e pode ser responsável por eventos chave na degradação da MEC. Especialmente a clivagem inicial do colágeno tipo I parece ser crucial para a regressão global da fibrose hepática. Issa e col (2003) demonstraram que camundongos *r/r* com gene do colágeno I mutante (que confere resistência à degradação por collagenase) após 28 dias de recuperação de lesão hepática induzida por CCl_4 foram incapazes de resolver a fibrose hepática, com persistência de HSCs ativadas e regeneração hepatocitária diminuída¹⁵⁶. Estudos experimentais também mostram expressão acentuadamente elevada de MMP-13 durante as fases de recuperação da fibrose hepática¹⁵⁷. Estes dados apontam para a importância da degradação do colágeno tipo I na regressão da fibrose hepática^{105 156}, colágeno que é substrato da MMP-13.

Os animais do grupo SNAC também mostraram expressão aumentada da MMP-9 em comparação com o grupo EHNA. Em modelos animais de lesão hepática aguda e crônica têm sido relatados resultados variados com relação à expressão desta MMP¹⁰². A MMP-9 por si só não apresenta atividade contra o colágeno tipo I. No entanto, a sua participação indireta na resolução da fibrose tem sido sugerida, visto que a expressão de MMP-9 aumenta nitidamente no início da fibrólise^{72 158 159}. Um mecanismo proposto seria que esta MMP

contribuiria indiretamente na regressão da fibrose por acelerar a apoptose das HSCs^{160 161}.

O grupo tratado com SNAC também apresentou infra-regulação da expressão de TGF- β 1. O TGF- β 1 derivado tanto de fontes autócrinas como parácrinas permanece como uma citocina fibrogênica clássica¹⁶², sendo o estímulo mais potente para a produção do colágeno tipo I. As HSCs são a fonte mais importante de TGF- β 1 na fibrose hepática, porém as KC e plaquetas também secretam essa citocina. Células epiteliais totalmente diferenciadas não expressam TGF- β , porém interessante, trabalhos mostram que os hepatócitos parecem absorver e armazenar quantidades significativas de TGF- β latente no citoplasma e isto poderia ser ativado e ficar disponível durante a lesão, contribuindo para a iniciação da HSC e o processo de cicatrização hepática¹⁶³. Dooley e col (2008) também demonstraram que hepatócitos em cultura podem adquirir facilidade de produção autônoma desta citocina¹⁶⁴. A sinalização pelo TGF- β 1 converge para proteínas Smad, que fazem o ajuste fino e ressaltam os efeitos do TGF- β 1 durante a ativação das HSCs⁸⁵. As Smads 2 e 3 são estimulatórias, enquanto a Smad 7 é inibitória. Ele também estimula a transcrição do colágeno nas HSCs por mecanismos dependentes de peróxido de hidrogênio e C/EBP- β (CCAAT/"enhancer binding protein- β ")¹⁶⁵. Além disto, o TGF- β 1 também regula a expressão de MMPs e seus inibidores e modula reações inflamatórias pela influência nas funções das células T¹⁶². Baseados em diversos estudos em modelos experimentais de ratos e camundongos e de HSCs e doença hepática crônica, sabe-se que o estresse oxidativo leva a dano hepatocitário e ativação de HSCs e KC, resultando em fibrose hepática, sendo o TGF- β necessário neste processo. Além disso, é

conhecido também que a atenuação da sinalização TGF- β reduz a fibrogênese¹⁶⁶. Desta maneira, o TGF- β é considerado um fator principal na aceleração da progressão da fibrose não só no fígado, mas também em outros órgãos, e a constatação da diminuição da sua expressão gênica induzida pelo SNAC é um achado altamente relevante. Os animais que receberam SNAC também apresentaram menor expressão de colágeno 1 α , resultado provavelmente da infra-regulação do TGF- β 1, denotando o efeito atenuador da droga na fibrose hepática.

De acordo com seus conhecidos efeitos antioxidantes, o SNAC neste trabalho induziu uma menor expressão de HSP-60, um gene relacionado com estresse oxidativo.

Baseado nos achados de expressão gênica, nós poderíamos considerar a possibilidade de que o SNAC, pela redução do estresse oxidativo, levou a um padrão de expressão gênica de atenuação da fibrose hepática (supra-regulação da MMP-13 com infra-regulação da TIMP-2, TGF- β 1 e colágeno 1 α). Tal perfil de expressão gênica se correlacionou com a quantificação do colágeno.

Os efeitos benéficos do SNAC na fibrose hepática podem estar associados tanto a uma ação antioxidante em reações primárias com EROS como com reações secundárias do NO livre liberado em uma redução enzimática primária de SNAC em NAC mais NO. No segundo caso, o NAC formado também pode exercer um efeito protetor. De fato, Galicia-Moreno e col (2009) utilizando modelo experimental de cirrose com CCl₄ demonstraram que o NAC bloqueou a peroxidação lipídica e a deposição de colágeno, com abolição do sinal do TGF- β . Os autores concluíram que os mecanismos de

prevenção da cirrose hepática envolveram a prevenção do estresse oxidativo e a infra-regulação do TGF- β ¹⁶⁷. Empregando nutrição enteral total em ratos Sprague-Dawley com desenvolvimento de EHNA por oferta excessiva de gordura poliinsaturada, Baumgardner e col (2008) reportaram com uso de NAC atenuação do aumento do estresse oxidativo hepático e diminuição do colágeno avaliado na coloração de Picrossirius, porém sem bloquear o desenvolvimento de esteatose neste modelo¹⁶⁸.

Deve ser notado que a ação protetora do SNAC neste estudo pode também decorrer em parte, pela sua habilidade de ser uma fonte exógena de NO, levando ao aumento da biodisponibilidade local ou sistêmica do NO neste modelo animal. A liberação do NO pelo SNAC em meio biológico aquoso pode ocorrer espontaneamente de acordo com a reação:

Ou através da redução de NO do SNAC por enzimas redutoras de acordo com:

Onde RSNO é uma representação genérica para S-nitrosotióis, Red é a enzima reduzida, Ox é a forma oxidada da enzima e RSH é o tiol parente regenerado (no presente caso a NAC). Nesta reação, deve ser levado em conta também que o NAC é capaz de exercer uma ação antioxidante adicional, conforme discutido previamente.

Analisando os efeitos da liberação de NO pelo SNAC, é importante ser mencionado que o papel do NO na formação da fibrose ainda não é claramente compreendido¹²¹. Os seus efeitos dependem fortemente de sua concentração local e tempo de exposição. Baixos níveis de NO, como aqueles resultantes da síntese da eNOS, são citoprotetores e adequados para a manutenção da perfusão sinusoidal hepática. Em contraste, altos níveis de NO, oriundos da iNOS, relacionada com lesão hepática tanto aguda como crônica, podem levar à citotoxicidade¹⁰⁷. Estudos animais experimentais têm demonstrado função diminuída da eNOS na cirrose^{122 123}, com diminuição da biodisponibilidade local de NO¹²⁴. Esta diminuição do NO poderia levar a uma falta de inibição do estresse oxidativo, assim como a uma vasoconstrição relativa com fluxo sanguíneo hepático prejudicado, e esta combinação, favorece lesão hepática e fibrose. Por outro lado, Aram e col (2008) demonstraram em camundongos que a deficiência de iNOS teve um efeito protetor da fibrose hepática induzida por CCl₄, que neste caso pôde ser associada com uma diminuição na formação de peroxinitrito, diminuição de necrose e apoptose aumentada¹²⁵. Em resumo, a expressão aumentada de iNOS gera estresse oxidativo e um estado pró-inflamatório enquanto a expressão reduzida de eNOS afeta a microcirculação hepática^{123 126}. Dentro deste raciocínio, a redução de EROS pela inibição do estresse oxidativo pelo SNAC poderia ser benéfica clinicamente na prevenção de fibrose hepática pelo fornecimento adequado de NO, que também poderia exercer efeitos positivos na manutenção da perfusão sinusoidal hepática. Entretanto, o efeito da administração do SNAC na perfusão hepática não foi especificamente avaliado no presente estudo.

A dietilnitrosamina é um carcinógeno hepático conhecido e muitas das anormalidades induzidas por este composto podem derivar do estresse oxidativo, que também é conhecido por acompanhar o desenvolvimento de cânceres^{169 170}. A associação de dietilnitrosamina com uma dieta hiperlipídica deficiente em colina em ratos Sprague-Dawley neste modelo teve a intenção de promover fibrose avançada dentro de um período de tempo relativamente curto, no contexto de EHNA experimental¹³⁸. Comparado com outros modelos experimentais de EHNA com fibrose como com dieta CDAA (deficiente em colina / L-aminoácido definida) ou com dieta DCM¹⁷¹, o modelo utilizado neste estudo pode ser considerado extremamente agressivo, visto que pôde ser observada fibrose avançada (estádio 3 e 4) na maioria dos animais (70% dos animais) dentro de um período de apenas 8 semanas. Além disto, na avaliação da esteatose, balonização e inflamação lobular, os escores máximos estavam presentes na maioria dos animais submetidos a este modelo de EHNA. A presença de reação ductular grau 3 frequentemente observada nos grupos também denota o potencial lesivo do modelo. Diversos estudos “in vivo” e “in vitro” têm recentemente apontado a reação ductular secundária à ativação do compartimento de células progenitoras como um mecanismo adicional para a fibrogênese^{138 172 173}. Este fenômeno também tem sido reportado na EHNA em humanos^{174 175}. Foram evidenciadas também muitas mitoses em hepatócitos e várias KC xantomatosas agrupadas ou agregadas em sinusóides, provavelmente secundárias à perda frequente de hepatócitos, focal e confluyente. Tais achados sugerem uma atividade lobular bem evidente nesse modelo de EHNA e poderiam explicar também a progressão rápida da fibrose

observada nesses animais. Mesmo sob estas circunstâncias muito agressivas o SNAC se mostrou útil na fibrose.

Com relação ao tratamento da DGHNA/ EHNA, até o momento não existe terapia comprovada e conclusiva para esta doença^{10 176 177}, demonstrando a importância de estudos com potenciais agentes terapêuticos nesta área. Visto que modificações dietéticas e de estilo de vida freqüentemente falham ou não podem ser implementadas eficientemente, há claramente uma necessidade de agentes farmacológicos nesta condição, projetados e estudados com o objetivo de melhoria da histologia hepática¹⁷⁸. Diversos agentes com diferentes mecanismos de ação têm sido investigados, refletindo as diferentes vias consideradas importantes na patogênese da DHGNA. As principais linhas de estudo envolvem medicamentos que melhoram a resistência insulínica e diminuem o estresse oxidativo¹⁷⁹. Uma meta-análise de Musso e col (2010) que avaliou estudos clínicos controlados e aleatorizados no tratamento da DGHNA¹⁸⁰, concluiu que os tratamentos farmacológicos disponíveis até o momento não mostraram benefício consistente na fibrose hepática, com exceção do telmisartan, um bloqueador do receptor de angiotensina (BRA), porém em um estudo com número limitado de pacientes. Analisando apenas estudos clínicos aleatorizados de grande escala, nenhuma droga se mostrou benéfica de maneira convincente neste quesito ainda^{181 182 183}. Esta ausência de benefício poderia ser atribuída à falta de efetividade dos tratamentos propostos, a uma curta duração dos estudos ou devido à inclusão de indivíduos com graus leves de fibrose¹⁸⁰.

A seguir serão apresentados os resultados de trabalhos clínicos importantes e alguns trabalhos experimentais desenvolvidos nos últimos anos

com relação à fibrose hepática na DHGNA/ EHNA com BRAs (losartan, telmisartan, valsartan e olmesartan), sensibilizadores de insulina (metformina e glitazonas), agentes hipolipemiantes (estatinas e ezetimibe), antioxidantes / hepatoprotetores [vitamina E, ácido ursodesoxicólico (UDCA), pentoxifilina] e novos agentes.

No trabalho referido previamente com telmisartan, Georgescu e col (2009) avaliaram o uso de valsartan e telmisartan em pacientes hipertensos com EHNA¹⁸⁴. Os autores demonstraram que as duas drogas melhoraram a resistência insulínica, porém só o telmisartan melhorou a fibrose hepática, cujos mecanismos parecem envolver a modulação de PPAR- γ e inibição das HSCs, conforme já demonstrado em estudos experimentais^{185 186}. Em um estudo aleatorizado aberto recente comparando rosiglitazona vs rosiglitazona e metformina vs rosiglitazona e losartan no tratamento da EHNA em 137 pacientes, Torres e col (2011) demonstraram melhora na fibrose ($p < 0,001$), sem diferenças na histologia hepática entre as três modalidades de tratamento¹⁸⁷. Três estudos experimentais recentes corroboraram o efeito benéfico dos BRAs na fibrose hepática na EHNA. Nakagami e col (2010) utilizando telmisartan em ratos Wistar com EHNA com fibrose por dieta DCM relataram efeito anti-fibrótico da droga na prevenção e reversão de EHNA¹⁸⁸, e Sturzeneker e col (2011), com olmesartan, mostraram prevenção da fibrose hepática e EHNA em modelo de hipercolesterolemia em coelhos¹⁸⁹. Finalmente, Kaji e col (2011), em modelo com dieta CDAA em ratos mostraram supressão do desenvolvimento da fibrose hepática com inibição da proliferação das HSCs com uso de losartan isoladamente ou com deferassirox, um quelante de ferro¹⁹⁰. É importante lembrar que o receptor de AT1 está presente nas

HSCs e quando ativado, estimula a secreção de MEC, proliferação da HSC, liberação de citocinas e fatores de crescimento e inibe a degradação do colágeno, promovendo fibrose hepática⁹⁵, mostrando o racional benéfico desta terapêutica na fibrose hepática.

Com relação aos sensibilizadores de insulina, os principais trabalhos clínicos envolveram metformina e os agonistas do PPAR- γ pioglitazona e rosiglitazona. O efeito benéfico da metformina na fibrose hepática foi demonstrado por Nair e col (2004)¹⁹¹ e de Oliveira e col (2008)¹⁹², este último em combinação com NAC. Porém Omer e col (2010)¹⁹³ utilizando metformina vs rosiglitazona vs metformina vs metformina + rosiglitazona e Levine e col (2011)¹⁹⁴ na população pediátrica com metformina vs vitamina E vs placebo não mostraram benefício na fibrose hepática, assim como Haukeland e col (2009), com metformina vs placebo¹⁹⁵. Garinis e col (2010) relataram benefício da metformina em exames de imagem, porém sem dados histológicos¹⁹⁶. Na avaliação da pioglitazona, Sanyal e col (2004)¹⁹⁷, Promrat e col (2004)¹⁹⁸, Belfort e col (2006)¹⁹⁹ e Aithal e col (2008)²⁰⁰ mostraram melhora significativa no estágio de fibrose com sua utilização ($p=0,03$; $p=0,04$; $p=0,002$ e $p=0,006$; respectivamente). Porém no estudo recente PIVENS, de Sanyal e col (2010)²⁰¹, duplo-cego aleatorizado de grande escala que avaliou pioglitazona vs vitamina E vs placebo não foi demonstrado benefício da pioglitazona em relação ao grupo placebo, quanto a melhora da fibrose. Já a vitamina E foi superior ao placebo com relação à balonização hepatocelular, porém também sem benefício evidente na fibrose. Com exceção do estudo de Torres e col (2011) descrito previamente¹⁸⁷, os trabalhos com rosiglitazona não mostraram benefício na fibrose hepática^{202 203}, mesmo após terapia prolongada²⁰⁴. Em

artigos recentes de revisão sobre o papel das glitazonas no tratamento da EHNA, Pais e col (2011)²⁰⁵ e Ratziu e col (2011)²⁰⁶ referem que de uma maneira geral os dados de estudos clínicos disponíveis mostram que as glitazonas (pioglitazona e rosiglitazona) não tiveram efeito na fibrose hepática, mesmo por tempo prolongado ou quando a fibrose foi avaliada por micromorfometria, uma técnica mais sensível e quantitativa. Já meta-análise recente de Mahady e col (2011) que compilou sete estudos clínicos aleatorizados com tiazolidinedionas, concluiu que existe um benefício modesto na fibrose com a pioglitazona ($p=0,04$)²⁰⁷. Estes dados mostram que os efeitos dos sensibilizadores de insulina na fibrose da EHNA ainda não estão completamente esclarecidos. Os achados do estudo PIVENS de benefício da vitamina E²⁰¹ e de Oliveira e col (2008)¹⁹² com metformina e NAC ilustram a importância do estresse oxidativo na patogênese da EHNA.

Estudos clínicos recentes com hipolipemiantes (atorvastatina, pívastatina e ezetimibe) em sua grande maioria não mostraram alteração significativa no estágio de fibrose^{208 209 210 211 212 213}.

Dentre os medicamentos considerados hepatoprotetores/ antioxidantes, além dos trabalhos clínicos com vitamina E mencionados previamente^{194 197 201}, o UDCA também foi estudado. Inicialmente o UDCA foi avaliado na dose de 13 a 15mg/ Kg por Lindor e col (2004)²¹⁴ e na dose de 12 a 15mg/kg com vitamina E por Dufour e col (2006)²¹⁵, sem efeitos significantes na fibrose. Doses mais elevadas de 28 a 35mg/ Kg de UDCA utilizada por Ratziu e col (2011)²¹⁶ mostraram melhora em marcadores séricos de fibrose, porém sem dados de histologia hepática. Entretanto, Leuschner e col (2010) em estudo aleatorizado de grande escala, também utilizando doses elevadas de UDCA (23 a 28 mg/

Kg) não conseguiram demonstrar melhora histológica da fibrose²¹⁷. Em estudo recente com dieta DCM em ratos Wistar por 10 semanas, Buko e col (2011) mostraram benefício do UDCA na esteatose inflamação e balonização hepática, principalmente em doses elevadas (40 e 80 mg/ Kg), porém sem avaliação da fibrose²¹⁸. Dois estudos clínicos recentes de avaliação histológica com pentoxifilina mostraram resultados controversos apesar de terem desenhos similares^{219 220}, mostrando que são necessárias novas avaliações para definição do papel desta medicação no tratamento da EHNA^{182 221}.

Diversos estudos experimentais com novos agentes ou diferentes aplicações de drogas já existentes estão sendo realizados na avaliação da fibrose hepática na EHNA. Witek e col (2009) com dieta DCM em camundongos db/ db reportaram com VX-166, um inibidor global de caspase, supressão do desenvolvimento de fibrose, avaliada pela coloração de Picrossirius e conteúdo de hidroxiprolina, com diminuição da expressão de α -SMA (marcador de HSC ativada) e colágeno 1 α ²²². Estudo clínico recente de fase 2 de Ratziu e col (2011) com GS-9450, um inibidor seletivo de caspase, por 4 semanas mostrou reduções nos níveis séricos de alanina aminotransferase, porém sem avaliação histológica²²³.

Inúmeros trabalhos experimentais na EHNA têm utilizado drogas com ação anti-fibrogênica tanto “in vitro” como “in vivo”. A utilização de curcumina (pigmento amarelo da planta *Curcuma longa*, com propriedades antioxidantes), em modelo com dieta DCM em camundongos C57BL/ 6 mostrou efeitos anti-fibróticos²²⁴, com benefício antioxidante em modelo de coelhos com dieta hiperlipídica²²⁵. Estudos “in vitro” sugerem que seus mecanismos de ação podem envolver o bloqueio/ atenuação de estímulos para ativação das HSCs,

como a leptina²²⁶, o LDL oxidado²²⁷, a hiperglicemia²²⁸, e a insulina e estresse oxidativo²²⁹. Utilizando um bloqueador seletivo de aldosterona em ratos, Noguchi e col (2010) demonstraram atenuação da fibrose hepática com supressão da HSC ativada²³⁰, e Nakagami e col (2011) com nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio, também descreveram recentemente prevenção de fibrose em modelo com dieta DCM em ratos, efeito que pode estar relacionado ao aumento da atividade do PPAR- γ ²³¹.

É possível observar que até o momento nenhuma droga mostrou-se convincentemente benéfica na fibrose hepática da EHNA. Os modelos experimentais permitem estudar diversos aspectos da patogênese da doença e o efeito de diferentes intervenções, pois lesão hepática grave decorrente da inflamação e fibrose hepática pode ser obtida dentro de semanas, conforme evidenciado no modelo experimental utilizado nesta tese, enquanto o estabelecimento de doença hepática em estágio avançado em humanos geralmente leva décadas. Estudos mostram que a reversão da fibrose hepática é caracterizada pelos seguintes achados: 1- erradicação do agente lesivo; 2- apoptose da HSC e, ou também, reversão do fenótipo da HSC para quiescente; 3- expressão de MMPs e 4- regeneração do parênquima e função hepática^{72 88}. Após a retirada do estímulo lesivo, as mudanças histológicas chave observadas durante esta fase de resolução são a diminuição dramática da população de HSC/ MF ativados e a degradação da matriz fibrótica⁹⁷. Apenas a apoptose da HSC ativada não é suficiente para permitir o remodelamento da MEC no restabelecimento da função hepática normal, sendo necessária também a degradação da matriz fibrótica^{72 97} pela ação das MMPs. Como visto previamente, o SNAC agiu na degradação da matriz fibrótica, com infra-

regulacao da TIMP-2 e supra-regulação da MMP-13. Além disso, o efeito atenuador da fibrose com a droga se manteve mesmo com a continuidade do estímulo nocivo durante o protocolo de estudo. Este perfil de expressão gênica sugere maior remoção do colágeno nos animais do grupo SNAC. E aqui não me refiro à remoção de colágeno após o processo de deposição completo, mas sim ao processo contínuo de remodelamento hepático no qual o equilíbrio entre deposição e remoção define o conteúdo final de colágeno. Quando comparado ao grupo EHNA, os animais do grupo SNAC tiveram menos colágeno no tecido, porém em quantidade maior que os animais do grupo controle. Pode-se sugerir que o vetor remoção parece estar mais evidente no grupo SNAC, conforme demonstrado na análise de expressão gênica. Uma combinação de formação diminuída e degradação aumentada de colágeno também poderia ser considerada como explicação para o menor acúmulo de colágeno no fígado dos animais que receberam SNAC.

Poderia ser argumentado que a atenuação da fibrose promovida pelo SNAC foi um achado específico para este modelo experimental de EHNA com indução de cirrose, e não uma propriedade anti-fibrótica da droga. Isto provavelmente não é verdadeiro, visto que diversos trabalhos prévios^{133 135 136}, mostraram que o SNAC foi capaz de interferir positivamente em diversos eventos conhecidos relacionados com a progressão da DHGNA/ EHNA^{5 62 74}. Além disso, o efeito anti-fibrogênico do SNAC também foi confirmado em cirrose hepática experimental induzida por ligadura do ducto biliar comum²³². Neste trabalho de ligadura do ducto biliar, os autores demonstraram que os animais tratados com SNAC tiveram menor acúmulo de fibrose hepática, com infra-regulação do TNF- α , TGF- β , PDGF, PDGFR β , MMP-2 e TIMP-1. E

também evidenciaram que o SNAC promoveu infra-regulação na ativação da sinalização p38, JNK e Akt (proteína quinase B). O mecanismo de ação do SNAC poderia ser atribuído à sua capacidade de terminar a propagação de espécies de radicais pela inativação dos radicais oxil (RO•) e peroxil (ROO•)¹³³ de acordo com:

O dímero N-acetilcisteína (RS-SR) e os produtos nitrados RONO e ROONO são incapazes de propagar reações de radicais em situações de estresse oxidativo. Então as reações 3 e 4 podem ser consideradas reações terminadoras no processo de propagação de radicais. Embora o NAC também seja um notório antioxidante, deve ser notado que recentemente foi relatado que o SNAC apresentou “in vitro” uma ação antioxidante mais efetiva do que seu parente NAC contra a oxidação do ácido linoleico²³³.

Além disso, dados recentes do nosso grupo em estudo “in vitro” com SNAC corroboraram o papel anti-fibrogênico desta medicação²³⁴. O SNAC em linhagem de célula GRX induziu a reversão do fenótipo de miofibroblasto para lipócito, com diminuição da expressão gênica de α -SMA. As HSCs tratadas com SNAC mostraram também diminuição significativa da expressão e dos níveis proteicos no sobrenadante de TGF β -1, com aumento da MMP-13 (RNAm e níveis de proteína). Também foi demonstrado diminuição da expressão de MMP-2 e colágeno 1 α nas HSCs sob efeito do SNAC.

Os resultados apresentados nesta tese mostram pela primeira vez o efeito anti-fibrogênico do SNAC “in vivo” na EHNA experimental com fibrose avançada. Visto que estudos longitudinais de desfecho mostraram a importância prognóstica da fibrose hepática na história natural da DHGNA²³⁵, a busca de drogas que possam interferir nesta evolução negativa é de suma importância, sendo o SNAC um potencial candidato.

6. Conclusões

1. O S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) ocasionou atenuação significativa da fibrose hepática em modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica em ratos Spraguey-Dawley, induzida por dieta hiperlipídica deficiente em colina associada à dietilnitrosamina por 8 semanas;
2. O SNAC diminuiu a expressão de mRNA da proteína de choque térmico (HSP)-60 associada ao estresse oxidativo, neste modelo experimental;
3. O SNAC aumentou a expressão de mRNA das metaloproteinases de matriz (MMP)-13 e MMP9 e diminuiu a expressão gênica do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP)-2, do TGF β -1 e do colágeno 1 α neste modelo experimental;
4. Pela avaliação da expressão gênica e histologia hepática nos animais sob efeito do SNAC, foi possível concluir que esta droga, pela redução do estresse oxidativo proporcionou um perfil de expressão gênica favorável à maior remoção do colágeno, com atenuação da fibrose comprovada na quantificação do mesmo.

7. Referências

¹ Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):155-61.

² Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S99-112.

³ Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010; 30(1):3-16

⁴ Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(7):539-64.

⁵ Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010;55(3):560-78.

⁶ Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(9):2042-7.

⁷ Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.

⁸ Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and Liver Disease*. 2010;42(5):320-30.

-
- ⁹ Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
- ¹⁰ Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-84.
- ¹¹ Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev*. 2010;11(6):430-45.
- ¹² Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Epidemiol*. 2007;17(11):863-9.
- ¹³ Abdelmalek M F, Diehl A M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am*. 2007;91(6):1125-49.
- ¹⁴ Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res*. 2009;50:S74-9.
- ¹⁵ 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(3):829-38.
- ¹⁶ Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, Tomašić V, Jukić LV, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(34): 4539-50.

-
- ¹⁷ Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11(2):183-90.
- ¹⁸ Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol*. 2006;44(1):197-208.
- ¹⁹ Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191-8.
- ²⁰ Angulo, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221-31.
- ²¹ Grattagliano I, Caraceni P, Calamita G, Ferri D, Gargano I, Palasciano G, Portincasa P. Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(7):523-30.
- ²² Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(10):1260-7.
- ²³ Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(5):545-9.
- ²⁴ Neuschwander-Tetri B. A resistance movement in NASH. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):2813-4.

-
- ²⁵ Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002;35(4):898-904.
- ²⁶ Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res*. 2010;162(1):95-109.
- ²⁷ Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1297-305.
- ²⁸ Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010;30(4):391-401.
- ²⁹ Horoz M, Bolukbas C, Bolukbas FF, Sabuncu T, Aslan M, Sarifakiogullari S, Gunaydin N, Erel O. Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol*. 2005;5:35.
- ³⁰ Bonnefont-Rousselot D, Ratzu V, Giral P, Charlotte F, Beucier I, Poynard T; Lido Study Group. Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(1):91-9.
- ³¹ Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(7):1259-72.
- ³² Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of

fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(5):G1070-7.

³³ Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009;41(9):615-25.

³⁴ Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010;103(2):71-83.

³⁵ Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;37(3):544-50.

³⁶ Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2461-8.

³⁷ Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med*. 2002; 6(3):399-406.

³⁸ Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.

³⁹ Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative

stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.

⁴⁰ Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003; 125(2):437-43.

⁴¹ Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(9):1708-17.

⁴² Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol.* 2006;44(1):197-208.

⁴³ Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Day CP. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of nonalcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut.* 2005;54(7):987-93.

⁴⁴ Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, Robino G, Tamagno E, Aragno M, Danni O, Autelli R, Colombatto S, Dianzani MU, Pinzani M, Parola M. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2004;40(1):60-8.

⁴⁵ Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):299-310.

-
- ⁴⁶ Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-88.
- ⁴⁷ Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004;40(1):185-94.
- ⁴⁸ Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1067-75.
- ⁴⁹ Yu S, Rao S, Reddy JK: Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):561-72.
- ⁵⁰ Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(5):379-85.
- ⁵¹ Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):185-92.
- ⁵² Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.

-
- ⁵³ Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2(6):273-80.
- ⁵⁴ Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the non-fat cells. *Vit Horm*. 2006;74:443-76.
- ⁵⁵ Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34(6):1158-63.
- ⁵⁶ Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48(2):206-11.
- ⁵⁷ Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-87.
- ⁵⁸ Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(5):695-708.

-
- ⁵⁹ Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):370-9.
- ⁶⁰ Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010;26(3):202-8.
- ⁶¹ Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
- ⁶² Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655-69.
- ⁶³ Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol.* 2009;50(3):604-20.
- ⁶⁴ Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med.* 2001;344(6):452-4.
- ⁶⁵ Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology.* 2003;124(1):105-17.
- ⁶⁶ Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, Pol S. Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2008;149(6):399-403.
- ⁶⁷ Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, Zeuzem S, Manns MP, Hansen BE, Schalm SW, Janssen HL. Sustained virologic response

and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis.

Ann Intern Med. 2007;147(10):677-84.

⁶⁸ Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as modulator of stellate cell and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):351-72.

⁶⁹ Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology.* 1979;76(4):710-9.

⁷⁰ Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 1998;292(3):447-52.

⁷¹ Schaffner F, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology.* 1963;44:239-42.

⁷² Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):25-33.

⁷³ Povero D, Busletta C, Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Paternostro C, Parola M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol.* 2010;25(8):1075-91.

⁷⁴ Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125-72.

⁷⁵ Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(8-9):1639-42.

-
- ⁷⁶ Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1175-86.
- ⁷⁷ Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology.* 2004;127(4):1189-97.
- ⁷⁸ Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):27-41.
- ⁷⁹ De Minicis S, Brenner DA. NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys.* 2007;462(2):266-72.
- ⁸⁰ Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.* 2003;124(1):147-59.
- ⁸¹ Choi SS, Sicklick JK, Ma Q, Yang L, Huang J, Qi Y, Chen W, Li YX, Goldschmidt-Clermont PJ, Diehl AM. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology.* 2006;44(5):1267-77.
- ⁸² Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology.* 2008;47(4):1394-400.

-
- ⁸³ Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol*. 2007;46(6):1064-74.
- ⁸⁴ 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(6):419-28.
- ⁸⁵ Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001; 21(3):397-416.
- ⁸⁶ Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveau V, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(3):403-9.
- ⁸⁷ Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*. 2003;37(1):4-12.
- ⁸⁸ Kawada N. Evolution of hepatic fibrosis research. *Hepatol Res*. 2011;41(3):199-208.
- ⁸⁹ Lanthier N, Horsmans Y, Leclercq IA. The metabolic syndrome: how it may influence hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(4):404-11.
- ⁹⁰ Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism

involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2001;34(4 Pt 1):738-44.

⁹¹ Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, Fingas CD, Marquitan G, Jochum C, Gerken G, Friedman SL, Canbay A. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells. *Hepatol Res*. 2009;39(6):601-8.

⁹² Guimarães EL, Empsen C, Geerts A, van Grunsven LA. Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2010;52(3):389-97.

⁹³ Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Tazuma S, Chayama K. Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol*. 2008;43(4):298-304.

⁹⁴ Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate activated protein kinase. *Hepatology*. 2008;47(2):677-85.

⁹⁵ Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):825-52.

⁹⁶ Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am J Med*. 1970;49:707-21.

⁹⁷ Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol*. 2009;8(4):283-91.

-
- ⁹⁸ Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1303-13.
- ⁹⁹ Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1795-808.
- ¹⁰⁰ Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci*. 2007;112(5):265-80.
- ¹⁰¹ Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med*. 2009;24(2):143-52.
- ¹⁰² Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46(5):955-75.
- ¹⁰³ Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem*. 2002;277(13):11069-76.

-
- ¹⁰⁴ Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*. 1996;271(3):1544-50.
- ¹⁰⁵ Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):373-84.
- ¹⁰⁶ Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
- ¹⁰⁷ Rockey DC, Shah V. Nitric oxide biology and the liver: report of an AASLD research workshop. *Hepatology*. 2004;39(1):250-7.
- ¹⁰⁸ Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med*. 1998;25(4-5):434-56.
- ¹⁰⁹ Mancardi D, Ridnour LA, Thomas DD, Katori T, Tocchetti CG, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Wink DA. The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: a practical guide. *Curr Mol Med*. 2004;4(7):723-40.
- ¹¹⁰ Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(1):163-74.
- ¹¹¹ Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1421-41.

-
- ¹¹² Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem*. 1997;272(2):1402-11.
- ¹¹³ Hubbo H, Darley-USmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(5):809-20.
- ¹¹⁴ Violi F, Marino R, Milite MT, Loffredo L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev*. 1999;15(4):283-8.
- ¹¹⁵ Forslund T, Nilsson HM, Sundqvist T. Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(2):482-7.
- ¹¹⁶ Tziros C, Freedman JE. The many antithrombotic actions of nitric oxide. *Curr Drug Targets*. 2006;7(10):1243-51.
- ¹¹⁷ Pacher P, Beckman JS e Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
- ¹¹⁸ Khedara A, Goto T, Morishima M, Kayashita J, Kato N. Elevated body fat in rats by dietary nitric oxide synthase inhibitor, L-N omega nitroarginine. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63(4):698-702.
- ¹¹⁹ Garcia-Villafranca J, Guillen A, Castro J. Involvement of nitric oxide/cGMP signaling pathway in the regulation of fatty acid metabolism in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 2003;65(5):807-12.

-
- ¹²⁰ Fruhbeck G, Gómez-Ambrosi, J. Modulation of leptin-induced White adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell Signal*. 2001;13(11):827-33.
- ¹²¹ Diesen DL, Kuo PC. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part II. Redox Biology in Pathologic Hepatocytes and Implications for Intervention. *J Surg Res*. 2011;167(1):96-112.
- ¹²² Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*. 1999;117(5):1222-8.
- ¹²³ Leung TM, Tipoe GL, Liong EC, Lau TY, Fung ML, Nanji AA. Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis. *Int J Exp Pathol*. 2008;89(4):241-50.
- ¹²⁴ Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47(4):1248-56.
- ¹²⁵ Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology*. 2008;47(6):2051-8.

-
- ¹²⁶ Leung TM, Fung ML, Liong EC, Lau TY, Nanji AA, Tipoe GL. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice. *Histol Histopathol.* 2011;26(2):201-11.
- ¹²⁷ Koruk M, Aksoy H, Akcay F, Onuk MD. Antioxidant capacity and nitric oxide in patients with hepatic cirrhosis. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(3):252-6.
- ¹²⁸ de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release. *J Phys Chem A.* 2002;106: 8963-70.
- ¹²⁹ Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992;258(5090):1898-902.
- ¹³⁰ Jaworski K, Kinard F, Goldstein D, Holvoet P, Trouet A, Schneider YJ, Remacle C. S-nitrosothiols do not induce oxidative stress, contrary to other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2001;425(1):11-9.
- ¹³¹ Shishido SM, de Oliveira MG. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem Photobiol.* 2000;71(3):273-80.
- ¹³² Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide.* 2002;7:57-66.
- ¹³³ de Oliveira CP, Simplicio FI, de Lima VM, Yuahasi K, Lopasso FP, Alves VA, Abdalla DS, Carrilho FJ, Laurindo FR, de Oliveira MG. Oral administration of S-

nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12(12):1905-11.

¹³⁴ Simplicio FI, Seabra AB, de Souza GFP, de Oliveira MG. *In Vitro* Inhibition of Linoleic Acid Peroxidation by Primary S-Nitrosothiols. *J Braz Chem Soc.* 2010;10(21):1885-95.

¹³⁵ de Oliveira CP, de Lima VM, Simplicio FI, Soriano FG, de Mello ES, de Souza HP, Alves VA, Laurindo FR, Carrilho FJ, de Oliveira MG. Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(2):299-305.

¹³⁶ de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, de Sá SV, Simplicio FI, de Mello ES, Corrêa-Giannella ML, Alves VA, Laurindo FR, de Oliveira MG, Giannella-Neto D, Carrilho FJ. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol.* 2006;45(5):725-33.

¹³⁷ Oliveira CP, Alves VA, Lima VM, Stefano JT, Debbas V, Sá SV, Wakamatsu A, Corrêa-Giannella ML, de Mello ES, Havaki S, Tiniakos DG, Marinos E, de Oliveira MG, Giannella-Neto D, Laurindo FR, Caldwell S, Carrilho FJ. Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(2):290-7.

¹³⁸ de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, de Mello ES, Cerri GG, Carrilho FJ, Caldwell SH. A rodent model of NASH with

cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2008;49(6):1055-61.

¹³⁹ Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.

¹⁴⁰ Cogliati B, Da Silva TC, Aloia TP, Chaible LM, Real-Lima MA, Sanches DS, Matsuzaki P, Hernandez-Blazquez FJ, Dagli ML. Morphological and molecular pathology of CCL(4) -induced hepatic fibrosis in connexin43-deficient mice. *Microsc Res Tech.* 2011;74(5):421-9.

¹⁴¹ Weibel ER. Stereological methods: practical methods for biological morphometry. Londres: Academic Press. 1989:415.

¹⁴² Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

¹⁴³ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

¹⁴⁴ Germani G, Hytioglou P, Fotiadu A, Burroughs AK, Dhillon AP. Assessment of fibrosis and cirrhosis in liver biopsies: an update. *Semin Liver Dis.* 2011;31(1):82-90.

-
- ¹⁴⁵ Puchtler H, Meloan SN, Waldrop FS. Are picro-dye reactions for collagens quantitative? Chemical and histochemical considerations. *Histochemistry*. 1988;88(3-6):243-56.
- ¹⁴⁶ Jimenez W, Parés A, Caballería J, Heredia D, Bruguera M, Torres M, Rojkind M, Rodés J. Measurement of fibrosis in needle liver biopsies: evaluation of a colorimetric method. *Hepatology*. 1985;5(5):815-8.
- ¹⁴⁷ López-De León A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem*. 1985;33(8):737-43.
- ¹⁴⁸ James J, Bosch KS, Aronson DC, Houtkooper JM. Sirius red histophotometry and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its application in growing rat liver. *Liver*. 1990;10(1):1-5.
- ¹⁴⁹ Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1445-9.
- ¹⁵⁰ Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis—a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol*. 2006;44(1):111-17.
- ¹⁵¹ Sreenivasan P, Inayat I, Jain D, Bari K, Garcia-Tsao G. Histological/clinical correlation in cirrhosis—Validation of a histological classification of the severity of cirrhosis [Abstract]. *Hepatology*. 2007;46(Suppl.1):579A.

-
- ¹⁵² Viola A, Jain D, Garcia-Tsao G. Quantitative histological assessment in cirrhosis: septal thickness predicts clinical decompensation [Abstract]. *J Hepatol*. 2009;50:S94.
- ¹⁵³ Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102(3):538-49.
- ¹⁵⁴ Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1795-808.
- ¹⁵⁵ Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275(34):26411-5.
- ¹⁵⁶ Issa R, Zhou X, Trim N, Millward-Sadler H, Krane S, Benyon C, Iredale J. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J*. 2003;17(1):47-9.
- ¹⁵⁷ Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med*. 2001;50(2):58-65.

-
- ¹⁵⁸ Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology*. 2003;37(5):1067-78.
- ¹⁵⁹ Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol*. 2000;113(6):443-53.
- ¹⁶⁰ Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grötzinger J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J*. 2006;20(3):444-54.
- ¹⁶¹ Zhou X, Murphy FR, Gehdu N, Zhang J, Iredale JP, Benyon RC. Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2004;279(23):23996-4006.
- ¹⁶² Inagaki, Y, Okazaki, I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2007;56(2):284-92.
- ¹⁶³ Roth S, Michel K, Gressner AM. (Latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1998;27(4):1003-12.
- ¹⁶⁴ Dooley S, Hamzavi J, Ciuculan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology*. 2008;135(2):642-59

-
- ¹⁶⁵ García-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Domínguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M. Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999; 29(3):960-70.
- ¹⁶⁶ Dooley S, Ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. 2011; *in press*.
- ¹⁶⁷ Galicia-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(8):908-14.
- ¹⁶⁸ Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Albano E, Badger TM, Ronis MJ. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr*. 2008;138(10):1872-9.
- ¹⁶⁹ Ibrahim SS, Nassar NN. Diallyl sulfide protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver tumorigenesis: role of aldose reductase. *World J Gastroenterol*. 2008;14(40):6145-53.
- ¹⁷⁰ Naura AS, Sharma R. Studies on mode of action of hexaammine Co(III) chloride against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 2009;23(3):193-201.

-
- ¹⁷¹ De Minicis S, Svegliati-Baroni G. Fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):179-87.
- ¹⁷² Jung Y, Brown KD, Witek RP, Omenetti A, Yang L, Vandongen M, Milton RJ, Hines IN, Rippe RA, Spahr L, Rubbia-Brandt L, Diehl AM. Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1532-43.
- ¹⁷³ Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest*. 2008;88(2):112-23.
- ¹⁷⁴ Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, Dixon JB, Weltman MD, Tilg H, Moschen AR, Purdie DM, Demetris AJ, Clouston AD. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology*. 2007;133(1): 80-90.
- ¹⁷⁵ Rombouts K, Marra F. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis*. 2010;28(1):229-35.
- ¹⁷⁶ Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(5):695-708.
- ¹⁷⁷ Lam B, Younossi ZM. Treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2010;3(2):121-37.

-
- ¹⁷⁸ Pascale A, Pais R, Ratziu V. An overview of nonalcoholic steatohepatitis: past, present and future directions. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010;19(4):415-23.
- ¹⁷⁹ Parikh N, Ahmad J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pharmacologic and Surgical Options. *Gastroenterol Clin N Am.* 2011;40: 541-59.
- ¹⁸⁰ Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(1):79-104.
- ¹⁸¹ Hojo M, Watanabe S. Pharmacological therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2011;41(3):209-16.
- ¹⁸² Schattenberg JM, Schuppan D. Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(6):479-88.
- ¹⁸³ Schuppan D, Gorrell MD, Klein T, Mark M, Afdhal NH. The challenge of developing novel pharmacological therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2010;30(6):795-808.
- ¹⁸⁴ Georgescu EF, Ionescu R, Georgescu M, Mogoanta L, Vancica L. Angiotensin-receptor blockers as therapy for mild-to-moderate hypertension-associated non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2009;15(8):942-54.
- ¹⁸⁵ Fujita K, Yoneda M, Wada K, Mawatari H, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Maeyama S, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Nakajima A.

Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, controls progress of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2007;52(12):3455-64.

¹⁸⁶ Jin H, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Telmisartan prevents hepatic fibrosis and enzyme-altered lesions in liver cirrhosis rat induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(4):801-7.

¹⁸⁷ Torres DM, Jones FJ, Shaw JC, Williams CD, Ward JA, Harrison SA. Rosiglitazone versus rosiglitazone and metformin versus rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in humans: A 12-month randomized, prospective, open-label trial. *Hepatology*. 2011;54(5):1631-9.

¹⁸⁸ Nakagami H, Kiomy Osako M, Nakagami F, Shimosato T, Minobe N, Moritani T, Shimamura M, Miyake T, Shimizu H, Takeya Y, Morishita R. Prevention and regression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in a rat model by metabosartan, telmisartan. *Int J Mol Med*. 2010;26(4):477-81.

¹⁸⁹ Sturzeneker MC, Ioshii SO, Villela Baroncini LA, Précoma DB. Olmesartan severely weakened the development of NASH in an animal model of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):97-102.

¹⁹⁰ Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y, Aihara Y, Namisaki T, Yoshii J, Yanase K, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(6):G1094-104.

-
- ¹⁹¹ Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(1):23-8.
- ¹⁹² de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, Silva LS, de Campos Mazo DF, Lima VM, Furuya CK, Mello ES, Souza FG, Rabello F, Santos TE, Nogueira MA, Caldwell SH, Alves VA, Carrilho FJ. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2008;38(2):159-65.
- ¹⁹³ Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M, Yilmaz F, Batur Y, Yilmaz C, Akarca U. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(1):18-23.
- ¹⁹⁴ Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, Scheimann AO, Sanyal AJ, Chalasani N, Tonascia J, Ünalp A, Clark JM, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA.* 2011;305(16):1659-68.
- ¹⁹⁵ Haukeland JW, Konopski Z, Eggesbø HB, von Volkmann HL, Raschpichler G, Bjørø K, Haaland T, Løberg EM, Birkeland K. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(7):853-60.

¹⁹⁶ Garinis GA, Fruci B, Mazza A, De Siena M, Abenavoli S, Gulletta E, Ventura V, Greco M, Abenavoli L, Belfiore A. Metformin versus dietary treatment in nonalcoholic hepatic steatosis: a randomized study. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(8):1255-64.

¹⁹⁷ Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Clore J, Mills AS. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(12):1107-15.

¹⁹⁸ Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;39(1):188-96.

¹⁹⁹ Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006;355(22):2297-307.

²⁰⁰ Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, Austin AS, Freeman JG, Morgan L, Webber J. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1176-84.

²⁰¹ Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J,

Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-85.

²⁰² Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, Charlotte F, Hartemann-Heurtier A, Serfaty L, Podevin P, Lacorte JM, Bernhardt C, Bruckert E, Grimaldi A, Poynard T; LIDO Study Group. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology*. 2008;135(1):100-10.

²⁰³ Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, Bektas M, Doganay B, Sayki M, Coban S, Erden E, Soykan I, Emral R, Uysal AR, Ozden A. Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(2):200-8.

²⁰⁴ Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T; LIDO Study Group. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology*. 2010;51(2):445-53.

²⁰⁵ Pais R, Moraru I, Ratziu V. Glitazones for human nonalcoholic steatohepatitis. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011;4(5):325-34.

²⁰⁶ Ratziu V, Pienar L. Pharmacological therapy for non-alcoholic steatohepatitis: How efficient are thiazolidinediones? *Hepatol Res*. 2011;41(7):687-95.

-
- ²⁰⁷ Mahady SE, Webster AC, Walker S, Sanyal A, George J. The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - A systematic review and meta analysis. *J Hepatol*. 2011;55(6):1383-90.
- ²⁰⁸ Nelson A, Torres DM, Morgan AE, Fincke C, Harrison SA. A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(10):990-4.
- ²⁰⁹ Hyogo H, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, Ishitobi T, Nonaka M, Chayama K. Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia. *Metabolism*. 2008;57(12):1711-8.
- ²¹⁰ Kimura Y, Hyogo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Ishitobi T, Nabeshima Y, Arihiro K, Chayama K. Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation endproducts (AGEs) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients with dyslipidemia: clinical usefulness of AGEs as a biomarker for the attenuation of NASH. *J Gastroenterol*. 2010;45(7):750-7.
- ²¹¹ Hyogo H, Ikegami T, Tokushige K, Hashimoto E, Inui K, Matsuzaki Y, Tokumo H, Hino F, Tazuma S. Efficacy of pitavastatin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with dyslipidemia: An open-label, pilot study. *Hepatol Res*. 2011;41(11):1057-1065.
- ²¹² Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2011;46(1):101-7.

²¹³ Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Endo H, Takahashi H, Hosono K, Suzuki K, Mawatari H, Kirikoshi H, Inamori M, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Kubota K, Maeyama S, Nakajima A. Efficacy of ezetimibe for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: An open-label, pilot study. *Hepatol Res.* 2010;40(6):613-21.

²¹⁴ Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colan P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology.* 2004;39(3):770-8.

²¹⁵ Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ, Bihl F, Cerny A, Cereda JM, Zala JF, Helbling B, Steuerwald M, Zimmermann A; Swiss Association for the Study of the Liver. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(12):1537-43.

²¹⁶ Ratziu V, de Ledinghen V, Oberti F, Mathurin P, Wartelle-Bladou C, Renou C, Sogni P, Maynard M, Larrey D, Serfaty L, Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Rivière M, Spénard J; FRESGUN. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2011;54(5):1011-9.

²¹⁷ Leuschner UF, Lindenthal B, Herrmann G, Arnold JC, Rössle M, Cordes HJ, Zeuzem S, Hein J, Berg T; NASH Study Group. High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology.* 2010;52(2):472-9.

-
- ²¹⁸ Buko VU, Kuzmitskaya-Nikolaeva IA, Naruta EE, Lukivskaya OY, Kirko SN, Tauschel HD. Ursodeoxycholic acid dose-dependently improves liver injury in rats fed a methionine- and choline-deficient diet. *Hepatol Res*. 2011;41(7):647-59.
- ²¹⁹ Van Wagner LB, Koppe SW, Brunt EM, Gottstein J, Gardikiotes K, Green RM, Rinella ME. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Ann Hepatol*. 2011;10(3):277-86.
- ²²⁰ Zein CO, Yerian LM, Gogate P, Lopez R, Kirwan JP, Feldstein AE, McCullough AJ. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *Hepatology*. 2011;54(5):1610-9.
- ²²¹ Li W, Zheng L, Sheng C, Cheng X, Qing L, Qu S. Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*. 2011;10:49.
- ²²² Witek RP, Stone WC, Karaca FG, Syn WK, Pereira TA, Agboola KM, Omenetti A, Jung Y, Teaberry V, Choi SS, Guy CD, Pollard J, Charlton P, Diehl AM. Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(5):1421-30.
- ²²³ Ratziu V, Sheikh MY, Sanyal AJ, Lim JK, Conjeevaram H, Chalasani N, Abdelmalek M, Bakken A, Renou C, Palmer M, Levine RA, Bhandari BR, Cornpropst M, Liang W, King B, Mondou E, Rousseau FS, McHutchison J, Chojkier M. A Phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study of GS-9450 in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011; *in press*

²²⁴ Vizzutti F, Provenzano A, Galastri S, Milani S, Delogu W, Novo E, Caligiuri A, Zamara E, Arena U, Laffi G, Parola M, Pinzani M, Marra F. Curcumin limits the fibrogenic evolution of experimental steatohepatitis. *Lab Invest.* 2010;90(1):104-15.

²²⁵ Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Mesa MD, Granados S, Gil A, Quiles JL. Curcumin ameliorates rabbits's steatohepatitis via respiratory chain, oxidative stress, and TNF-alpha. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(7):924-31.

²²⁶ Tang Y, Zheng S, Chen A. Curcumin eliminates leptin's effects on hepatic stellate cell activation via interrupting leptin signaling. *Endocrinology.* 2009;150(7):3011-20.

²²⁷ Kang Q, Chen A. Curcumin eliminates oxidized LDL roles in activating hepatic stellate cells by suppressing gene expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Lab Invest.* 2009;89(11):1275-90.

²²⁸ Lin J, Chen A. Curcumin diminishes the impacts of hyperglycemia on the activation of hepatic stellate cells by suppressing membrane translocation and gene expression of glucose transporter-2. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;333(2):160-71.

²²⁹ Lin J, Zheng S, Chen A. Curcumin attenuates the effects of insulin on stimulating hepatic stellate cell activation by interrupting insulin signaling and attenuating oxidative stress. *Lab Invest.* 2009;89(12):1397-409.

²³⁰ Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, Kaji K, Shirai Y, Aihara Y, Yamazaki M, Namisaki T, Kitade M, Yoshii J, Yanase K, Kawaratani H, Tsujimoto T, Fukui H.

Selective aldosterone blocker ameliorates the progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Int J Mol Med*. 2010;26(3):407-13.

²³¹ Nakagami H, Shimamura M, Miyake T, Shimosato T, Minobe N, Moritani T, Kiomy Osako M, Nakagami F, Koriyama H, Kyutoku M, Shimizu H, Katsuya T, Morishita R. Nifedipine prevents hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis model induced by an L-methionine-and choline-deficient diet. *Mol Med Report*. 2011; *in press*.

²³² Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, González-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med*. 2010;88(4):401-11.

²³³ Simplicio FI, Seabra AB, de Souza GFP, de Oliveira MG. In Vitro Inhibition of Linoleic Acid Peroxidation by Primary S-Nitrosothiols. *J Braz Chem Soc*. 2010;10(21):1885-95.

²³⁴ Stefano JT, Cogliati B, Oliveira FS, Lima VR, Mazo DFC, Matte U, Alvares-da-Silva MR, Silveira TR, Carrilho FJ, Oliveira CPMS. S-nitroso-N-acetylcysteine induces de-differentiation of activated hepatic stellate cells and promotes antifibrotic effects in vitro. *Nitric Oxide*. 2011;25(3):360-5.

²³⁵ Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865-73.

²³⁶ Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):511-31.