

Mário Claudio Soares Sturzeneker

AÇÃO DA OLMESARTANA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim
Précoma**

CURITIBA
2011

Mário Claudio Soares Sturzeneker

AÇÃO DA OLMESARTANA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim
Précoma**

CURITIBA
2011

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Sturzeneker, Mário Claudio Soares
S936a Ação da olmesartana em modelo experimental de doença hepática
2011 gordurosa não alcoólica / Mário Claudio Soares Sturzeneker ; orientador,
Dalton Bertolim Précoma. – 2011.
89 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2011
Bibliografia: f. 53-63

1. Fígado – Doenças. 2. Hepatite. 3. Medicamentos. I. Précoma, Dalton
Bertolim. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Cirurgia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 76

Aos quatorze dias do mês de julho de 2011, realizou-se a sessão de defesa de dissertação “AÇÃO DA OLMESARTANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA” Área de Concentração: Lesão Celular, Reparação e Cicatrização, apresentada por **Mario Claudio Soares Sturzeneker** sob orientação do **Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma**.

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn	
Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii	
Prof. Dr. Iran Castro	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Carlos Alberto Engelhorn Avaliação: Aprovado
Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii Avaliação: Aprovado
Prof. Dr. Iran Castro Avaliação: Aprovado
Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Devido a perfeita defesa foi realizado o
je para obter o título de mestre

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Mário Sturzeneker e Raimunda Soares Sturzeneker (in memoriam), pelos esforços despendidos em prol da minha educação.

A minha esposa Cláudia, pelo apoio incondicional às minhas buscas pela evolução técnica e humana indispensáveis para o crescimento profissional.

As minhas filhas Mariana e Sofia que me transformam em criança quando chego em casa ao final de cada jornada de trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida com capacidade plena e pelas oportunidades proporcionadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma, que abriu as portas para minha entrada na Pós-Graduação da PUCPR, pela amizade, apoio, incentivo e principalmente pela transmissão de parte de seu grande conhecimento.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, pela análise histológica deste experimento.

A Dra. Liz Andrea Villela Baroncini, pela grande ajuda na redação do artigo.

A Prof.^a Dra. Márcia Olandoski, pela análise estatística integral deste estudo.

A Prof.^a Dra. Lúcia de Noronha, pela contribuição na análise histológica deste estudo.

Ao Dr. Ruy Fernando Caetano da Silva, que com sua habilidade técnica facilitou a realização da fase cirúrgica desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alexandre Alessi, por me incentivar a iniciar o curso de pós-graduação.

A Dra. Camila Prim Rodrigues, pela sua contribuição nas fases iniciais do projeto deste estudo.

Ao Dr. João Carlos Repka, por permitir a utilização de seu laboratório.

A Dra. Gislaine Custódio do laboratório LABAC, pelas análises bioquímicas deste experimento.

A Dra. Amanda Roderjan e a farmácia de manipulação Amanda Manipulações Farmacêuticas, pela preparação da olmesartana.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
SUMMARY.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
2 LITERATURA.....	3
2.1 PREVALÊNCIA DA DHGNA.....	3
2.2 HISTÓRIA NATURAL DA DHGNA.....	4
2.3 FISIOPATOGENIA.....	5
2.3.1 Resistência Insulínica.....	5
2.3.2 Estresse Oxidativo.....	8
2.3.3 Fibrogênese.....	9
2.4 DHGNA E SÍNDROME METABÓLICA.....	11
2.5 DHGNA E DOENÇA CARDIOVASCULAR.....	14
2.6 ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA DHGNA.....	16
2.7 TRATAMENTO DA DHGNA.....	17
2.8 SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA E DHGNA.....	21
2.9 OLMESARTANA MEDOXOMILA.....	23
3 MÉTODOS.....	25
3.1 AMOSTRA.....	25
3.2 PROCEDIMENTOS.....	25
3.2.1 Ambiente de Experimentação.....	25
3.2.2 Preparo da Ração Suplementar.....	26
3.2.3 Preparo da Medicação.....	26
3.2.4 Administração da Medicação.....	26

3.2.5 Anestesia.....	27
3.2.6 Coleta de Amostras de Sangue.....	28
3.2.7 Remoção de segmentos hepáticos.....	28
3.2.8 Avaliação Histológica.....	29
3.2.9 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	32
4.1 PESOS DOS COELHOS.....	32
4.2 GLICEMIA.....	33
4.3 NÍVEIS DE AMINOTRANSFERASES.....	34
4.4 NÍVEIS DE URÉIA E CREATININA.....	36
4.5 NÍVEIS LIPÍDICOS.....	37
4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	38
4.6.1 Esteatose.....	38
4.6.2 Fibrose.....	41
4.6.3 Inflamação Lobular.....	43
4.6.4 Balonização de hepatócitos.....	45
4.6.5 Escore de Atividade da NAFLD.....	46
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÃO.....	52
7 REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO.....	64
PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À DISSERTAÇÃO.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistema de escore para a avaliação histológica DHGNA.....	30
Tabela 2- Pesos dos animais (gramas) no início do estudo e na 4ª semana.....	32
Tabela 3- Pesos, em gramas, do G1 e G2, no início do estudo e na eutanásia....	33
Tabela 4- Glicemia (mg/dl) dos 3 grupos no início do estudo e na eutanásia.....	34
Tabela 5- Níveis de AST (U/L) dos 3 grupos no início do estudo e na eutanásia.	35
Tabela 6- Comparação entre 2 grupos quanto aos níveis de AST na eutanásia, diferença eutanásia e início do estudo e variação %.....	35
Tabela 7- Comparação entre o início do estudo e a eutanásia, em cada grupo, quanto aos níveis de AST.....	36
Tabela 8- Níveis de uréia (mg/dl), G1 e G2, no início do estudo e na eutanásia..	37
Tabela 9- Níveis de colesterol total (mg/dl), G1 e G2, no início e no final do Estudo.....	37
Tabela 10- Níveis de triglicerídeos (mg/dL), G1 e G2, início e final do estudo.....	38
Tabela 11- Escore de esteatose nos três grupos.....	38
Tabela 12- Comparação entre os 3 grupos quanto ao escore de esteatose.....	40
Tabela 13- Comparação entre 2 grupos quanto ao escore de esteatose.....	41
Tabela 14- Escore de fibrose nos 3 grupos.....	41
Tabela 15- Comparação entre 2 grupos quanto ao escore de fibrose.....	43
Tabela 16- Escore de inflamação lobular nos 3 grupos.....	44
Tabela 17- Comparação entre 2 grupos quanto a inflamação lobular.....	44
Tabela 18- Escore de balonização de hepatócitos nos 3 grupos.....	45
Tabela 19- Escore de atividade da NAFLD (NAS) nos 3 grupos.....	46
Tabela 20- Comparação entre os 3 grupos quanto ao NAS.....	47
Tabela 21- Comparação entre 2 grupos quanto ao NAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural da olmesartana medoxomila e olmesartana.....	23
Figura 2- Administração da medicação por gavagem oral.....	27
Figura 3- Coleta de amostra de sangue mediante punção intracardíaca.....	28
Figura 4- Exteriorização do fígado para remoção dos segmentos lobares.....	29
Figura 5- Comportamento do peso, G1 e G2, até a 8ª semana.....	33
Figura 6- Esteatose escore 1 em coelho do G2 (HE - 400X).....	39
Figura 7- Esteatose escore 3 em coelho do G1, grupo controle (HE - 400 X).....	40
Figura 8- Fibrose escore 1 em coelho do G1 (Tricrômio de Gomori - 400 X).....	42
Figura 9- Ausência de fibrose em coelho do G2 (HE - 400X).....	43
Figura10- Foco de inflamação lobular em coelho do G1 (HE - 400 X).....	45
Figura 11- Balonização escore 1 em coelho do G2 (HE - 200X).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG.....	ácidos graxos
ALT.....	alanino aminotransferase
ANG 2.....	angiotensina 2
AST.....	aspartato aminotransferase
DM tipo 2.....	diabetes mellitus tipo 2
DNA.....	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EAD.....	escore de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica
ECM.....	<i>extracellular matrix</i> (proteínas de matriz extracelular)
HOMA.....	<i>homeostasis model assessment</i>
HSC.....	<i>hepatic stellate cells</i> (células estelares hepáticas)
LHS.....	lipase hormoniossensível
IL-6.....	interleucina-6
IMC.....	Índice de massa corporal
IRS-1.....	<i>insulin receptor substrate-1</i>
IRS-2.....	<i>insulin receptor substrate-2</i>
JNK1.....	proteína quinase N-terminal c-Jun
LDL.....	<i>Low-density lipoprotein</i>
LLP.....	lipase lipoproteica
MDA.....	malondialdeido
MMP.....	<i>matrix metalloproteinases</i> (metaloproteinases de matrix)
NHANES.....	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>

NCEP ATP III.....*Third Report of the National Cholesterol Education Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults - Adult Treatment Panel III*

PGDF.....*platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado das plaquetas)

PKC-epsilon.....*Protein kinase C-epsilon* (proteína quinase C-épsilon)

RI.....resistência insulínica

ROS.....*reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

SM.....síndrome metabólica

TG.....triglicerídeos

TGF- β 1.....*transforming growth factor beta 1* (fator transformador de crescimento beta 1)

TIMP1.....*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz-1)

TNF- α*tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

4-HNE.....4-hidroxinonenal

RESUMO

Introdução: a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracteriza-se por um amplo espectro de danos hepáticos que varia desde esteatose isolada a esteatohepatite (EHNA), fibrose avançada e cirrose. É altamente prevalente na população adulta de países desenvolvidos e tem sido relacionada significativamente com o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. Embora em muitos estudos, vários fármacos tenham sido testados como opções terapêuticas potenciais para a DHGNA, seu tratamento medicamentoso permanece indeterminado. **Objetivo:** avaliar se a olmesartana possui ação preventiva na DHGNA, induzida em coelhos por meio de dieta hipercolesterolêmica. **Métodos:** foram utilizados 34 coelhos machos, albinos com idade média de 111 dias e peso médio de 2.864,51 gramas divididos em 3 grupos. Grupo 1 (G1), n=13; grupo 2 (G2), n=12 e grupo 3 (G3) n=9. O G1 ou grupo controle recebeu ração padrão para coelhos de laboratório acrescida de colesterol a 1% em todo o período do estudo (8 semanas). O G2 ou grupo olmesartana, recebeu também a ração padrão acrescida da colesterol a 1% e a olmesartana 1 mg/kg em dose única diária em todo o período do estudo. Os grupos G1 e G2 foram submetidos a eutanásia no final de 8 semanas. O G3 ou grupo normal recebeu ração padrão para coelhos de laboratório e foi submetido a eutanásia em 4 semanas. Os 03 grupos receberam água e ração de forma *ad libitum*. Coletado amostras de sangue antes de iniciar a dieta e na eutanásia para a avaliação dos níveis séricos de glicose, colesterol total (CT), HDL- colesterol, triglicerídeos (TG), creatinina, uréia, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT). Retirado amostras de tecido hepático, na eutanásia, para avaliação histológica. Foram confeccionadas 3 lâminas para cada coelho, sendo uma lâmina corada por hematoxilina–eosina e as outras duas por ácido periódico de Schiff e tricrômio de Gomori. Avaliou-se a esteatose, a inflamação lobular, a balonização de hepatócitos e a fibrose conforme o sistema de escore para a avaliação histológica da DHGNA. **Resultados:** os níveis séricos de CT e TG foram significativamente mais elevados no final do estudo tanto no G1 como no G2, porém sem diferença significativa entre os dois grupos. Houve elevação significativa dos níveis de AST no final do estudo no G1 e G2, sendo a mesma significativamente maior no G1. Os níveis de ALT foram semelhantes no G1 e no G2. A esteatose ocorreu no G1 e no G2, entretanto, o escore de esteatose foi significativamente maior no G1 ($p<0.013$). Não houve esteatose no G3. A inflamação lobular ocorreu em 84,6% do G1 e não foi observada no G2 ($p<0,001$). A balonização de hepatócitos ocorreu de forma semelhante nos 3 grupos. A fibrose perisinusoidal ou periportal ocorreu em 46.2% do G1 e não foi observada no G2 ($p=0,015$). Não houve fibrose ou inflamação lobular no G3. Comparado ao G2, o escore de atividade da DHGNA foi significativamente mais elevado no G1 ($P<0.001$). **Conclusão:** no modelo utilizado a olmesartana atenuou a esteatose, preveniu a inflamação lobular e a fibrose hepática e, baseado no escore de atividade da DHGNA, preveniu o desenvolvimento de EHNA.

SUMMARY

Introducion: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by a broad spectrum of liver damage ranging from steatosis alone to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), advanced fibrosis and cirrhosis. It is highly prevalent in adult population of developed countries and has been correlated significantly with increases in mortality from cardiovascular diseases. Although in many studies, several drugs have been tested as potential therapeutic options for NAFLD, its pharmacological treatment remains undetermined. **Objective:** To assess the potential preventive action of olmesartan on NAFLD in hypercholesterolemic rabbits. **Methods:** thirty-four white adult male rabbits (New Zealand), with a mean age of 111 days and average weight of 2864.51 grams, were selected for this study and divided into three groups. group I (GI), control group, 13 rabbits; group II (GII), olmesartan group, 12 rabbits; and group III (GIII), normal group, 9 rabbits. During the 8 weeks study, the animals from GI and GII were fed a specific diet plus 1% cholesterol. For the GII diet, 1mg/kg/day of olmesartan was administered by oral gavage from day 1 through day 56. On day 56, the animals from GI and GII were submitted to liver resection. Animals from GIII were fed only a specific diet and were submitted to liver resection on day 28. Blood samples were obtained on the first day of the experiment and also immediately before sacrifice. Clinical laboratory assessment included serum glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides(TGC), creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). The liver segments were removed and three slices were prepared, one slice was stained with hematoxylin and eosin and two slices were stained with periodic acid Schiff and Gomori's trichrome. The slices were analyzed for steatosis, lobe inflammation, hepatic cell balonization, and fibrosis status according to the histological score system for NAFLD. **Results:** graded elevations in TC and TGC levels were observed from the initial phase until sacrifice without significant differences between GI and GII. Graded elevations in AST levels were observed from the initial phase until sacrifice in GI and GII. However, in GI the difference between initial phase and sacrifice and the percentage variation of levels of AST were higher than in GII. Levels of ALT were similar among groups throughout the study. Steatosis was present in all animals from GI and GII; had no steatosis in animals from GIII. When GI and GII were compared, the steatosis score was significantly higher in GI ($p<0.013$). Lobular inflammation occurred in 84.6% of the animals from GI. Animals from GII had no lobular inflammation ($p<0,001$). Hepatic cell balonization occurred in all animals, without significant differences among GI, GII, and GIII. Perisinusoidal and periportal fibrosis occurred in 46.2% of the animals from GI. There was no fibrosis in GII ($p=0,015$). There was no fibrosis and had no lobular inflammation in GIII. The NAFLD activity score was significantly higher in animals from GI when compared to animals from GII ($p< 0.001$). **Conclusion:** In this model, olmesartan significantly attenuated hepatic steatosis, prevented the development of lobular inflammation and liver fibrosis. Based on the NAFLD activity score, olmesartan significantly prevented the development of NASH.

1 INTRODUÇÃO

A associação de esteatose hepática com processo inflamatório e fibrose em pacientes obesos, apesar de conhecida, foi largamente ignorada como entidade clínica distinta. O termo esteatohepatite não alcoólica (EHNA), introduzido inicialmente por Ludwig e colaboradores em 1980 (citado por Duvnjak) tem sido utilizado para denominar achados de biópsia indistinguíveis da hepatite alcoólica em pacientes sem histórico de consumo significativo de bebidas alcoólicas¹. Em revisão publicada em 2002, Paul Angulo citou que a denominação doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) estava se tornando preferencial². Nos últimos anos tal denominação tem sido amplamente utilizada para essa doença.

A DHGNA caracteriza-se por um amplo espectro de danos hepáticos que varia desde esteatose isolada a esteatohepatite, fibrose avançada e cirrose. Pode afetar pessoas de qualquer faixa etária e tem sido descrita na maioria dos grupos raciais². Geralmente assintomática, com indicativos na literatura de que seja altamente prevalente na população adulta de países desenvolvidos, tem sido associada de forma significativa à doenças cardiovasculares.

O tratamento farmacológico da DHGNA permanece indeterminado. As conclusões de meta-análises de estudos de terapêutica envolvendo as classes mais promissoras de fármacos como os antioxidantes³, ácidos biliares⁴ e sensibilizadores da insulina⁵, não dão suporte para que nenhuma delas seja recomendada como tratamento.

Embora a resistência insulínica (RI) seja apontada com a causa mais provável da DHGNA sua fisiopatogenia não esta adequadamente esclarecida. Resultados de experimentos sugerem que a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) tem relação significativa com a fisiopatogenia da DHGNA⁶⁻⁸ e o bloqueio desse sistema em modelos experimentais^{9,10} e estudos clínicos¹¹ tem sido associado à melhora da RI, amplamente relacionada ao acúmulo lipídico intra-hepatocitário. Em modelos animais o bloqueio do SRA relacionou-

se significativamente à redução da concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas¹² e do conteúdo hepático de triglicerídeos^{13,14}.

As ações potencialmente deletérias do SRA são mediadas pela angiotensina 2 (ANG2), seu principal peptídeo efetor, via receptor AT1¹⁵. A olmesartana medoxomila, o mais novo inibidor do receptor AT1 disponível comercialmente que assim como os outros representantes dessa classe é indicada para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS), melhorou significativamente a RI e a esteatose hepática em ratos Zucker obesos submetidos à dieta hiperlipídica¹⁶. Em modelo animal de obesidade e diabetes (ratos) a olmesartana preveniu a esteatose e a fibrose hepática¹⁷ e em modelo animal de EHNA atenuou significativamente a esteatose e a fibrose hepática¹⁸.

Modelos animais com diferentes formas de indução de DHGNA tem sido propostos e o rato é o animal utilizado na grande maioria dos estudos. Até o momento, poucos estudos usaram o coelho em modelo de DHGNA e a olmesartana não havia sido utilizada, em coelhos, nesse contexto.

1.1 OBJETIVO

Avaliar se a olmesartana possui ação preventiva na DHGNA induzida em coelhos por meio de dieta hipercolesterolêmica.

2 LITERATURA

2.1 PREVALÊNCIA DA DHGNA

Os dados disponíveis na literatura a respeito da prevalência da DHGNA na população geral têm ampla variação, sendo provável que os diferentes hábitos de vida das populações avaliadas, os critérios de seleção das amostras e os métodos utilizados para o diagnóstico tenham influenciado tais resultados. Publicação recente mostrou diferença significativa na prevalência da DHGNA (diagnóstico ultrassonográfico) entre a população rural e urbana de uma mesma região da China (11,1 e 20,3%)¹⁹. Estudos realizados anteriormente em área urbana do Japão e área rural de Taiwan, que incluíram respectivamente indivíduos de meia idade e adultos e utilizaram também o ultrassom como método diagnóstico, mostraram prevalência de 29% e 11,5%^{20,21}. *Dionysos Nutrition and Liver Study* realizado em um município do norte da Itália, no qual 98% dos participantes eram brancos, estimou a prevalência na população geral adulta entre 20 e 25%²². No entanto, estudo que avaliou todos os participantes do *Dallas Heart Study* submetidos à espectroscopia de prótons por ressonância magnética como método de avaliação do conteúdo hepático de triglicerídeos, mostrou diferença significativa na prevalência da esteatose hepática entre os principais grupos raciais dos Estados Unidos: 45% em hispânicos, 33% em brancos e 24% em negros²³. Contudo, limitações importantes como a não exclusão adequada de outras etiologias como a viral e a alcoólica dificultam a correlação desses achados com a DHGNA.

A verdadeira prevalência da DHGNA permanece indeterminada²⁴, estima-se que nos países desenvolvidos, em adultos, a mesma possa variar entre 20 e 30 %^{22,23,25} e no caso específico da EHNA entre 2 e 3%²⁶. Nos Estados Unidos a DHGNA pode acometer até 01 em cada 03 adultos e 01 em cada 10 crianças ou adolescentes²⁴. Obesidade, diabetes mellitus (DM) tipo 2 e dislipidemia são condições frequentemente associadas e consideradas fatores de risco para a DHGNA. A prevalência de obesidade relatada em várias séries

de pacientes com DHGNA varia entre 30 e 100 %, de diabetes mellitus tipo 2 entre 10 e 75% e de dislipidemia entre 20 e 92%². A adiposidade central, mesmo na ausência de obesidade definida pelo IMC, parece ser um importante fator de risco para a presença de resistência insulínica²⁷ e de DHGNA². Independente do índice de massa corporal, a presença de DM tipo 2 aumenta significativamente o risco e a gravidade da DHGNA². A doença hepática gordurosa não alcoólica tem sido descrita como a causa mais comum de provas hepáticas anormais entre adultos²³ e pode ser a forma mais comum de doença hepática crônica nos Estados Unidos^{25,28}. Sua prevalência vem aumentando nos países desenvolvidos⁵ paralelamente com a prevalência de obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2²⁹. O mesmo comportamento tem sido observado em países asiáticos³⁰ nos quais a população é considerada de baixo risco²⁹.

2.2 HISTÓRIA NATURAL DA DHGNA

A esteatose isolada pode ter um curso clínico benigno, porém 10 a 20% dos portadores de DHGNA podem desenvolver EHNA³¹, 15% e 12% dos portadores de EHNA podem, respectivamente, desenvolver cirrose²⁶ e evoluir para óbito relacionado a complicações hepáticas³¹. Alguns estudos têm sugerido que a EHNA não reconhecida previamente poderia ser a causa da cirrose criptogênica⁵ e como observado na fase cirrótica de outras patologias, os portadores de estágio cirrótico da EHNA podem desenvolver carcinoma hepatocelular²⁴. Estudos de prognóstico tem demonstrado que as complicações relacionadas ao fígado são a 3ª causa de mortalidade em portadores de DHGNA^{24,32,33}. A doença cardiovascular foi a principal causa de mortalidade em dois desses estudos, seguida dos cânceres extra-hepáticos^{32,33}. As mortes relacionadas ao fígado ocorreram em portadores de estagio mais avançado da doença em um desses estudos de prognóstico²⁴. Tem sido relatado que 9 a 26% dos pacientes em estágio cirrótico da EHNA falecem de causas relacionadas ao estágio final da doença em 4 a 10 anos²⁴. Em estudo prospectivo que incluiu pacientes na fase cirrótica da EHNA e da hepatite C, a

insuficiência hepática foi a causa mais comum de morbidade e mortalidade nos portadores de EHNA e o prognóstico foi similar nos dois grupos³⁴.

2.3 FISIOPATOGENIA

A fisiopatogenia da DHGNA é classicamente resumida em duas etapas denominadas *hits*, a primeira constituída pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, o que desencadeia todo o processo patológico que caracteriza essa doença e a segunda pelo processo de lesão hepatocelular relacionada ao estresse oxidativo, à peroxidação lipídica e ao processo inflamatória que culminam com a morte celular e substituição fibrótica. Entre outras questões, permanecem sem a elucidação adequada a determinação de qual ou quais distúrbios metabólicos ocasionariam o acúmulo lipídico no hepatócito e que fatores determinariam a evolução para esteatohepatite e cirrose mudando o curso aparentemente benigno da esteatose isolada. A resistência insulínica frequentemente associada à DHGNA é apontada como a causa mais provável do acúmulo lipídico nos hepatócitos e embora o estresse oxidativo seja amplamente citado como o provável desencadeador da lesão hepatocelular, sua correlação com o acúmulo lipídico intra-hepatocitário permanece sem o entendimento adequado.

2.3.1 Resistência Insulínica

Em condições normais, após a alimentação, a lipase lipoprotéica (LLP) é ativada no tecido adiposo e inibida na musculatura esquelética e cardíaca. Através da hidrólise dos triglicerídeos (TG), principalmente dos quilomícrons onde tem ação predominante, promove a liberação de ácidos graxos (AG) que são então direcionados ao tecido adiposo para esterificação e armazenamento³⁵. A insulina parece ser a maior reguladora da atividade e síntese da LLP no tecido adiposo³⁶, tem papel importante na esterificação de AG³⁷ e estimula a expressão gênica de enzimas lipogênicas intracelulares como acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase³⁶.

A lipase hormoniossensível (LHS) é a enzima chave para a mobilização dos AG do tecido adiposo, sendo sua atividade mediada por fosforilação reversível³⁸. Basicamente a lipólise do tecido adiposo depende da ativação da LHS por meio de sua fosforilação. No período de jejum ocorre o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos provenientes dos triglicerídeos contidos nos adipócitos, mais provavelmente devido a redução dos níveis séricos de insulina³⁹. Após a alimentação, com a elevação fisiológica da insulinemia, ocorre a inibição da fosforilação e conseqüentemente o bloqueio da ativação da LHS^{36,38}. A insulina é considerada uma potente supressora da lipólise³⁷ e o mais importante hormônio antilipolítico³⁸.

Na presença de resistência insulínica (RI), no período pós-prandial, ocorre diminuição da lipólise dos TG contidos nos quilomícrons e inefetiva inibição da lipólise dos triglicerídeos no tecido adiposo devido a ausência de ativação e inibição adequada da LLP e da LHS respectivamente⁴⁰. Como conseqüência, na presença de RI ocorre no período pós-alimentar uma situação semelhante a do período de jejum sob condições normais³⁶, que propiciaria o aumento dos níveis circulantes de lipoproteínas remanescentes ricas em TG e de AG livres e conseqüentemente o incremento do influxo hepático de lipídeos. A concentração sérica de AG está relacionada diretamente com o influxo hepático, sugerindo mecanismo concentração dependente, particularmente para os AG de cadeia pequena e média⁴¹.

Revisão recente apresenta dados sugestivos de que o aumento do influxo de AG nos hepatócitos pode levar a RI hepática. Embora exista uma correlação clara entre o conteúdo intracelular de TG e RI hepática, qual ou quais seriam os metabólitos lipídicos que ocasionariam a RI é uma questão que permanece não esclarecida⁴⁰. Estudo que utilizou modelo animal de DHGNA sem RI periférica (ratos) mostrou que o aumento do conteúdo lipídico dos hepatócitos poderia levar a RI hepática, independente da presença de RI periférica, provavelmente através da ativação da proteína quinase C-épsilon (PKC-epsilon-*Protein kinase C-epsilon*) e ou da proteína quinase N-terminal c-Jun (JNK1-c-Jun *N-terminal protein kinase*), possivelmente devido a fosforilação serínica dos substratos para o receptor da insulina *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) e *insulin receptor substrate-2* (IRS-2). Conseqüentemente ocorre a limitação da atividade da enzima glicogênio sintase estimulada pela

insulina e adicionalmente o acúmulo lipídico estimula a gliconeogênese e aumenta a contribuição da mesma para a taxa total de produção endógena de glicose⁴². Utilizando o mesmo modelo animal, outro estudo mostrou que a inibição da PKC-epsilon reverte a resistência insulínica relacionada a esteatose, sugerindo que a mesma possui papel importante na gênese da RI hepática mediada pelo acúmulo lipídico⁴³.

A relação entre o acúmulo lipídico no hepatócito e o desenvolvimento de RI hepática tem sido relatada também em estudos que utilizaram outros modelos de DHGNA. Um deles mostrou o aumento do conteúdo intra-hepatocitário de triglicerídeos e a presença de RI hepática provavelmente associada a ativação da PQC-épsilon, em ratos com expressão aumentada de *glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase-1* (Ad-GPAT1), enzima envolvida na síntese de TG⁴⁴. Tal relação também foi demonstrada em ratos com expressão aumentada da LLP hepática⁴⁵. No entanto, estudo que também utilizou ratos transgênicos, nesse caso com expressão hepática aumentada de *acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2* (DGAT2), enzima envolvida na fase final da síntese de TG, mostrou que tais animais desenvolveram esteatose hepática sem RI e portanto ao contrário dos estudos citados anteriormente o aumento do conteúdo intra-hepatocitário de TG não levou ao desenvolvimento de RI⁴⁶.

A obesidade é a causa mais comum de RI e o maior fator de risco para o desenvolvimento de DM tipo 2⁴⁰. Associa-se a resposta inflamatória crônica caracterizada por produção anormal de citocinas, aumento dos reagentes da fase aguda e ativação das vias de sinalização inflamatória⁴⁷. O aumento significativo do número de macrófagos no tecido adiposo relacionados a obesidade tem sido descrito em ratos^{48,49} e humanos⁴⁸. Achados de modelos experimentais sugerem que os macrófagos presentes no tecido adiposo são responsáveis pela maior parte da expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α -*tumor necrosis factor alpha*) e parte significativa da expressão de interleucina-6 (IL-6)⁴⁸, e que a atividade dos macrófagos ocorre após o aumento da adiposidade e precede a hiperinsulinemia usada como parâmetro de RI⁴⁹. Os resultados de um estudo que analisou o tecido subcutâneo da parede abdominal de humanos sugerem relação direta entre o conteúdo de macrófagos no tecido adiposo, o IMC e o tamanho dos adipócitos⁴⁸.

Modelos experimentais deixaram poucas dúvidas sobre o papel crítico das vias inflamatórias no mecanismo básico da RI⁴⁷. O TNF- α foi a primeira proteína pro-inflamatória relacionada a obesidade e sua expressão encontra-se aumentada no tecido adiposo de roedores⁵⁰ e humanos obesos⁵¹. Estudo utilizando ratos com mutação dos receptores do TNF- α , caracterizados pela ausência de sinalização e função dessa citocina inflamatória, mostrou IR significativamente menor nos mesmos em comparação com o grupo controle, quando submetidos à dieta para indução de obesidade⁵¹. Particularmente em modelos experimentais, parece claro que a produção aumentada de TNF- α representa uma característica importante da obesidade e contribui significativamente para o desenvolvimento de RI⁵⁰. Em humanos, estudos também sugerem a relação entre obesidade, expressão aumentada de TNF- α no tecido adiposo e RI^{52,53}.

2.3.2 Estresse Oxidativo

Como parte do processo fisiológico de degradação oxidativa de ácidos graxos livres e outras fontes de energia, espécies reativas de oxigênio (*ROS-reactive oxygen species*) são continuamente geradas e em sua maioria transformadas em água na cadeia respiratória da mitocôndria⁵⁴. Nesse processo, em torno de 90 a 95% do oxigênio é transformado em água e o restante em ROS. Entre outros organismos aeróbicos, os humanos possuem numerosos mecanismos de neutralização das ROS geradas, protegendo as células dos efeitos nocivos das mesmas⁵⁵. O estresse oxidativo ocorre quando a quantidade de ROS geradas ultrapassa a capacidade de neutralização de antioxidantes celulares enzimáticos e não enzimáticos. Pode causar lesão e morte celular como conseqüência de modificações em macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos⁵⁶. Na EHNA, como conseqüência do estresse oxidativo, pode ocorrer a peroxidação dos triglicerídeos hepáticos, liberação de aldeídos reativos como o 4-HNE e o MDA que podem danificar o DNA mitocondrial pelo qual são codificados 13 peptídeos da cadeia respiratória e agir diretamente inativando outros componentes da mesma como a enzima citocromo c oxidase. Dessa forma, as ROS e os produtos da peroxidação de

lipídeos hepáticos poderiam prejudicar o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e conseqüentemente aumentar a produção de ROS gerando um círculo vicioso⁵⁴.

Embora a mitocôndria hepática provavelmente seja a principal fonte de ROS na EHNA, a CYP2E1, enzima do citocromo P450 localizada no retículo endoplasmático, pode ser outra fonte significativa de produção de ROS, pois o aumento de sua expressão e atividade tem sido descrita nessa doença⁵⁴. Através de imunohistoquímica, foi observada a presença de indução da CYP2E1 em amostras de tecido hepático de humanos portadores de EHNA⁵⁷. Posteriormente observaram em modelo animal de EHNA (ratos submetidos à dieta deficiente em colina e metionina) além do aumento significativo da atividade da CYP2E1, um acentuado aumento de peróxidos lipídicos hepáticos. Associaram a peroxidação lipídica com o sistema microsomal hepático, principalmente com a enzima CYP2E1, sugerindo que a mesma poderia iniciar o estresse oxidativo. Contudo, submetendo ratos sem expressão de CYP2E1 à mesma dieta houve o desenvolvimento de EHNA com características similares, sugerindo que na ausência de expressão dessa enzima outra via relacionada ao sistema microsomal hepático poderia desempenhar papel semelhante⁵⁸. Estudo envolvendo humanos não obesos e não diabéticos portadores de DHGNA, utilizando a nitrotirosina (aminoácido modificado pela ação do peróxido nítrico, que é um forte oxidante resultante da interação do ânion radical superóxido com o óxido nítrico) como marcador de estresse oxidativo, associou seus níveis aumentados com a presença de DHGNA mesmo na ausência de RI, síndrome metabólica e hipoadiponectinemia. Nesse estudo o estresse oxidativo foi correlacionado com a gravidade da DHGNA independente da presença de RI⁵⁹.

2.3.3 Fibrogênese

A fibrose hepática é caracterizada por excessiva deposição de proteínas de matriz extracelular (*ECM-extracellular matrix*), especialmente colágeno alfa 1 ou tipo I⁶⁰. Sua progressão está associada a inibição da degradação da matriz extracelular devido a redução da expressão das metaloproteinases de

matriz (MMP-*matrix metalloproteinases*) e a expressão aumentada dos inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz-1 (TIMP1-*matrix metalloproteinase tissue inhibitor 1*) e ²⁶¹. As células estelares hepáticas (HSC-*hepatic stellate cells*) constituem a maior fonte de colágeno tipo I e quando ativadas se tornam as maiores produtoras de matriz extracelular⁶². Os hepatócitos lesados liberam ROS⁶², citocinas pró-fibrogênicas⁶⁰ e promovem o recrutamento e ativação de células inflamatórias sanguíneas⁶². As células de Kupffer, que possuem um papel central na reação inflamatória hepática, liberam ROS e citocinas pró-fibrogênicas como o TNF- α e o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1-*transforming growth factor beta 1*)⁶⁰. As ROS e as citocinas pró-fibrogênicas liberadas e os polimorfonucleares ou linfócitos recrutados para o sítio de lesão, ativam as HSC promovendo sua diferenciação em célula produtora de colágeno (miofibroblasto *like*)⁶². De forma semelhante os fibroblastos e as células epiteliais são também diferenciadas em células com o fenótipo dos miofibroblastos e portanto, tornam-se aptas para produzirem colágeno⁶⁰. As HSC ativadas também liberam ROS e citocinas inflamatórias, expressam moléculas de adesão celular e modulam a ativação de linfócitos estabelecendo um círculo vicioso⁶².

A depuração dos corpos apoptóticos mediante a fagocitose pode diretamente estimular a fibrogênese hepática. Os corpos apoptóticos são reconhecidos por meio de um conjunto de receptores de membrana que quando ativados podem modular a resposta inflamatória. Embora as células de Kupffer tenham papel central na fagocitose dos corpos apoptóticos, os mesmos podem ser fagocitados também pelas HSC, células epiteliais e até mesmo pelos fibroblastos, o que inicia respostas biológicas distintas inclusive a geração de citocinas⁶³.

Entre as citocinas, o TGF- β 1 parece ser o mediador chave da fibrogênese humana⁶². Liberado pelas células de Kupffer ativadas e células endoteliais sinusoidais, desencadeia a apoptose dos hepatócitos, induz a ativação e recrutamento das células inflamatórias, favorece a transição das HSC, fibroblastos e células epiteliais em miofibroblastos *like*⁶⁰, estimula a síntese e inibe a degradação de proteínas de matriz extracelular⁶². Estudo que utilizou ratos transgênicos que possibilitaram o controle da expressão de TGF- β 1, relacionou os níveis séricos elevados dessa citocina com a inibição das

MMP e a expressão aumentada do TIMP1, e demonstrou que a progressão do processo fibrótico poderia ser bloqueada através da inibição da produção de TGF- β 1⁶⁴. O fator de crescimento derivado das plaquetas (*PDGF-platelet-derived growth factor*), que tem sua atividade aumentada no fígado fibrótico, é o maior estimulador da mitose das HSC e sua inibição atenua a fibrose hepática experimental⁶². Citocinas liberadas pelo tecido adiposo, como a leptina e resistina, contribuem com a fibrose hepática através da ativação das HSC⁶² e a adiponectina, de forma oposta, inibe marcadamente a fibrogênese hepática in vitro e in vivo⁶². Citocinas com propriedades vasoativas também interferem na fibrogênese hepática, sendo as vasodilatadoras como o óxido nítrico antifibrogênicas e as vasoconstritoras como a endotelina-1 e a angiotensina 2 o oposto. Entre as citocinas com propriedades vasoativas, a angiotensina 2 parece ter maior importância na fibrogênese hepática, é expressada localmente nos processos patológicos crônicos, estimula uma série de ações fibrogênicas das HSC ativadas, incluindo proliferação e migração celular, secreção de citocinas pró-inflamatórias e síntese de colágeno⁶².

2.4 DHGNA E SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica (SM), na maioria dos casos, encontra-se intimamente ligada à RI^{64,65} e tem sido associada ao risco aumentado de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2)⁶⁶. Embora o aumento da prevalência de obesidade, que atinge proporções epidêmicas, tenha sido acompanhado pelo aumento da prevalência de SM e obesos tenham a prevalência aumentada de componentes dessa síndrome, nem todo obeso preenche os critérios para o diagnóstico e até mesmo indivíduos magros podem ter RI⁶⁷. Em análise dos dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III, 1988 a 1994 e NHANES 1999 a 2000, foi observado um aumento da prevalência da SM na população adulta dos Estados Unidos com 20 anos ou mais, particularmente entre as mulheres. Baseado nos dados do NHANES 1999 a 2000 a prevalência da SM foi de 26,7%, porém, nessa análise, foi usado o valor de corte para a intolerância à glicose de jejum de 110 mg%. Utilizando-se o valor de corte de 100 mg%,

conforme a revisão posterior desse componente da SM, a prevalência estimada de SM aumenta para 31,9%⁶⁸.

A DHGNA tem sido relacionada à SM e amplamente citada como um componente emergente da mesma. Sua associação frequente com componentes da SM como obesidade, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica é bem conhecida⁶⁹. Com o objetivo de avaliar a relação entre SM e a prevalência da DHGNA, um estudo coorte, prospectivo, observacional foi delineado pra acompanhar por um período médio de 414 dias, japoneses aparentemente saudáveis com idade entre 21 e 80 anos e média de IMC de 22,6 kg/m². A presença de SM foi definida pelo critério do *Third Report of the National Cholesterol Education Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults - Adult Treatment Panel III* (NCEP ATPIII), porém a circunferência abdominal foi substituída pelo IMC e o valor de corte foi de 25 kg/m². Na avaliação inicial de 4.401 indivíduos, 812 (18%) tiveram o diagnóstico ecocardiográfico de DHGNA e em comparação não ajustada a prevalência de SM foi aproximadamente 5 a 11 vezes maior nos portadores de DHGNA. De 3.147 participantes sem diagnóstico de DHGNA na 1ª avaliação, 308 (10%) desenvolveram a doença que foi detectada na 2ª avaliação e esses indivíduos tiveram maior prevalência de SM na avaliação inicial. A análise multivariada mostrou que a presença de SM na avaliação inicial foi associada com o desenvolvimento de DHGNA independente da idade, ganho de peso e consumo de bebidas alcoólicas⁶⁹.

Um relatório dos dados de um subgrupo do *Insulin Resistance Atherosclerosis Study* (IRAS), composto por 633 indivíduos não portadores de SM pelo critério diagnóstico do NCEP ATPIII e não diabéticos na fase inicial do estudo, acompanhados por um período médio de 5,2 anos, mostrou que aqueles que desenvolveram SM tinham níveis séricos elevados de ALT e valores mais baixos da relação AST/ALT quando comparados aos que não desenvolveram SM. A significância estatística permaneceu após a exclusão de ex-etilistas e daqueles que consumiam três ou mais drinques por dia ($p < 0,05$). Após o ajuste para idade, sexo, instituição, etnia e consumo de bebidas alcoólicas os níveis de ALT e a relação AST/ALT foram significativamente associados ao risco de desenvolvimento de SM em 5 anos, também permanecendo a significância estatística após a exclusão de ex-etilistas e

daqueles que consumiam três ou mais drinques por dia. Após ajuste adicional para circunferência abdominal, intolerância à glicose pós-sobrecarga, sensibilidade insulínica e resposta insulínica aguda, a significância estatística também permaneceu, caracterizando em tal análise uma associação independente entre os níveis de ALT, a relação AST/ALT e o risco de desenvolvimento de SM⁷⁰.

Com o objetivo de avaliar a relação entre a DHGNA e o risco de DM tipo 2, utilizando os níveis elevados da ALT como marcador, três estudos relacionaram significativamente os níveis dessa aminotransferase com o risco aumentado de desenvolvimento de DM tipo 2, independente da obesidade. Correlação semelhante entre ALT e DM tipo 2 foi relatada anteriormente em um estudo realizado na década de 80⁶⁷. Entretanto, apenas um desses estudos ajustou os resultados para o consumo de bebidas alcoólicas⁷¹.

A presença de SM também tem sido relacionada com a progressão e a gravidade da DHGNA. Em um estudo coorte envolvendo 304 pacientes não diabéticos, portadores de DHGNA, que avaliou a prevalência de SM com base no critério do (NCEP ATP III), 36% dos pacientes preencheram o critério para o diagnóstico de SM. O percentual foi significativamente maior nos portadores de sobrepeso (29%) e principalmente nos obesos (67%), sendo a presença de SM significativamente associada com o sexo feminino e a idade. A IR definida pelo *homeostasis model assessment* (HOMA), foi detectada em 44% dos pacientes com IMC normal, em 62% daqueles com sobrepeso, em 73% dos obesos e foi associada de forma significativa com a presença de SM (OR 2,5; 95% IC 1,5-4,2; $p < 0,001$). 73,6% dos pacientes biopsiados apresentavam EHNA, a SM ocorreu em 88% desses pacientes e em 67% dos portadores de esteatose isolada ($p = 0,004$), sendo que a prevalência de EHNA não teve associação significativa com o sexo, idade e IMC. Dos 05 componentes da SM somente a hiperglicemia foi associada de forma significativa com a EHNA após a correção para a idade, sexo e obesidade, mas o diagnóstico de SM (3 ou mais componentes simultâneos) foi associado com alta prevalência de fibrose e atividade necroinflamatória. A análise de regressão logística confirmou que a presença de SM associou-se a alto risco de EHNA após a correção para sexo, idade e IMC (OR 3,2; 95% IC 1,2-8,9; $p = 0,026$)⁷².

2.5 DHGNA E DOENÇA CARDIOVASCULAR

A associação entre a DHGNA e a doença aterosclerótica tem sido amplamente relatada, porém a apresentação concomitante e frequente da NAFLD, SM e outros fatores de risco para doença cardiovascular, dificulta o estabelecimento do real papel dessa doença no processo aterogênico. Muitos estudos têm demonstrado tal associação de forma significativa e algumas vezes independente, mas na maioria dos mesmos existem limitações como a ausência de diagnóstico histopatológico de DHGNA e amostras pequenas e ou selecionadas.

Estudo que avaliou 85 pacientes com diagnóstico histológico de DHGNA e utilizou a espessura médiointimal das carótidas como marcador de doença aterosclerótica subclínica, mostrou relação significativa entre a DHGNA e o aumento da espessura médiointimal, independente dos fatores de risco clássicos, RI e da presença de SM pelo critério do ATP III. A espessura médiointimal foi significativamente maior nos portadores de EHNA quando comparados com os portadores de esteatose isolada e a gravidade das alterações histológicas teve forte correlação com o aumento da espessura médiointimal. No grupo DHGNA havia doze pacientes com o diagnóstico de DM tipo 2, três em uso de cloridrato de metformina e nove em controle dietético, mas a significância estatística se manteve após a exclusão dos mesmos⁷³. Estudo caso-controle que avaliou 40 portadores de DHGNA diagnosticada pelo ultrassom e utilizou também a espessura médiointimal carotídea como marcador de doença aterosclerótica subclínica, mostrou relação significativa e independente entre a DHGNA e o aumento da espessura médiointimal, após o ajuste para a idade, sexo, tabagismo, os componentes da SM e sua presença pelo critério do ATP III ou da organização mundial da saúde (OMS)⁷⁴. Analisando duas características de placas de ateroma de artérias coronarianas relacionadas com o risco de ruptura, o núcleo lipídico aumentado e o remodelamento positivo, por meio de tomografia computadorizada com 64 detectores, estudo que envolveu 298 japoneses com suspeita de doença ateromatosa coronariana, 60 deles (20,1%) com diagnóstico tomográfico de DHGNA, mostrou que a prevalência das características citadas foi

significativamente maior nos portadores de DHGNA independente do sexo, idade, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, IMC, HAS, intolerância à glicose de jejum, diabetes e dislipidemia⁷⁵.

Em estudo transversal, 85 indivíduos do sexo masculino, aparentemente saudáveis, com menos de 50 anos foram avaliados. O diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA foi confirmado pela tomografia computadorizada em 45 deles e a espessura médiointimal das carótidas foi mensurada pelo ultrassom. Houve relação significativa entre a presença de DHGNA e o aumento da espessura médiointimal independente da idade, IMC, níveis lipídicos, pressão arterial e RI pelo método HOMA. Todavia, após o ajuste para gordura visceral estimada pela tomografia computadorizada houve perda da significância estatística⁷⁶. Em outro estudo transversal, 200 diabéticos tipo 2 controlados com dieta, dos quais 100 com diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA, foram submetidos ao ultrassom de carótidas para avaliação da espessura médiointimal. O grupo DHGNA teve espessura médiointimal marcadamente maior que o grupo controle e após o ajuste para idade, sexo, tabagismo, duração do diabetes, hemoglobina glicosilada, LDL colesterol, aminotransferases, microalbuminúria e SM houve manutenção da significância estatística. Contudo, após ajuste adicional para a RI definida pelo HOMA houve a perda dessa significância⁷⁷. A vasodilatação dependente do endotélio foi estimada como parâmetro de disfunção endotelial em 52 indivíduos com diagnóstico histológico de DHGNA e 28 do grupo controle. O percentual de vasodilatação foi determinado por meio da medida ultrassonográfica do diâmetro da artéria braquial no estado basal e durante a hiperemia reativa pós-isquemia induzida por compressão e descompressão feita por um esfigmomanômetro acoplado no braço. Tal percentual foi significativamente menor nos portadores de DHGNA e o risco de eventos cardiovasculares dos mesmos, estimado pelo score de Framingham, foi moderado⁷⁸.

Em estudo prospectivo observacional, 1.221 japoneses de meia idade, aparentemente saudáveis, foram acompanhados por 24 meses. A DHGNA foi diagnosticada pelo ultra-som em 231 desses indivíduos (18,9%). Ocorreram 22 eventos cardiovasculares no total (1,8%), sendo 12 eventos no grupo DHGNA (5,2%) e 10 eventos no grupo controle (1,0%). Apesar do número baixo de eventos cardiovasculares, houve relação significativa dos mesmos com a

DHGNA independente dos fatores de risco clássicos e da SM⁷⁹. Em outro estudo com o mesmo desenho, no qual foram acompanhados por um período médio de 5 anos 744 portadores de DM tipo 2, duzentos e quarenta e oito indivíduos tiveram eventos cardiovasculares (33,3%). O diagnóstico ultrassonográfico de DHGNA foi estabelecido em 94 % daqueles que tiveram eventos e em 56% dos que não tiveram. Houve relação significativa entre a DHGNA e a doença cardiovascular e após o ajuste para SM, idade, sexo, tabagismo, duração da doença de base, uso de medicação específica e correlacionada (anti-hipertensiva, hipolipemiante e antiagregante plaquetária), a significância estatística permaneceu⁸⁰.

Como as amostras dos dois estudos prospectivos citados foram constituídas respectivamente por japoneses, nos quais a incidência de doença cardiovascular é menor do que nos ocidentais e por diabéticos tipo 2 que possuem risco maior de desenvolver DHGNA e doença cardiovascular que a população geral, a extrapolação dos resultados dos mesmos torna-se difícil. Grandes estudos prospectivos são necessários para esclarecer de forma adequada a relação entre a DHGNA e a doença cardiovascular, porém a presença desse distúrbio metabólico hepático que pode ser detectado na maioria das vezes por métodos não invasivos, pode representar risco adicional para eventos cardiovasculares.

2.6 ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO DA DHGNA

Sintomas como fadiga, mal-estar, sensação de plenitude ou desconforto no quadrante superior direito do abdome podem estar relacionados com a DHGNA. Entretanto, a maioria dos pacientes apresentam-se assintomáticos no momento do diagnóstico e a hepatomegalia é o único achado do exame físico na maioria das vezes². Incremento leve a moderado dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT) ou de ambas, são as mais comuns e frequentemente as únicas anormalidades laboratoriais encontradas. A relação AST/ALT é geralmente menor que 1, porém ocorre o aumento da mesma com o avanço da fibrose e perda da acurácia diagnóstica desta relação nos casos que evoluem para cirrose^{2,81}.

Todavia, apenas 2,8 a 5,4 % dos indivíduos com esteatose sem causa identificável apresentam elevação das aminotransferases⁸². Os níveis séricos de fosfatase alcalina e gama-glutamiltransferase também podem se encontrar elevados e outras anormalidades como hipoalbuminemia, prolongamento do tempo de protrombina e hiperbilirrubinemia podem ser encontradas na fase cirrótica da DHGNA².

Métodos de imagem não invasivos como o ultrassom, a tomografia computadorizada e a espectroscopia de prótons por ressonância magnética podem evidenciar a esteatose hepática, porém os dois primeiros não quantificam adequadamente a mesma⁸² e tem maior chance de resultados falso negativos²⁴. Embora a espectroscopia de prótons por ressonância magnética pareça ser o método não invasivo mais adequado para quantificar a esteatose hepática, nenhum dos métodos citados possibilita uma boa avaliação do restante do espectro da DHGNA, sendo a biópsia hepática o padrão ouro para a avaliação do estágio e grau da lesão hepática⁸².

As características histopatológicas da DHGNA são indistinguíveis da hepatopatia alcoólica. Esteatose, infiltrado inflamatório, degeneração balonizante dos hepatócitos e necrose, núcleos de glicogênio, corpúsculos hialinos de Mallory e fibrose, caracterizam todo o espectro da DHGNA². A combinação de esteatose, infiltrado de células mononucleares e ou polimorfonucleares, degeneração balonizante dos hepatócitos e necrose focal, caracterizam a EHNA². Os corpúsculos hialinos de Mallory podem ou não estar presentes e a maioria dos pacientes portadores da EHNA possuem algum grau de fibrose². Em alguns pacientes, no estágio cirrótico, a esteatose e a atividade necroinflamatória podem não ser mais encontradas².

2.7 TRATAMENTO DA DHGNA

Revisão recente que abordou vários estudos nos quais o objetivo foi avaliar a efetividade das mudanças dos hábitos de vida no tratamento da DHGNA, mostrou carência de documentação histológica ou por imagem, e deficiências na metodologia e na forma de implementação de tais mudanças⁸³, o que dificulta a recomendação das mesmas à luz da medicina baseada em

evidência⁸⁴. Apesar da ausência de dados conclusivos na literatura, as mudanças nos hábitos de vida, basicamente dieta hipocalórica e exercícios físicos regulares, são recomendadas em revisões recentes^{83,84} e anteriores para o tratamento da DHGNA^{1,2,85} e seus benefícios foram documentados em condições frequentemente associadas como pré-diabetes, diabetes e hipertensão arterial sistêmica⁸³.

A cirurgia bariátrica, anteriormente associada com a piora da DHGNA, foi amplamente utilizada para o tratamento da obesidade na última década. Conseqüentemente suas complicações e benefícios a curto e a longo prazo tem sido melhor estabelecidos e várias publicações tem reportado melhora histológica significativa de todo o espectro da DHGNA após tal intervenção⁸⁴.

Embora vários estudos tenham testado múltiplos fármacos como potenciais opções terapêuticas para a DHGNA, seu tratamento medicamentoso permanece indefinido. Meta-análise publicada recentemente incluiu seis estudos randomizados que avaliaram os antioxidantes: glutathione reduzida, N-acetilcisteína, vitamina E isolada ou em associação com a vitamina C e a associação múltipla de glucuronato de betaína, glucuronato de dietanolamina e ascorbato de nicotinamida. Três desses estudos, compararam a vitamina E isolada ou associada à vitamina C com o placebo ou outra intervenção. Nessa meta-análise os antioxidantes melhoraram significativamente a AST e não a ALT, os dados fornecidos pela avaliação ultrassonográfica foram muito limitados e a análise histológica pré e pós-intervenção, que ocorreu em apenas um estudo, não mostrou diferença significativa em comparação com o placebo. Os autores concluíram que não há dados suficientes para recomendar ou não o uso de antioxidantes no tratamento da DHGNA³.

Quanto aos ácidos biliares, outra meta-análise, também publicada recentemente, selecionou e avaliou quatro estudos randomizados, três compararam o ácido ursodeoxicólico com o placebo e um com a vitamina E associada à vitamina C. Não houve melhora significativa nos testes de função hepática, ultra-som ou tomografia computadorizada e a análise histológica que ocorreu em dois estudos não permitiu uma conclusão definitiva. Em conclusão, não há dados suficientes para recomendar ou não o seu uso na terapêutica da DHGNA⁴.

A associação frequente entre DHGNA e RI sugere o uso de sensibilizadores da insulina no tratamento dessa doença^{85,86}. Em estudo randomizado no qual se avaliou 34 pacientes portadores de EHNA, todos sob orientação dietética e 17 deles recebendo metformina, houve melhora significativa das transaminases e do grau de esteatose quantificado pelo ultrassom, mas não houve melhora histológica significativa no grupo metformina (10 pacientes do grupo controle e 13 do grupo medicação foram submetidos à biópsia no final de 6 meses)⁸⁷. Mais recentemente, outro estudo randomizado comparou a metformina com a vitamina E (29 no grupo metformina e 28 pacientes no grupo vitamina E) e a metformina com dieta isolada (26 no grupo metformina e 27 pacientes no grupo dieta isolada) em portadores de DHGNA diagnosticada por meio de biópsia. A normalização da ALT (desfecho primário) ocorreu em percentual significativamente maior no grupo metformina comparado aos grupos vitamina E e dieta, e entre os grupos vitamina E e dieta não houve diferença significativa. Apenas 17 pacientes foram submetidos à biópsia no final do estudo, todos eram do grupo metformina e tinham o diagnóstico de EHNA no início do estudo. Houve melhora histológica significativa nesses pacientes que não se relacionou com os níveis de transaminases ou com as alterações do IMC⁸⁸.

As tiazolidinedionas, outra classe de sensibilizadores da insulina da qual a rosiglitazona e a pioglitazona são os representantes disponíveis comercialmente, também tem sido avaliadas como prováveis opções terapêuticas. A rosiglitazona foi comparada ao cloridrato de metformina em estudo randomizado no qual foram acompanhados 20 portadores de DM tipo 2 e DHGNA, com sobrepeso ou obesidade grau 1. Nove pacientes foram tratados com rosiglitazona e 11 com cloridrato de metformina por 16 semanas. Houve diminuição significativa da esteatose mensurada por ressonância nuclear magnética, dos níveis séricos de ALT e aumento significativo dos níveis séricos de adiponectina no grupo rosiglitazona, mas não foram realizadas biópsias hepáticas⁸⁹. Em outro estudo randomizado mais recente, placebo-controlado, que avaliou a rosiglitazona em portadores de EHNA acompanhados por 1 ano (32 pacientes em ambos os grupos), ocorreu melhora significativa dos níveis de transaminases e aumento também significativo dos níveis de adiponectina,

porém na análise histológica houve melhora significativa apenas no grau de esteatose⁹⁰.

A pioglitazona foi testada em estudo randomizado, placebo-controlado, no qual foram acompanhados, por 06 meses, 47 indivíduos portadores de EHNA com teste oral de tolerância à glicose alterado ou diagnóstico de diabetes. Foram incluídos 26 pacientes no grupo pioglitazona e 21 no grupo placebo e todos tiveram orientação dietética. Houve melhora significativa da glicemia de jejum, insulinemia basal, hemoglobina glicosilada, transaminases, dos níveis séricos de TNF- α , TGF- β 1 e aumento significativo dos níveis de adiponectina no grupo pioglitazona. Ocorreu também melhora significativa de todos os parâmetros histológicos da EHNA, exceto o escore de fibrose⁹¹. Estudo piloto prévio, que envolveu 18 pacientes não diabéticos, mostrou melhora significativa de todos os parâmetros histológicos da EHNA, exceto a inflamação portal, após 48 semanas de uso da pioglitazona⁹². Recentemente, outro estudo randomizado mostrou resultados semelhantes. Nesse estudo foram acompanhados 61 pacientes não diabéticos portadores de EHNA, 31 no grupo pioglitazona e 30 no grupo placebo por um período de 12 meses⁹³.

Apesar do benefício aparente dos sensibilizadores da insulina na DHGNA, em meta-análise publicada recentemente os autores concluíram que não há dados suficientes até o momento para recomendá-los como tratamento⁵. No entanto, tal meta-análise selecionou apenas três estudos, sendo que dois deles avaliaram a metformina^{87,88} e o outro foi um estudo piloto que comparou a vitamina E com a associação da mesma e a pioglitazona⁹⁴. Comentários semelhantes a respeito do uso de sensibilizadores da insulina no tratamento da DHGNA, no caso específico das tiazolidinedionas, foram feitos em revisões publicadas anteriormente^{85,86,95}. Além disso, os resultados de outras duas meta-análises publicadas posteriormente sugerem o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio relacionado ao uso da rosiglitazona⁹⁶ e de insuficiência cardíaca como efeito de classe das tiazolidinedionas em pacientes pré-diabéticos e diabéticos tipo 2⁹⁷.

Recém-publicado, o *Pioglitazone versus Vitamin E versus Placebo for the Treatment of Nondiabetic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis* (PIVENS), estudo randomizado, placebo-controlado, no qual foram alocados 247 pacientes adultos, não diabéticos, com diagnóstico histológico de EHNA,

comparou a pioglitazona, 30 mg/dia e a vitamina E 800 UI/dia com o placebo. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: 83 no grupo placebo, 84 no grupo vitamina E e 80 no grupo pioglitazona. O desfecho primário foi a melhora histológica caracterizada da seguinte forma: redução de 1 ou mais pontos no escore de balonização, redução do escore de atividade da DHGNA para ≤ 3 ou de pelo menos 2 pontos, com no mínimo 1 ponto de decréscimo no escore de inflamação lobular ou de esteatose associados a ausência de piora do escore de fibrose. No final do estudo, que teve a duração de 96 semanas, 90% dos pacientes foram submetidos à biópsia hepática. A vitamina E foi significativamente melhor que o placebo (43% e 19% respectivamente, $P=0.001$) e a pioglitazona, comparada ao placebo, não atingiu a significância estatística pré-estabelecida ($p\leq 0,025$). Houve melhora significativa da esteatose, inflamação lobular e dos níveis séricos de ALT, definidos como desfechos secundários, no grupo vitamina E e no grupo pioglitazona, mas não ocorreu melhora do escore de fibrose em ambos⁹⁸.

Além da meta-análise citada anteriormente que selecionou 03 estudos que testaram a vitamina E, cuja conclusão não foi favorável ao uso da mesma no tratamento da DHGNA³, estudo piloto prévio no qual foi comparada a vitamina E isolada com a associação de vitamina E e pioglitazona, em relação à condição basal, em pacientes não diabéticos portadores de EHNA, mostrou melhora significativa somente da esteatose no grupo vitamina E isolada e no grupo associação houve melhora da esteatose, balonização e da fibrose pericelular, no entanto, a dose utilizada da vitamina E foi 400 UI/dia⁹⁴. Em revisão posterior à publicação do PIVENS, os autores sugerem, a partir dos resultados do mesmo, a realização de estudos adicionais para avaliar a pioglitazona como tratamento da EHNA em portadores de RI ou DM tipo 2 e consideraram os resultados relacionados a vitamina E encorajadores para a realização de novos estudos⁹⁹.

2.8 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E DHGNA

Modelos experimentais têm sugerido que a angiotensina 2 (ANG 2), possui papel importante no estresse oxidativo, na resposta inflamatória⁶ e

fibrogênese hepática⁷. A infusão sistêmica de ANG 2 em ratos normais induziu a ativação das HSC, a infiltração de células inflamatórias e o estresse oxidativo no fígado, todos de forma significativa. Aumentou, também de forma significativa, os níveis séricos de AST e ALT, a concentração hepática e os níveis séricos de TNF- α ⁶. Em cultura de HSC humanas a ANG 2 promoveu, marcadamente, o aumento da produção de ROS derivadas da *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidase ativada via receptor AT1, o que se relacionou com ações fibrogênicas das HSC. Aumentou a expressão de genes relacionados a produção de proteínas de ECM e outros genes potencialmente envolvidos na fibrogênese hepática. Em cultura de HSC de ratos a ANG 2 estimulou a secreção de colágeno tipo 1 e TGF- β 1 por meio da ativação do receptor AT1⁷.

Resultados de estudos experimentais indicam que a ativação do sistema renina-angiotensina tem papel importante no desenvolvimento da RI, intolerância à glicose e DM tipo 2. O uso de bloqueadores do receptor AT1 da ANG 2 melhorou o metabolismo glicídico sistêmico em vários modelos animais de RI⁹. Estudos clínicos tem mostrado melhora da sensibilidade insulínica com o uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores do receptor AT1 da ANG 2¹¹.

Os bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina 2, largamente utilizados como anti-hipertensivos, foram avaliados em modelos experimentais e em humanos como proposta terapêutica preventiva e curativa da DHGNA. Em modelo animal de síndrome metabólica (ratos zucker obesos) a irbesartana diminuiu significativamente a concentração hepática de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1 avaliada por intermédio de imunohistoquímica¹². A telmisartana, usada de forma preventiva, diminuiu significativamente o conteúdo hepático de triglicerídeos de ratos submetidos à dieta rica em lipídeos¹³ e em hidratos de carbono e lipídeos¹⁴. Em ratos submetidos à dieta hiperlipídica com o objetivo de desenvolver obesidade e diabetes, a olmesartana aumentou os níveis plasmáticos de adiponectina e preveniu o aumento do HOMA ambos significativamente. Preveniu marcadamente o aumento do conteúdo hepático de triglicerídeos, da fração volumétrica de colágeno e da expressão de TGF- β 1. Também de forma significativa, atenuou o aumento da atividade da NADPH oxidase e diminuiu o estresse oxidativo hepático¹⁷. Em modelo animal de

EHNA (ratos submetidos a dieta deficiente em metionina e colina) a olmesartana, usada preventivamente, atenuou a esteatose e mais pronunciadamente a fibrose, reduziu a expressão de colágeno tipo 1, a ativação das células estelares hepáticas e do TIMP-1, reduziu a expressão do TGF- β 1, do TNF- α e o depósito nuclear de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina usado como marcador de estresse oxidativo, todos com significância estatística¹⁸.

Em estudo piloto no qual a losartana foi utilizada em portadores de EHNA, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e resistência insulínica, houve redução significativa dos níveis séricos de aminotransferases e TGF- β 1, melhora do grau de inflamação e do estágio de fibrose na maioria dos pacientes¹⁰⁰. Também em estudo piloto, a telmisartana e a olmesartana melhoraram significativamente a resistência insulínica avaliada pelo HOMA e os níveis de ALT em portadores de DHGNA¹⁰¹.

2.9 OLMESARTANA MEDOXOMILA

A olmesartana medoxomila, forma esterificada da olmesartana, é um derivado imidazólico e um pró-fármaco¹⁰². A olmesartana, que corresponde ao composto ativo, possui biodisponibilidade oral baixa (4,5%) e sua forma esterificada tem biodisponibilidade oral significativamente maior (28,6%)¹⁰³. Por isso, a forma esterificada foi desenvolvida preferencialmente ao composto ativo¹⁰² (figura 1).

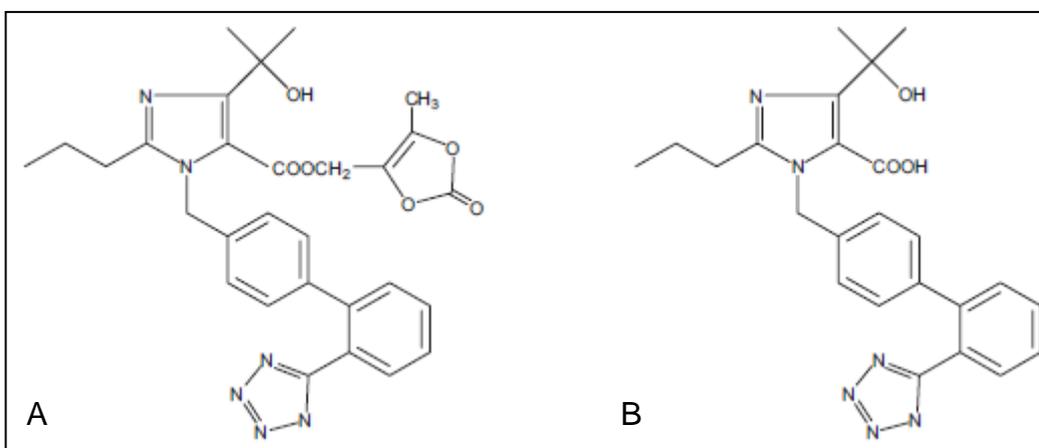


Figura 1 – Fórmula estrutural da olmesartana medoxomila (A) e olmesartana (B)

Modelos experimentais indicam que a olmesartana é um antagonista potente e altamente seletivo do receptor AT1 da ANG 2¹⁰⁴. Após a administração oral exerce ação inibitória prolongada não influenciada por enzimas do citocromo P-450¹⁰⁴. Durante a absorção no trato gastrointestinal, a olmesartana medoxomila é rápida e completamente desesterificada, o que determina a formação do composto ativo e único metabólito¹⁰³.

A olmesartana é altamente ligada às proteínas plasmáticas como a albumina (>99%) e a α -1 glicoproteína ácida (>96%)¹⁰². Em estudo randomizado, duplo cego, placebo-controlado os efeitos do composto ativo aumentaram proporcionalmente ao incremento da dose da olmesartana medoxomila de 10 a 160 mg ao dia, sua concentração plasmática máxima que ocorreu em 1,4 a 2,8 horas após a administração oral não variou sistematicamente com a dose utilizada e sua meia vida de eliminação terminal foi de 11,8 a 14,7 horas¹⁰⁵. Por meio da administração oral de 20 mg da medicação radiomarcada, a excreção fecal foi quantificada em 64,58 a 89,59% e a urinária em 9,94 a 16,31% da dose administrada¹⁰³.

Os resultados de estudo que avaliou a influência da idade na farmacocinética da olmesartana medoxomila sugerem que o ajuste de dose para idosos é desnecessário¹⁰⁶. Contudo, para essa faixa etária, pode ser benéfico iniciar doses mais baixas e ajustar mais lentamente a dose terapêutica ideal¹⁰². Na presença de insuficiência renal grave, recomenda-se o que a dose não ultrapasse 20 mg ao dia¹⁰⁶ e em portadores de insuficiência hepática moderada há necessidade de ajuste de dose¹⁰².

A eficácia como anti-hipertensivo, segurança e boa tolerabilidade da olmesartana^{102,107}, bem como ações potencialmente antiaterogênicas em pacientes hipertensos¹⁰⁸ foram demonstradas em estudos randomizados e placebo-controlados. Em modelos animais, a olmesartana mostrou ação antiaterogênica¹⁰⁹⁻¹¹¹ e nefroprotetora¹¹²⁻¹¹⁴, melhorou significativamente a esteatose hepática¹⁶, preveniu¹⁷ e atenuou¹⁸, também de forma significativa, o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica.

3 MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Previamente ao início do estudo, o protocolo foi analisado e aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (parecer N° 307, anexo).

Utilizaram-se 34 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cunicullus*), da linhagem *New Zealand*, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com idade média de 111 dias e peso médio de 2.864,51 gramas divididos em 3 grupos: grupo 1 (G1) n=13, grupo 2 (G2) n=12 e grupo 3 (G3) n=9. O G1 ou grupo controle recebeu ração padrão para coelhos de laboratório (Nuvilab Coelhos®-Nuvital) acrescida de colesterol a 1% em todo o período do estudo (ração suplementar). O G2 ou grupo olmesartana, recebeu também a ração suplementar e a olmesartana 1 mg/kg em dose única diária em todo o período do estudo. Os dois grupos citados foram submetidos a eutanásia no final de 8 semanas. O G3 ou grupo normal recebeu ração padrão para coelhos de laboratório (Nuvilab Coelhos®-Nuvital) e foi submetido a eutanásia em 4 semanas. Os 03 grupos receberam água e ração de forma *ad libitum*.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Ambiente de Experimentação

Realizaram-se os procedimentos nas dependências do laboratório de técnica operatória da PUC-PR e do laboratório experimental do centro de estudos do Hospital Angelina Caron.

No macroambiente foram respeitados os ciclos de iluminação 12/12 horas, com troca de ar contínua e temperatura controlada entre 19 a 23° C. No

microambiente os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de metal higienizadas diariamente. Cada animal recebeu uma identificação numérica seqüencial na orelha direita, que foi repetida na face anterior da sua respectiva gaiola.

Os coelhos foram transferidos do biotério para o laboratório de experimentação onde permaneceram por um período de adaptação de sete dias antes do início do experimento. Durante esse período receberam água e a ração padrão para coelhos de laboratório (Nuvilab Coelhos[®]-Nuvital) *ad libitum*.

3.2.2 Preparo da Ração Suplementar

Para o preparo da ração suplementar acrescida de colesterol a 1%, foram utilizados 200 g de colesterol a 95% (Sigma-Aldrich[®]), dissolvidos em 800 ml de clorofórmio e distribuídos em 20 Kg de ração Nuvilab Coelhos[®]-Nuvital. Foi utilizado um recipiente plano e largo onde a ração foi distribuída em uma fina camada e regada com a solução de colesterol de forma homogênea. Antes de a ração ser utilizada, foi aguardado um período mínimo de 24 horas para a adequada evaporação do clorofórmio.

3.2.3 Preparo da Medicação

Utilizando um almofariz com pistilo em vidro, 3 comprimidos de olmesartana medoxomila 40 mg foram triturados de cada vez através de movimentos circulares. Em seguida usando um tamis nº 40 separou-se o revestimento dos comprimidos do excipiente e ativo. Na sequência o pó resultante foi envasado e selado em sachê com revestimento interno de alumínio. Foram preparados 7 sachês, contendo 120 mg de olmesartana, 1 vez por semana.

3.2.4 Administração da Medicação

Um sachê contendo 120 mg de olmesartana em pó foi aberto diariamente, seu conteúdo dissolvido em 9 ml de água destilada e em seguida

a solução resultante foi administrada aos coelhos do G2 por gavagem oral (figura 2), através de seringa de insulina de 100 unidades (1ml), graduada de 1/1 unidade (figura 2). A dose de 1mg/kg de peso foi administrada uma vez ao dia, no mesmo horário em todo o período do estudo (8 semanas). Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o volume da solução em unidades: $\text{volume em unidades} = \text{peso em kg} \times \text{dose (1mg/kg)} / 1,33$. O peso dos coelhos foi aferido em rotina semanal.



Figura 2 – Administração da medicação por gavagem oral

3.2.5 Anestesia

Os coelhos foram anestesiados com cloridrato de xilazina na dose de 6 mg/Kg associado ao cloridrato de ketamina na dose de 30 mg/kg, por via intramuscular na face posterior da coxa¹¹⁵.

3.2.6 Coleta de Amostras de Sangue

Foram coletadas amostras de sangue, volume de 5 ml, sob anestesia, através de punção intracardíaca, para as dosagens de AST, ALT, glicose, uréia, creatinina, colesterol total, HDL-C e triglicerídeos, antes de iniciar a dieta e na eutanásia (figura 3).



Figura 3 – Coleta de amostra de sangue mediante punção intracardíaca

3.2.7 Remoção de Segmentos Hepáticos

Após a tricotomia ampla do abdome, realizada alguns minutos após a aplicação da solução anestésica, os coelhos foram colocados em decúbito dorsal na canaleta cirúrgica, sendo seus membros fixados pelas extremidades. Em seguida, cada animal foi submetido à laparotomia mediana ampla a partir do processo xifóide. Com o campo aberto, foi feita a identificação do fígado e posterior remoção de um segmento do lobo lateral direito e do lobo quadrado (figura 4). Em seguida os animais foram sacrificados com dose letal de

barbitúrico, conforme a resolução número 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Os segmentos hepáticos removidos foram armazenados em frascos de formalina, devidamente identificados e encaminhados para o laboratório de patologia experimental da PUC-PR.



Figura 4 – Exteriorização do fígado para remoção dos segmentos lobares

3.2.8 Avaliação Histológica

Os segmentos dos lobos hepáticos foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas e processados pela técnica de inclusão em parafina para a realização dos cortes histológicos. Foram confeccionadas 3 lâminas para cada coelho, cada lâmina contendo 2 cortes histológicos, sendo 1 corte de segmento do lobo lateral direito e outro de segmento do lobo quadrado. Cada coelho teve uma lâmina corada por hematoxilina–eosina (HE), e as outras duas por ácido periódico de Schiff (PAS) e tricrômio de Gomori. As lâminas foram analisadas de maneira cega, em um microscópio Olympus[®], conforme os principais

parâmetros do sistema de escore para a avaliação histológica da DHGNA¹¹⁶ (Tabela 1).

Tabela 1- Principais parâmetros do sistema de escore para a avaliação da DHGNA

ALTERAÇÃO	DEFINIÇÃO	ESCORE
Grau de esteatose	<5%	0
	5 a 33%	1
	>33 a 66%	2
	>66%	3
Estágio de fibrose	Ausente	0
	Perisinusoidal ou periportal	1
	Leve, zona 3, perisinusoidal	1 A
	Moderada, zona 3, perisinusoidal	1 B
	Portal/periportal	1 C
	Perisinusoidal e portal/periportal	2
Inflamação lobular	Pontes de fibrose	3
	Cirrose	4
	Sem foco	0
	<2 focos/campo(200 X)	1
	2-4 focos/campo(200X)	2
Balonização	>4 focos/campo(200X)	3
	Ausente	0
	Poucas células	1
	Muitas células	2

Componente do sistema de escore para a avaliação histológica da DHGNA, o escore de atividade da DHGNA (EAD) corresponde a soma não ponderada dos escores de esteatose, balonização de hepatócitos e inflamação lobular. No estudo realizado para sua validação o EAD ≤ 2 correlacionou-se significativamente com a ausência de EHNA, entre 3 e 4 não teve valor discriminativo ficando distribuído de forma semelhante entre três diagnósticos (ausência de EHNA, limítrofe e EHNA) e quando ≥ 5 correlacionou-se com a presença de EHNA¹¹⁶.

3.2.9 Análise Estatística

As variáveis de interesse foram expressas por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos três grupos foi usado o modelo de análise de variância com um fator ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A comparação de dois grupos foi feita

considerando-se o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As comparações entre os momentos inicial e final do estudo foram feitas usando-se o teste t de Student para amostras pareadas ou o teste não-paramétrico de Wilcoxon. A avaliação da condição de normalidade das variáveis foi feita pelo teste de Shapiro-Wilks. Em relação a variáveis qualitativas dicotômicas os grupos foram comparados usando-se o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Nas comparações múltiplas dos grupos feitas pelo teste exato de Fisher o nível de significância foi corrigido por Bonferroni. Sendo assim, para essas comparações, valores de $p < 0,017$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

4 RESULTADOS

4.1 PESOS DOS COELHOS

A comparação entre os 3 grupos mostrou diferença significativa tanto no início do estudo como na 4ª semana. Entretanto, os 3 grupos foram semelhantes quanto a variação percentual e a diferença 4ª semana e início do estudo (tabela 2).

Tabela 2 – Pesos, em gramas, dos 3 grupos no início do estudo e na 4ª Semana

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p (G1xG2xG3)
Início do estudo (In)	G1	13	2862,31	2825,00	2640,00	3250,00	164,67	<0,001 ^a
	G2	12	3091,25	3095,00	2950,00	3270,00	96,06	
	G3	9	2640,00	2490,00	2335,00	2990,00	239,44	
4ª Semana	G1	13	3153,46	3135,00	2890,00	3415,00	164,40	<0,001 ^a
	G2	12	3417,50	3455,00	3060,00	3755,00	232,68	
	G3	9	3006,11	2950,00	2780,00	3290,00	162,53	
Diferença (4ªsem-In)	G1	13	291,15	250,00	155,00	620,00	135,57	0,982 ^b
	G2	12	326,25	295,00	95,00	625,00	183,30	
	G3	9	366,11	295,00	20,00	800,00	304,06	
Variação %	G1	13	10,30	9,47	4,77	22,18	5,00	0,964 ^b
	G2	12	10,51	9,35	3,15	19,97	5,91	
	G3	9	14,75	11,87	0,69	32,13	12,77	

^a ANOVA com um fator, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

A análise comparativa dos pesos dos coelhos do G1 e G2 mostrou diferença significativa entre os 2 grupos no início e no final do estudo (8ª semana). No entanto, tal análise mostrou semelhança na variação percentual ($p=0,650$) e na diferença entre o final e o início do estudo ($p=0,406$); tabela 3 e figura 5.

Tabela 3 – Pesos, em gramas, do G1 e G2, no início do estudo e na eutanásia

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Início do Estudo(In)	G1	13	2862,31	2825,00	2640,00	3250,00	164,67	
	G2	12	3091,25	3095,00	2950,00	3270,00	96,06	<0,001 ^a
Eutanásia(Eut)	G1	13	3206,92	3205,00	2965,00	3845,00	240,24	
	G2	12	3493,75	3490,00	2950,00	3935,00	301,79	0,022 ^b
Dif (Eut - In)	G1	13	344,62	305,00	55,00	1050,00	256,88	
	G2	12	402,50	337,50	0,00	760,00	250,88	0,406 ^b
Variação %	G1	13	12,27	10,46	1,86	37,57	9,35	
	G2	12	12,94	10,71	0,00	25,72	8,10	0,650 ^b

^a Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

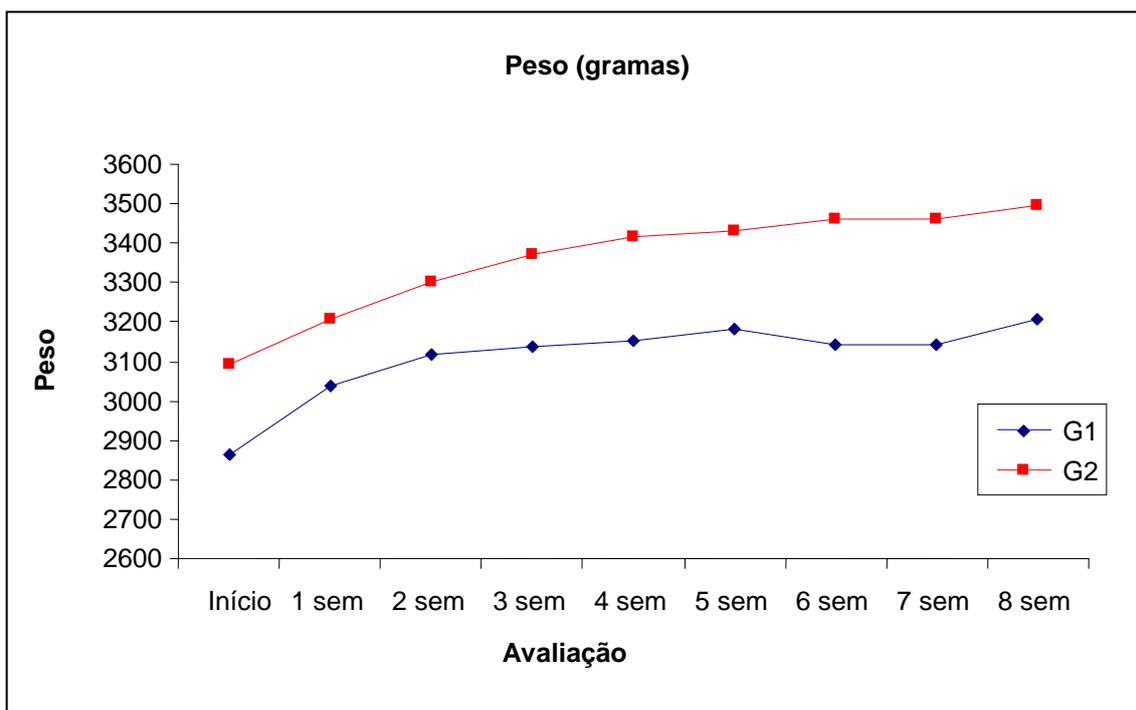


Figura 5 – Comportamento do peso do G1 e G2 até a 8ª semana

4.2 GLICEMIA

A glicemia no início do estudo e na eutanásia, a diferença entre a eutanásia e o início do estudo e a variação percentual foram semelhantes nos

03 grupos (tabela 4). Houve redução significativa da glicemia na eutanásia em comparação com o início do estudo nos 3 grupos: G1 ($p = 0,046$), G2 ($p < 0,001$) e G3 ($p = 0,020$).

Tabela 4 – Glicemia (mg/dl) dos 03 grupos no início do estudo e na eutanásia

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMA	MÁXIMA	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p (G1xG2xG3)
Início do estudo (In)	G1	13	196,69	196,00	146,00	244,00	28,18	0,298 ^a
	G2	12	219,33	227,00	149,00	262,00	31,15	
	G3	9	205,89	193,00	152,00	302,00	49,20	
Eutanásia (Eut)	G1	13	170,46	165,00	133,00	228,00	35,82	0,988 ^b
	G2	12	168,00	167,50	114,00	236,00	33,02	
	G3	9	170,56	182,00	121,00	206,00	31,48	
Diferença (Eut - In)	G1	13	-26,23	-38,00	-79,00	61,00	39,98	0,239 ^a
	G2	12	-51,33	-52,00	-111,00	0,00	32,24	
	G3	9	-35,33	-24,00	-102,00	13,00	36,43	
Variação %	G1	13	-12,09	-20,88	-36,97	40,13	21,01	0,298 ^a
	G2	12	-22,80	-23,73	-45,12	0,00	13,89	
	G3	9	-15,47	-13,50	-35,29	6,74	14,36	

^a ANOVA com um fator, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

4.3 NÍVEIS DE AMINOTRANSFERASES

No início do estudo os níveis de aspartato aminotransferase (AST) foram semelhantes nos 03 grupos. Houve diferença com significância estatística nos níveis de AST da eutanásia, na variação percentual e na diferença eutanásia e início do estudo (tabela 5).

Tabela 5 - Níveis de AST (U/L) dos 3 grupos no início do estudo e na eutanásia

AVALIAÇÃO	GRUPO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p (G1xG2xG3)
Início do estudo (In)	G1	13	26,00	24,00	15,00	42,00	7,85	0,143 ^a
	G2	12	35,75	31,50	18,00	73,00	16,06	
	G3	9	37,00	31,00	17,00	69,00	18,80	
Eutanásia (Eut)	G1	13	69,00	54,00	25,00	143,00	42,38	0,032 ^b
	G2	12	43,75	33,00	25,00	92,00	21,54	
	G3	9	34,00	28,00	15,00	72,00	17,94	
Diferença (Eut - In)	G1	13	43,00	34,00	4,00	117,00	41,50	0,003 ^b
	G2	12	8,00	-1,00	-10,00	70,00	23,32	
	G3	9	-3,00	0,00	-36,00	41,00	22,67	
Variação %	G1	13	178,47	141,67	11,11	615,79	183,69	0,003 ^b
	G2	12	41,68	-2,51	-24,24	318,18	100,46	
	G3	9	5,40	0,00	-62,50	132,26	60,11	

^a ANOVA com um fator, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Na comparação entre 02 grupos quanto aos níveis de AST na eutanásia, a diferença eutanásia e início do estudo e a variação percentual, G1 e G2 foram semelhantes quanto aos níveis de AST na eutanásia. Todavia, a diferença eutanásia e início do estudo e a variação percentual foram significativamente maiores no G1. Entre o G2 e o G3 não se observou diferença significativa e entre o G1 e o G3 houve diferença significativa (tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre 02 grupos quanto aos níveis de AST na eutanásia, diferença eutanásia e início do estudo e variação %

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p*		
	Eut	Diferença (In-Eut)	Variação %
G1 x G2	0,126	0,003	0,003
G1 x G3	0,008	0,001	0,001
G2 x G3	0,184	0,461	0,430

* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

A comparação entre os níveis de AST do início do estudo com os níveis da eutanásia foi semelhante no G2 e no G3, porém no G1 tal comparação mostrou níveis significativamente mais elevados de AST na eutanásia (tabela 7).

Os níveis de alanino aminotransferase (ALT) foram semelhantes nos 03 grupos, nas duas avaliações.

Tabela 7 - Comparação entre o início do estudo e a eutanásia, em cada grupo, quanto aos níveis de AST

GRUPO	VALOR DE p (In x Eut)
G1	0,001 ^b
G2	0,814 ^b
G3	0,702 ^a

^a Teste t de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Wilcoxon, $p < 0,05$

4.4 NÍVEIS DE URÉIA E CREATININA

No início do estudo os níveis de uréia foram significativamente mais elevados no G2 quando comparado ao G1. Contudo, tais níveis foram semelhantes na eutanásia e a diferença entre os níveis da eutanásia e do início do estudo e a variação percentual também foram semelhantes nos dois grupos (tabela 8).

Quanto aos níveis de creatinina, não houve diferença entre os dois grupos.

Tabela 8 - Níveis de uréia (mg/dl), G1 e G2, no início do estudo e na eutanásia

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p* (G1xG2)
Início do estudo (In)	G1	13	39,08	40,00	30,00	47,00	5,74	0,029
	G2	12	45,50	45,00	34,00	61,00	7,95	
Eutanásia (Eut)	G1	13	47,62	47,00	34,00	60,00	8,35	0,116
	G2	12	52,58	50,00	45,00	67,00	6,65	
Diferença (Eut - In)	G1	13	8,54	7,00	-12,00	29,00	11,24	0,736
	G2	12	7,08	8,00	-12,00	21,00	9,93	
Variação %	G1	13	25,36	14,89	-26,09	93,55	34,77	0,568
	G2	12	18,49	17,50	-19,67	47,06	22,79	

* Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

4.5 NÍVEIS DE LIPÍDEOS

Os níveis de colesterol total no início e no final do estudo, bem como a diferença entre o final e o início do estudo e a variação percentual foram semelhantes no G1 e G2 (tabela 9). Houve um aumento acentuado dos níveis de colesterol total no final do estudo tanto no G1 ($p < 0,001$) como no G2 ($p < 0,001$).

Tabela 9 – Níveis de colesterol total (mg/dl), G1 e G2, no início e no final do estudo

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p* (G1xG2)
Início do estudo (In)	G1	13	41,31	39,00	15,00	92,00	20,03	0,235
	G2	12	50,67	47,00	27,00	90,00	18,15	
Eutanásia (Eut)	G1	13	2146,77	2209,00	1062,00	2815,00	471,20	0,798
	G2	12	2079,50	1764,50	940,00	3466,00	799,59	
Diferença (Eut - In)	G1	13	2105,46	2165,00	1001,00	2772,00	478,90	0,769
	G2	12	2028,83	1726,00	899,00	3399,00	786,47	
Variação %	G1	13	6522,18	6042,86	1640,98	16506,67	3963,28	0,056
	G2	12	4128,40	4031,35	2192,68	5700,00	1149,44	

* Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

Os níveis de triglicerídeos também foram significativamente mais altos no final do estudo, nos dois grupos e os outros parâmetros avaliados foram semelhantes (tabela 10).

Os níveis de HDL- colesterol foram semelhantes nos dois grupos nas duas avaliações.

Tabela 10 – Níveis de triglicerídeos (mg/dL), G1 e G2, início e final do estudo

AVALIAÇÃO	GRUPO	n	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p (G1xG2)
Início do estudo (In)	G1	13	46,46	39,00	31,00	79,00	16,37	0,347 ^b
	G2	12	61,83	54,50	17,00	185,00	43,54	
Eutanásia (Eut)	G1	13	168,46	158,00	48,00	322,00	79,58	0,280 ^a
	G2	12	214,83	195,00	66,00	418,00	126,61	
Diferença (Eut - In)	G1	13	122,00	124,00	11,00	243,00	70,02	0,429 ^a
	G2	12	153,00	137,00	-9,00	359,00	118,28	
Variação %	G1	13	271,93	261,54	29,73	651,52	165,68	0,470 ^a
	G2	12	348,06	236,73	-9,28	1026,47	319,42	

^a Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^b Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

4.6.1 Esteatose

A esteatose, quantificada de 0 a 3 conforme o sistema de escore para a avaliação histológica da DHGNA, ocorreu em todos os coelhos do G1 e do G2 e não ocorreu em nenhum coelho do G3 (tabela 11).

Tabela 11 – Escore de esteatose nos 3 grupos

ESCORE DE ESTEATOSE	G1		G2		G3	
	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual
0	0	0,0%	0	0,0%	9	100,0%
1	1	7,7%	6	50,0%	0	0,0%
2	7	53,8%	4	33,3%	0	0,0%
3	5	38,5%	2	16,7%	0	0,0%
Total	13	100,0%	12	100,0%	9	100,0%

Seis coelhos do G2 (50%) tiveram o menor escore de esteatose (tabela 9, figura 6) e apenas 01 coelho do G1 (7,7%) teve o mesmo escore (tabela 9).

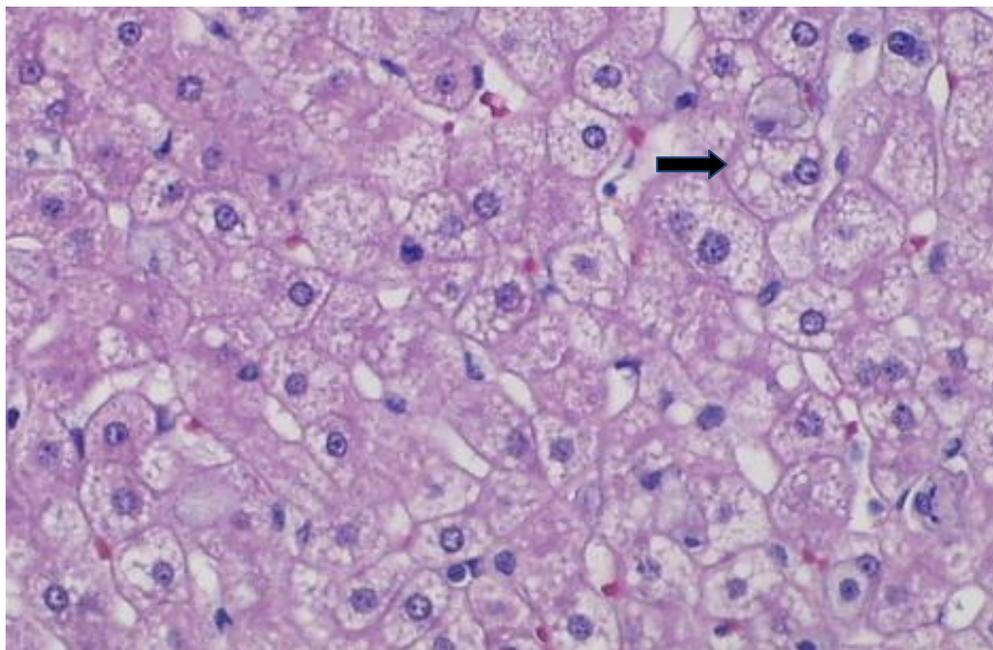


Figura 6 - Alguns hepatócitos contendo vacúolos citoplasmáticos oticamente vazios (seta); esteatose escore 1 em coelho do G2, grupo olmesartana (HE - 400X)

Cinco coelhos, 38,5%, do G1(grupo controle) e dois coelhos, 16,7%, do G2 (grupo olmesartana) tiveram o maior escore de esteatose (tabela 11, figura 7).

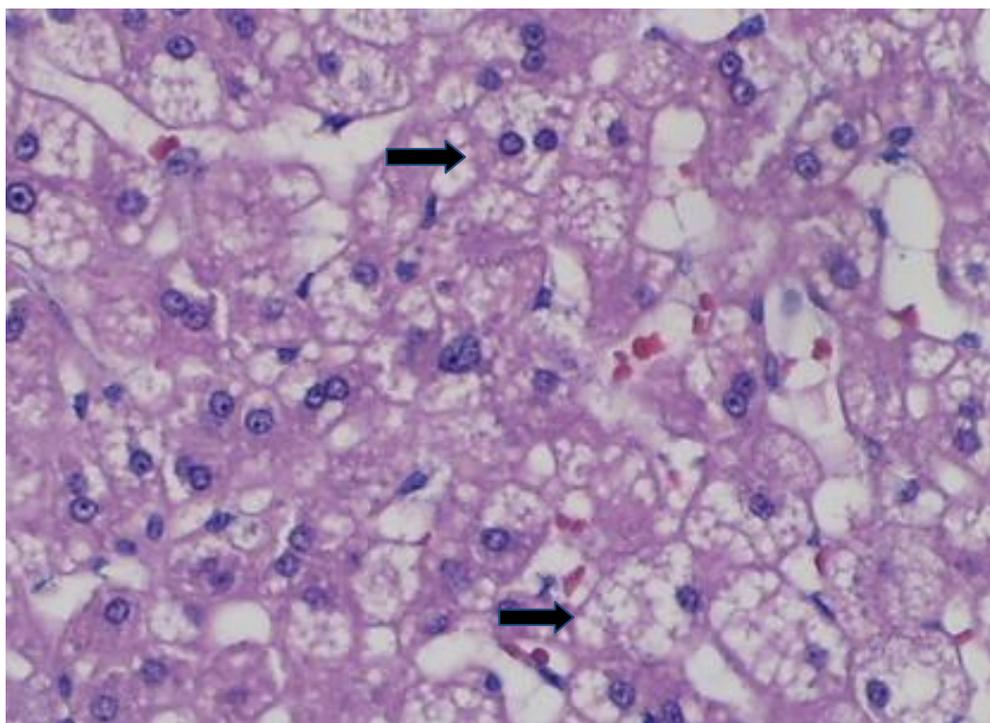


Figura 7 – Lóbulo hepático com hepatócitos de citoplasmas alargados por vacúolos óticamente vazios, micro e macrogoticulares (setas) núcleos vesiculosos; esteatose escore 3 em coelho do G1, grupo controle (HE - 400 X)

Houve diferença significativa entre os três grupos quanto ao escore de esteatose (tabela 12). O padrão de esteatose foi microvesicular (G1 e G2 = 100%) e a localização panacinar ocorreu em 53,8% do G1 e em 16,7% do G2.

Tabela 12 – Comparação entre os 3 grupos quanto ao escore de esteatose

GRUPO	n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p*
G1	13	2	1	3	< 0,001
G2	12	1,5	1	3	
G3	9	0	0	0	

* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Na comparação entre dois grupos houve diferença significativa entre G1 e G2 ($p < 0,013$), entre G1 e G3 ($p < 0,001$) e entre G2 e G3 ($p < 0,001$); tabela 13.

Tabela 13 – Comparação entre dois grupos quanto ao escore de esteatose

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p*
G1 x G2	< 0,013
G1 x G3	< 0,001
G2 x G3	< 0,001

* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

4.6.2 Fibrose

Seis coelhos do G1 tiveram fibrose perisinusoidal ou periportal, o que correspondeu a 46,2% do grupo (tabela 14, figura 8).

Tabela 14 – Escore de fibrose nos 3 grupos

ESCORE DE FIBROSE	G1		G2		G3	
	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual
0	7	53,8%	12	0,0%	9	0,0%
1	6	46,2%	0	100,0%	0	100,0%
Total	13	100,0%	12	100,0%	9	100,0%

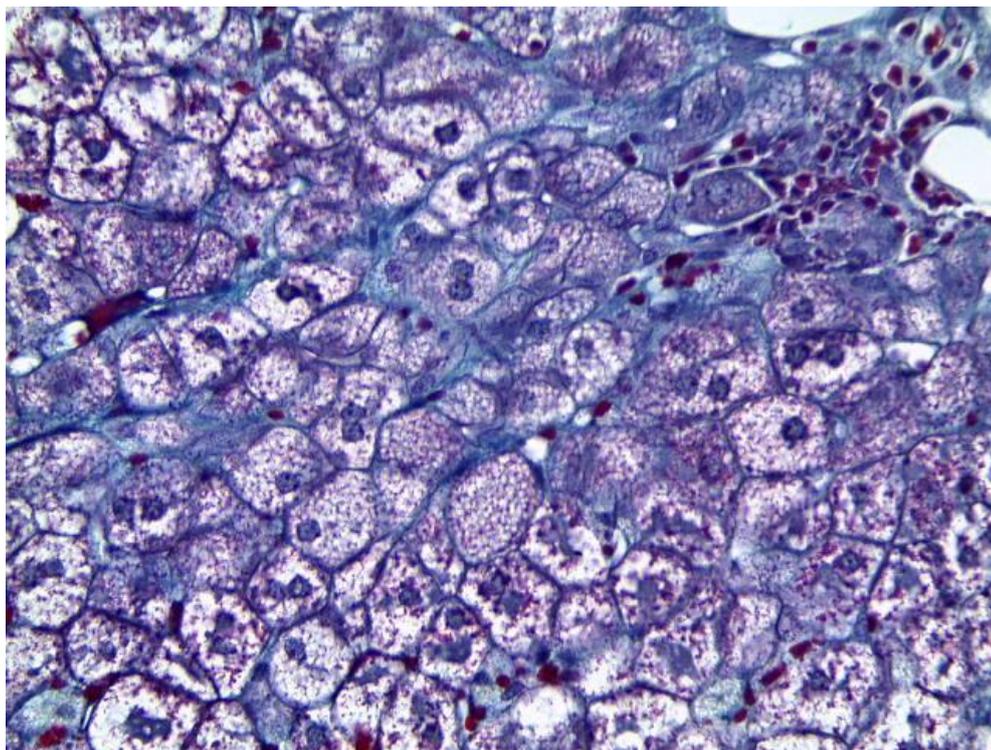


Figura 8 – Fibrose escore 1 em coelho do G1, grupo controle
(Tricrômio de Gomori - 400 X)

Não houve fibrose no G2 e no G3, escore 0 (tabela 14, figura 9). Na comparação entre G1 e G2 houve diferença significativa, $p = 0,015$ (tabela 15).

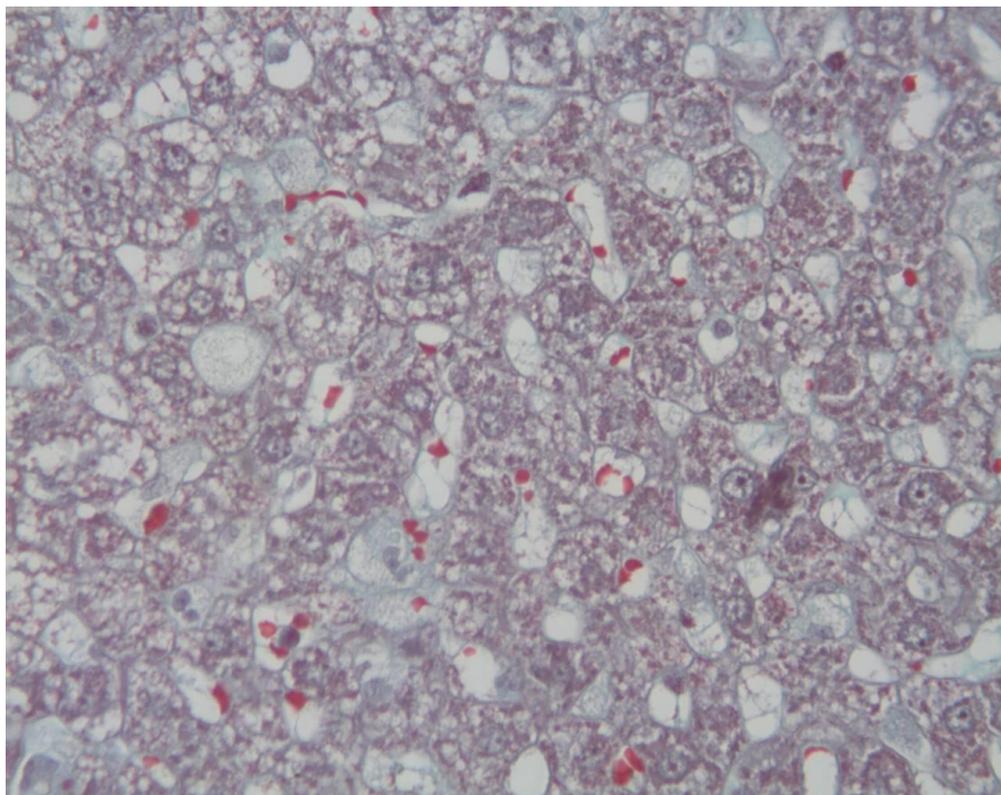


Figura 9 – Ausência de fibrose em coelho do G2, grupo olmesartana (Tricrômio de Gomori - 400 X)

Tabela 15 - Comparação entre 02 grupos quanto ao escore de fibrose

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p*
G1 x G2	0,015
G1 x G3	0,046
G2 x G3	---

* Teste exato de Fisher, $p < 0,017$ (correção de Bonferroni)

4.6.3 Inflamação lobular

A inflamação lobular, quantificada de 0 a 2, ocorreu em 11 coelhos do G1 (84,6%) sendo que 9 coelhos tiveram escore 1 (69,2%) e 2 coelhos escore 2 (15,4%); tabela 16, figura 10. Todos os coelhos do G2 e do G3 e 02 coelhos

do G1 (15,4%) tiveram escore 0 (tabela 16). Na comparação entre 2 grupos houve diferença significativa entre G1 e G2 e entre G1 e G3 (tabela 17).

Tabela 16 – Escore de inflamação lobular nos 3 grupos

INFLAMAÇÃO LOBULAR	G1		G2		G3	
	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual
0	2	15,4%	12	100,0%	9	100,0%
1	9	69,2%	0	0,0%	0	0,0%
2	2	15,4%	0	0,0%	0	0,0%
Total	13	100,0%	12	100,0%	9	100,0%

Tabela 17 – Comparação entre dois grupos quanto a inflamação lobular

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p*
G1 x G2	< 0,001
G1 x G3	< 0,001
G2 x G3	---

* Teste exato de Fisher, $p < 0,017$ (correção de Bonferroni)



Figura 10 - Foco de inflamação lobular em coelho do G1, grupo controle (HE - 400 X)

4.6.4 Balonização de hepatócitos

A balonização ocorreu nos 3 grupos, sendo que no G1 30,8% dos coelhos tiveram o escore de balonização máximo (tabela 18). Todos os coelhos do G2 tiveram o menor escore de balonização (figura 11), todavia, analisando a presença ou ausência de balonização, não houve diferença significativa entre os 3 grupos.

Tabela 18 – Escore de balonização de hepatócitos nos 3 grupos

ESCORE DE BALONIZAÇÃO	G1		G2		G3	
	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual
0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	9	69,2%	12	100,0%	9	100,0%
2	4	30,8%	0	0,0%	0	0,0%
Total	13	100,0%	12	100,0%	9	100,0%

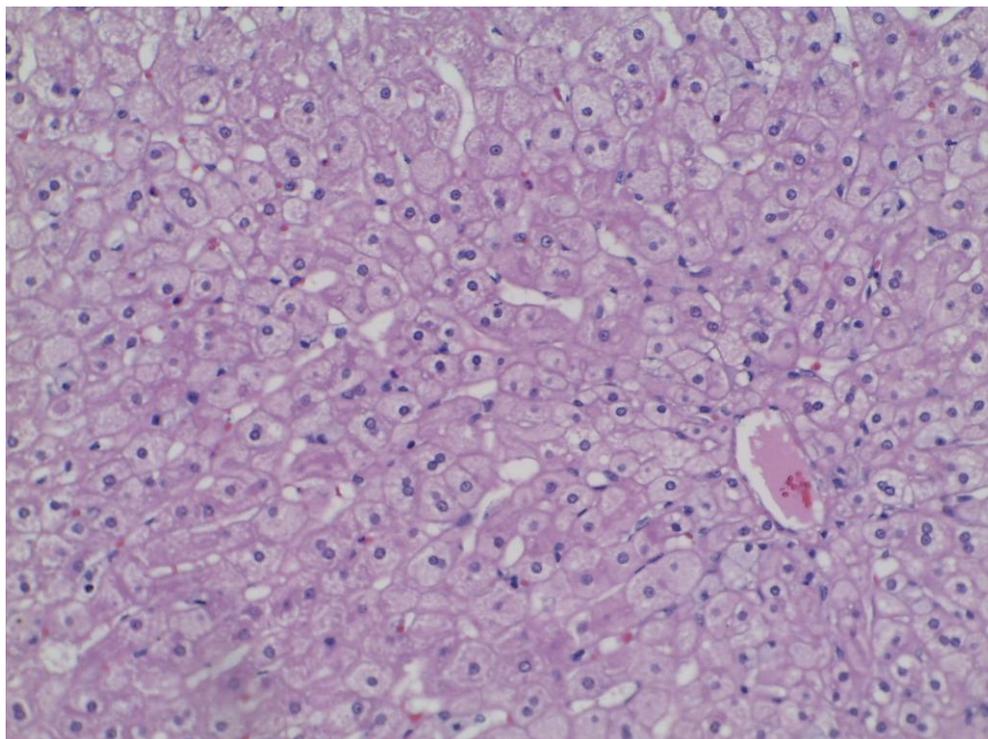


Figura 11 – Lóbulo hepático com hepatócitos contendo citoplasmas discretamente alargados e tumefeitos, núcleos vesiculosos balonização escore 1 em coelho do G2, grupo olmesartana (HE - 200X)

4.6.5 Escore de atividade da DHGNA

Quanto ao escore de atividade da DHGNA (EAD), seis coelhos do G1 (46,1%) tiveram escore entre 3 e 4, seis coelhos ≥ 5 (46,1%) e um coelho teve o escore 2 (7,7%). No G2, 50% dos coelhos tiveram escore 2 e 50% escore entre 3 e 4. Todos os coelhos do G3 tiveram escore 1 (tabela 19).

Tabela 19 – Escore de atividade da DHGNA nos 3 grupos

EAD	G1		G2		G3	
	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual	Nº de coelhos	Percentual
0 a 2	1	7,7%	6	50,0%	9	100,0%
3 a 4	6	46,1%	6	50,0%	0	0,0%
≥ 5	6	46,1%	0	0,0%	0	0,0%
Total	13	100,0%	12	100,0%	9	100,0%

A comparação entre os 3 grupos mostrou diferença significativa ($p < 0,001$); tabela 20. Na comparação entre 2 grupos, o EAD foi significativamente maior no G1 comparado ao G2 e ao G3 ($p < 0,001$ para ambas) e também significativamente maior no G2 quando comparado ao G3 ($p < 0,001$); tabela 21.

Tabela 20 – Comparação entre os 03 grupos quanto ao EAD

GRUPO	N	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p*
G1	13	4,0	2	7	<0,001
G2	12	2,5	2	4	
G3	9	1,0	1	1	

* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Tabela 21 – Comparação entre 2 grupos quanto ao EAD

GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p*
G1 x G2	< 0,001
G1 x G3	< 0,001
G2 x G3	< 0,001

* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

Vários estudos contribuíram para uma melhor compreensão da DHGNA desde a sua descrição como entidade clínica distinta em 1980¹. Contudo, apesar desses esforços, até o momento não temos dados suficientes para determinar seu tratamento padrão, sendo a recomendação geral o tratamento dos fatores comumente associados a essa doença, como a obesidade, RI, DM tipo 2, dislipidemia e HAS.

Os resultados do PIVENS⁹⁸, favoráveis a vitamina E e desfavoráveis a pioglitazona quanto ao desfecho primário, provavelmente estimularão novos estudos para avaliar a vitamina E e até mesmo outros antioxidantes no tratamento da DHGNA. Estudos randomizados prévios, com amostras e período de duração menores, mostraram resultados diferentes do PIVENS, sendo promissores os resultados da pioglitazona^{91,93} e pouco expressivos^{117,118} ou inexpressivos⁸⁸ os da vitamina E no tratamento da DHGNA. Em um desses estudos, 45 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA foram randomizados para receberem vitamina E 1000 UI/dia associada a vitamina C 1000 mg/dia ou placebo por 06 meses. Houve melhora do escore de fibrose, porém não houve melhora da atividade necroinflamatória ou dos níveis de ALT¹¹⁷. Em outro estudo, também placebo-controlado, o desfecho primário foi a normalização da ALT e a remissão da esteatose avaliada por meio de ultrassom. Após 05 meses, não houve diferença entre o grupo vitamina E e o placebo¹¹⁸. Posteriormente, a vitamina E foi utilizada em pacientes com diagnóstico histológico de DHGNA, na dose de 800 UI/dia por 12 meses. Em relação ao desfecho primário, que foi a normalização da ALT, a vitamina E foi inferior ao placebo (19% e 31% respectivamente), embora não tenha havido significância estatística⁸⁸.

Os três estudos terapêuticos citados^{117,118,88} foram incluídos em meta-análise, cuja a conclusão não foi favorável ao uso dos antioxidantes no tratamento da DHGNA³. Do mesmo modo, a conclusão da meta-análise que

avaliou os estudos que testaram os sensibilizadores da insulina, não foi favorável ao uso das mesmas como tratamento da DHGNA⁵, porém além de um estudo piloto que comparou a vitamina E com a associação da mesma e a pioglitazona⁹⁴ nenhum outro estudo que avaliou as tiazolidinedionas foi incluído. Previamente a publicação do PIVENS, duas meta-análises colocaram sob questionamento a segurança cardiovascular das tiazolidinedionas^{96,97}. Portanto, até o momento, mantém-se aberta a discussão a respeito do tratamento farmacológico, específico, da DHGNA.

A ativação do sistema renina-angiotensina parece estar envolvida em todos os pontos básicos do processo patológico da DHGNA. Achados de modelos experimentais sugerem um papel importante da ANG 2 na indução do estresse oxidativo e na resposta inflamatória⁶, bem como na fibrogênese hepática⁷. A relação, também importante, entre a ativação do sistema renina-angiotensina e a resistência insulínica tem sido mostrada em experimentos⁹ e a melhora da sensibilidade insulínica com o uso de inibidores do receptor AT1 da ANG 2 relatada em modelos experimentais⁹ e estudos clínicos¹¹.

Em outros modelos animais a olmesartana e a telmisartana, usadas preventivamente, mostraram resultados significativos. A telmisartana atenuou significativamente a esteatose hepática em ratos submetidos à dieta rica em lipídeos¹³ e em hidratos de carbono e lipídeos¹⁴. A olmesartana atenuou marcadamente a esteatose hepática em ratos também submetidos à dieta hiperlipídica¹⁷. Em modelo animal de EHNA (ratos submetidos a dieta deficiente em metionina e colina), a olmesartana também atenuou significativamente a esteatose¹⁸. Neste experimento, 50% dos coelhos do grupo olmesartana (G2) tiveram o menor escore de esteatose (1) e apenas um coelho (7,7%) do grupo controle (G1) teve o mesmo escore. O escore máximo (3) ocorreu em 16,7% do grupo olmesartana e em 38,5% do grupo controle. A comparação entre os dois grupos mostrou diferença significativa ($p=0,013$) indicando que a olmesartana atenuou significativamente o desenvolvimento de esteatose.

Em estudo piloto, no qual sete pacientes portadores de EHNA e hipertensão arterial sistêmica receberam losartana potássica por 48 semanas, cinco desses pacientes tiveram melhora do grau de inflamação hepática¹⁰⁰. No presente estudo a inflamação lobular ocorreu em 11 (84,6%) dos 13 coelhos do grupo controle, em sua maioria (69,2%) teve o menor escore (1), no entanto,

nenhum coelho do grupo olmesartana desenvolveu tal alteração. Houve diferença significativa entre os dois grupos caracterizando que a olmesartana preveniu a inflamação lobular ($p < 0,001$).

Em outros experimentos que também usaram a olmesartana preventivamente, houve atenuação significativa da fibrogênese hepática avaliada por meio da fração volumétrica de colágeno hepático¹⁷ e da histopatologia¹⁸. Neste experimento, a fibrose que ocorreu em 46,2% do grupo controle foi tênue (score 1), porém a mesma não ocorreu no grupo olmesartana. A diferença entre os dois grupos foi significativa ($p < 0,001$), o que é indicativo de que a olmesartana também preveniu o desenvolvimento de fibrose. Apesar de se ter citado um estudo piloto e experimentos que utilizaram modelos animais diferentes quanto a espécie, mecanismo de indução da DHGNA ou composição da dieta, os resultados podem ser considerados consonantes.

O EAD, pertencente ao sistema de score para a avaliação histológica da DHGNA, que corresponde a soma não ponderadas dos scores de esteatose, inflamação lobular e balonização de hepatócitos, se relacionou adequadamente com a presença de EHNA quando ≥ 5 , com a ausência quando ≤ 2 e não teve valor discriminativo entre 3 e 4 no estudo realizado para sua validação¹¹⁶. Neste estudo o NAS ≥ 5 ocorreu em 46,1% do grupo controle e não ocorreu em nenhum coelho do grupo olmesartana; o NAS ≤ 2 ocorreu em apenas um coelho do grupo controle (7,7%) e em 50% do grupo olmesartana. A comparação entre os dois grupos mostrou diferença significativa ($p < 0,001$), indicando que a olmesartana preveniu significativamente o desenvolvimento de EHNA.

Em relação às aminotransferases, houve aumento significativo da AST sem aumento concomitante da ALT nos grupos controle e olmesartana. Os níveis de AST no grupo controle, na eutanásia, foram significativamente mais altos que no grupo olmesartana. Além disso, não houve diferença significativa entre o grupo olmesartana e o grupo normal. Em alguns estudos que propuseram modelos experimentais de EHNA, em coelho, semelhantes ao usado neste estudo, as aminotransferases não alteraram significativamente em relação ao grupo normal¹¹⁹⁻¹²¹ ou a alteração mais pronunciada foi da AST¹²².

Neste modelo houve aumento marcado dos níveis de colesterol, significativo dos níveis de triglicérides e não houve alteração significativa dos níveis de HDL-colesterol em oito semanas. Os níveis de colesterol total e triglicérides no final do estudo foram semelhantes nos grupos controle e olmesartana, mostrando que não houve influência da olmesartana nos mesmos. Os níveis de glicemia foram semelhantes nos três grupos e significativamente mais baixos na eutanásia. Portanto não há dados indicativos de que a glicemia tenha influenciado os resultados ou de que houve influência da olmesartana na glicemia. Apesar de ter havido diferença significativa quanto ao peso dos coelhos no início e no final do estudo, como o ganho de peso dos três grupos foi semelhante e a média de peso do final do estudo foi maior no grupo olmesartana, acredita-se que este fato não influenciou os resultados.

O coelho foi pouco utilizado como modelo animal de DHGNA e a maioria dos modelos propostos apresentam diferenças principalmente no método de indução da doença. No presente estudo, o modelo utilizado também apresenta algumas particularidades, entretanto, assim como os outros modelos citados, pode contribuir para o desenvolvimento de um modelo padrão de DHGNA experimental em coelhos.

Os achados do presente estudo caracterizam um efeito preventivo da olmesartana no modelo de DHGNA experimental utilizado. A análise histológica, que foi baseada nos parâmetros do sistema de score para a avaliação histológica da DHGNA¹¹⁶, mostrou ação significativa nas principais alterações histopatológicas que compõem o espectro da doença em foco. Estudos subseqüentes são necessários para sedimentar tais achados e conseqüentemente abrir uma possibilidade de terapêutica coadjuvante para pacientes hipertensos com o diagnóstico de DHGNA e principalmente preventiva para hipertensos com fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença.

6 CONCLUSÃO

No modelo experimental utilizado a olmesartana atenuou significativamente a esteatose hepática, preveniu o desenvolvimento de inflamação lobular e fibrose e, com base no escore de atividade da DHGNA, preveniu significativamente o desenvolvimento de esteatohepatite não alcoólica.

7 REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1221-31.
3. Lirussi F, Azzalini L, Orando S, Orlando R, Angelico F. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (1):CD004996.
4. Orlando R, Azzalini L, Orando S, Lirussi F. Bile acids for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (1):CD005160.
5. Angelico F, Burattin M, Alessandri C, Del Ben M, Lirussi F. Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (1):CD005166.
6. Bataller R, Gabele E, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(3):G642-51.
7. Bataller R et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112(9):1383-94.
8. Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension.* 2002;40:872-9.
9. Zhou MS, Schulman IH. Prevention of diabetes in hypertensive patients: Results and implications from the VALUE trial. *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5(1):361-8.

10. Okada K, Hirano T, Raan J, Dachi M. Olmesartan Medoxomil, an Angiotensin II Receptor Blocker Ameliorates Insulin Resistance and Decreases Triglyceride Production in Fructose-Fed Rats. *Hypertens Res.* 2004; 27(4):293-9.
11. Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M, Coleman CI. The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28(9):2261-6.
12. Toblli JE, Muñoz MC, Cao G, Mella J, Pereyra L, Mastai R. ACE inhibition and AT1 receptor blockade prevent fatty liver and fibrosis in obese Zucker rats. *Obesity.* 2008; 16(4):770-6. Abstract.
13. Araki K et al. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension.* 2006; 48(1):51-7.
14. Sugimoto K et al. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension.* 2006; 47(5):1003-9.
15. F. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264(3):224-36.
16. Yokozawa J, Sasaki T, Ohwada K, Sasaki Y, Ito JI, Saito T. Down-regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 expression by angiotensin II receptor blocker in the obese fa/fa Zucker rat: possible role in amelioration of insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol.* 2009; 44(6):583-91.
17. Yamamoto E et al. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. *Hypertension.* 2008; 52(3):573-80.
18. Hirose A et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007; 45(6):1375-81.
19. Zhou YJ et al. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(47):6419-24.
20. Jimba S et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med.* 2005; 22(9):1141-5. Abstract.

21. Chen CH et al. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population of taiwan:metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(8):745-52. Abstract.
22. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease:The dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42(1):44-52.
23. Browning JD et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States:impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40(6):1387-95.
24. Angulo P. GI Epidemiology:nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2007; 25 (8):883-9.
25. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98: 960-7.
26. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis:summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003; 37(5):1202-19.
27. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998; 47(5):699-713.
28. Kim WR, Brown RS Jr, Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002; 36:227- 42.
29. Angulo P et al. The NAFLD fibrosis score:a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007; 45(4):846-54.
30. Chitturi S, Farrell GC, Hashimoto E, Saibara T, Lau GKK, Sollano JD. Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region:definitions and overview of proposed guidelines. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(6):778-87.
31. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl. 1): S99-S112.
32. Ekstedt M et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006; 44(4):865-73.

33. Söderberg C, Stål P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*. 2010; 51(2):595-602.
34. Hui JM et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(2):420-7.
35. Fielding BA, Frayn KN. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br J Nutr*. 1998; 80(6):495-502.
36. Yu YH, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res*. 2005; 96(10):1042-52.
37. Campbell PJ, Carlson MG, Hill JO, Nurjhan N. Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *Am J Physiol*. 1992; 263(6 pt 1):E1063-9.
38. Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*. 1998; 273(1):215-21.
39. Langin D, Holm C, Lafontan M. Adipocyte hormonesensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 1996; 55(1b):93-109.
40. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007; 87(2):507-20.
41. Carbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid Metabolism in the liver. *Z Gastroenterol*. 2007; 45(1) 35-41.
42. Shulman GI et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004; 279(31):32345-53.
43. Shulman GI et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2007; 117(3):739-45.
44. Nagle CA et al. Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem*. 2007; 282(20):14807-15.

45. Kim J K et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissuespecific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(13):7522-27.
46. Farese RV Jr et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab.* 2007; 6(1):69-78.
47. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1785-88.
48. 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.
49. Chen H et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1821-30.
50. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115(5):1111-19.
51. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF alpha function. *Nature.* 1997; 389:610-14.
52. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95(5):2409-15.
53. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995; 95(5):2111-19.
54. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* 2004; 30(2):121-38.
55. Sterhauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(5 suppl):779S-86S.
56. Singh R, Czaja MJ. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(suppl 1):S45-S48.

57. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1998; 27(1):128-133.
58. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000; 105(8):1067-75.
59. Musso G et al. Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(3):661-71.
60. Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22(suppl 1): S73-S78.
61. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(2):G245-9.
62. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115 (2): 209-18.
63. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis:the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004; 39(2):273-8.
64. Ueberham E, Löw R, Ueberham U, Schönig 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.
65. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome:focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14(suppl 1):41S-49S.
66. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2005; 112 (20):3066-72.
67. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver:a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(1):27-38.
68. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. Adults. *Diabetes Care* 2004; 27(10): 2444-9.

69. Hamaguchi M et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.* 2005; 143(10):722-8.
70. Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome:the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2005; 54(11):3140-7.
71. Hanley AJ et al. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes:the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2004; 53(10):2623-32.
72. Marchesini G et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4):917-23.
73. Targher G et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; 29(6):1325-30.
74. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis:a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(5):1045-50.
75. Akabame S et al. Evaluation of vulnerable coronary plaques and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by 64-detector multislice computed tomography (MSCT). *Circ J.* 2008; 72(4):618-25.
76. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men:role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care* 2004; 27(10):2498-2500
77. Targher G et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with carotid artery wall thickness in diet-controlled type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 2006; 29(1):55-60.
78. Villanova N et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42(2):473-80.
79. Hamaguchi M et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(10):1579-84.
80. Targher G et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54(12):3541-6

81. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30(6):1356-62.
82. Szczepaniak LS et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content:prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 ;288(2):E462-8.
83. Bellentani S, Dalle Grave R, Suppini A, Marchesini G. Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease:the need for a multidisciplinary approach. *Hepatology* 2008; 47:746-54.
84. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis:Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49(1):306-17.
85. Siebler J, Galle PR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12(14):2161-7.
86. Méndez-Sánchez N, Arrese M, Daniel Zamora-Valdés D, Uribe M. Treating nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International* 2007; 27(9):1157-65.
87. Uygun A et al. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19(5):537-44.
88. Bugianesi E et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(5): 1082-90.
89. Tiikkainen M,et al. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53(8):2169-76.
90. Ratziu V et al. 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. Abstract.
91. Belfort R,et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355(22):2297-307.
92. Promrat K et al. A Pilot Study of Pioglitazone Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39(1):188-96.

93. Aithal GP et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 135(4):1176-84. Abstract.
94. Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK. 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. Abstract.
95. Chan HL-Y, Silva HJ, Leung NW-Y, Lim S-G, Farrell GC. How should we manage patients with non-alcoholic fatty liver disease in 2007? *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(6):801-8.
96. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; 356(24):2457-71.
97. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *The Lancet* 2007; 370(9593):1129-36. Abstract.
98. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010; 362(18):1675-85.
99. Lam B, Younossi MZ. Treatment Options for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ther Adv Gastroenterol.* 2010; 3(2):121-37.
100. Yokohama S et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40(5):1222-5.
101. Enjoji M et al. Therapeutic effect of ARBs on insulin resistance and liver injury in patients with NAFLD and chronic hepatitis C: a pilot study. *Int J Mol Med.* 2008; 22(4):521-7.
102. Yoshida K, Kohzuki M. Clinical and experimental aspects of olmesartan medoxomil, a new angiotensin II receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22(4):285-308.
103. Laeis P, Püchler K, Kirch W. The pharmacokinetic and metabolic profile of olmesartan medoxomil limits the risk of clinically relevant drug interaction. *J Hypertens* 2001; 19(Suppl 1):S21-S32.

104. Mizuno M, Sada T, Ikeda M, et al. Pharmacology of CS-866, a novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1995;285:181–88.
105. Schwocho LR, Masonson HN. Pharmacokinetics of CS-866, a new angiotensin II receptor blocker, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2001;41:515–17.
106. von Bergmann K, Laeis P, Püchler K, Sudhop T, Schwocho LR, Gonzalez L. Olmesartan medoxomil: Influence of age, renal and hepatic function on the pharmacokinetics of olmesartan medoxomil. *J Hypertens* 2001;19(Suppl 1):S33–S40.
107. Neutel JM, Elliott WJ, Izzo JL, Chen CL, Masonson HN. Antihypertensive efficacy of olmesartan medoxomil, a new angiotensin II receptor antagonist, as assessed by ambulatory blood pressure measurement. *J Clin Hypertens* 2002;4:325–31.
108. Ferraro C. Effect of angiotensin receptor blockade on endothelial function: focus on olmesartan medoxomil. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5(1):301-14.
109. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Muramatsu M, Miyazaki M. The regressive effect of an angiotensin II receptor blocker on formed fatty streaks in monkeys fed a high-cholesterol diet. *J Hypertens* 2005;23(10):1879–86.
110. Tsuda M, Iwai M, Li JM, et al. Inhibitory effects of AT1 receptor blocker, olmesartan, and estrogen on atherosclerosis via anti-oxidative stress. *Hypertension* 2005;45(4):545–51.
111. Kato M, Sada T, Chuma H, et al. Severity of hyperlipidemia does not affect antiatherosclerotic effect of an angiotensin II receptor antagonist in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47(6):764–69.
112. Koga K, Yamagishi S, Takeuchi M, et al. CS-886, a new angiotensin II type 1 receptor antagonist, ameliorates glomerular anionic site loss and prevents progression of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Mol Med* 2002;8(10):591–99.
113. Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y, Nishiyama A. Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(7):2073–80.
114. Nangaku M, Miyata T, Sada T, et al. Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1212–22.
115. Comissão de ética no uso de animais de experimentação da Fundação Oswaldo Cruz. Manual de utilização de animais. Internet. Disponível:

<http://sistemas.cpqam.fiocuz.br/ceua/hiceuaaw000.aspx>. Acesso em: 02 set. 2009.

116. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41(6):1313-21.
117. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98(11): 2485-90. Abstract.
118. Vajro P, Mandato C, Franzese A, Ciccimarra E, Lucariello S, Savoia M. Vitamin E Treatment in Pediatric Obesity-Related Liver Disease: A Randomized Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 38(1); 48-55.
119. Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N, Tsuneyama K, Cheng C, Takano Y. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol* 2006; 41(10):971-80.
120. Fujimoto M, Tsuneyama K, Kainuma M, Sekiya N, Goto H, Shimada Y. Evidence-based efficacy of Kampo formulas in a model of non alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* 2008; 233(3):328-37.
121. Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Kawada N. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2007; 170(3):967-80.
122. Fu JF, Fang YL, Liang L, Wang CL, Hong F, Dong GP. A rabbit model of pediatric nonalcoholic steatohepatitis: the role of adiponectin. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(8):912-8.

ANEXO

Parecer do comitê de ética no uso de animais.



PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer nº: 240/08 CEUA PUCPR

Registro do projeto no CEUA: 307

Data do parecer: 25/02/2008

Título do Projeto:

Efeito do telmisartan no conteúdo lipídico hepático, peso corporal e perfil glicídico e lipídico, de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica

Pesquisador responsável:

Dalton Bertolin Précoma

Equipe da pesquisa:

Mario Claudio Soares Sturzeneker

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento - Categoria C

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Coelhos albinos machos (Oryctolagus cuniculus)	Macho	30 dias; 2,5 kg	30

O colegiado do CEUA em reunião no dia 14/02/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do

pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2008.

Atenciosamente



Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR



PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À DISSERTAÇÃO

Apresentação como tema livre oral no 65º Congresso Brasileiro de Cardiologia em 26 de setembro de 2010.

Apresentação como pôster comentado no 13º Congresso Sul Brasileiro de Cardiologia em 13 de novembro de 2010.

Classificação em 1º lugar na modalidade pôster comentado no 13º Congresso Sul Brasileiro de Cardiologia em 13 de novembro de 2010.

Artigo aceito para publicação na revista Atherosclerosis em 28 de janeiro de 2011.

Certificado



**Congresso Brasileiro
de Cardiologia**

Cód. CNA: 19120
20 pontos

Certificamos que **Mário Claudio Soares Sturzeneker**

Participou do 65º Congresso Brasileiro de Cardiologia, com carga horária total de 32 horas, realizado no período de 25 a 29 de setembro de 2010, na Cidade de Belo Horizonte - MG, na qualidade de

Autor(a) do Tema Livre: "Nº 35 - A AÇÃO DA OLMESARTANA NA PREVENÇÃO DA ESTEATOHEPATITE EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.", apresentado na Sessão: Temas Livres Oraís "[8450] Cardiologia Experimental: Fisiologia; Farmacologia e Biologia Molecular", realizada no dia 26/09/2010. **Participaram deste trabalho os seguintes Co-Autores:** Marcia Olandoski; Ana Flavia Champoski; Leonardo Brandão Prêcoma; Thais Isabel Lumikoski; Guilherme Winter; Denise Sbrissia E Silva; Dalton Bertolim Prêcoma.

Belo Horizonte, 29 de setembro de 2010.


Mário Claudio Soares Sturzeneker
Presidente do 65º Congresso
Brasileiro de Cardiologia


Jorge Ilha Guimarães
Presidente da Sociedade
Brasileira de Cardiologia

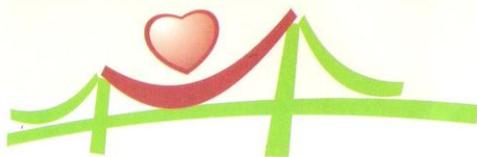

Angelo Anello Vincenzo de Paola
Diretor Científico
da Sociedade Brasileira de Cardiologia

Organização



Apoio





XIII Congresso Sul Brasileiro de Cardiologia
XI Congresso Catarinense de Cardiologia

FLORIANÓPOLIS | SC | 11 a 13 de novembro de 2010
Majestic Palace Hotel

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho **AÇÃO PREVENTIVA DA OLMESARTANA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA INDUZIDA POR DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA** de autoria de Mario Sturzeneker, Monica Olímpia Dall'oglio Poletti, Pedro Henrique Caron, Leonardo Brandão Précoma, Thais Isabel Lumicoski, Lizandréia Baroncini, Sergio Ioshii, Dalton Bertolim Précoma foi apresentado na modalidade "Pôster Comentado".

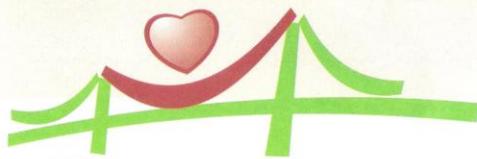
Florianópolis, 13 de novembro de 2010


Amberson Vieira de Assis
Presidente da Comissão Científica
do Congresso


Marcos Venício Garcia Joaquim
Presidente do Congresso


Ilhéu Pereira Filho
Presidente da SBC - SC





XIII Congresso Sul Brasileiro de Cardiologia
XI Congresso Catarinense de Cardiologia

FLORIANÓPOLIS | SC | 11 a 13 de novembro de 2010
Majestic Palace Hotel

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho **AÇÃO PREVENTIVA DA OLMESARTANA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA INDUZIDA POR DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA** de autoria de Mario Sturzeneker, Monica Olímpia Dall&Lsquo;Oglio Poletti, Pedro Henrique Caron, Leonardo Brandão Précoma, Thais Isabel Lumicoski, Lizandréia Baroncini, Sergio Ioshii, Dalton Bertolim Précoma foi classificado em **primeiro lugar** na modalidade **Pôster Comentado**.

Florianópolis, 13 de novembro de 2010


Amberson Vieira de Assis
Presidente da Comissão Científica
do Congresso


Marcos Venício Garcia Joaquin
Presidente do Congresso


Ilhéu Pereira Filho
Presidente da SBC - SC





Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

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

Olmesartan severely weakened the development of NASH in an animal model of hypercholesterolemia

Mário Cláudio Soares Sturzeneker, Sergio Ossamu Ioshii, Liz Andréa Villela Baroncini*, Dalton Bertolim Prêcoma

Center of Health and Biological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, Avenida Iguacu 1325, ap. 101B, 1155, Prado Velho, CEP 80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2010
Received in revised form 14 January 2011
Accepted 28 January 2011
Available online xxx

Keywords:

Olmesartan
Hepatic cirrhosis
Non-alcoholic fatty liver disease

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by a broad spectrum of liver damage. In a rat model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), olmesartan attenuated steatosis and fibrosis.

Objective: To assess the potential preventive action of olmesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on NAFLD in hypercholesterolemic rabbits.

Methods: Thirty-four white adult male rabbits were selected. The animals were divided into three groups: group I (GI), control group, 13 rabbits; group II (GII), olmesartan group, 12 rabbits; and group III (GIII), normal group, 9 rabbits. The animals from GI and GII were fed with a specific diet plus 1% cholesterol. Animals from GIII were fed only with a specific diet. The GII animals were treated with olmesartan.

Results: Steatosis was present in all animals from GI and GII; no steatosis was observed in animals from GIII. When GI and GII were compared, the steatosis had higher scores in GI ($p < 0.013$). Perisinusoidal and periportal fibrosis occurred in 46.2% of the animals from GI. There was no fibrosis in GII or GIII. Lobular inflammation occurred in 84.6% of the animals from GI. Animals from GII and GIII had no inflammation. The NAFLD activity score was higher in animals from GI when compared to animals from GII and GIII ($p < 0.001$ for both groups); the NAFLD score was significantly higher in animals from GII when compared to animals from GIII ($p < 0.001$).

Conclusions: In hypercholesterolemic rabbits, olmesartan significantly attenuated hepatic steatosis and prevented the development of lobular inflammation and liver fibrosis. Based on the NAFLD activity score, olmesartan significantly weakened the development of NASH in rabbits fed a high cholesterol diet.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by a broad spectrum of liver damage, ranging from steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis and cirrhosis. It can affect people of any age and has been described in various racial groups [1]. It is estimated that its prevalence in developed countries varies between 20% and 30% among adults [2–4]. It has been described as the most common cause of abnormal liver tests in adults [3] and maybe the most common form of chronic liver disease in the USA [3,5]. Its prevalence is increasing in developed countries [6], parallel with the prevalence of obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [7]. Steatosis alone may have a benign clinical course, but 10–20% of patients with NAFLD develop non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [8]; further, 15% of patients with NASH develop

cirrhosis [9] and 12% die related to hepatic complications [8]. The pathogenesis of NAFLD remains unclear and, despite several studies testing multiple drugs, its treatment remains undefined. A recent meta-analysis demonstrated that there is insufficient data to recommend anti-oxidants [10], bile acids [11] or insulin sensitizers [6] as treatments for NAFLD. Experimental models have suggested that angiotensin II plays an important role in oxidative stress, inflammatory response [12] and hepatic fibrogenesis [13], and the results of experiments using angiotensin receptor blockers suggest positive effects of this therapeutic class in NAFLD. Telmisartan [14,15] and olmesartan [16], angiotensin II type 1 blockers, prevented steatosis in animal models of obesity in rats. Also, in an animal model of NAFLD in rats, olmesartan, used preventively, attenuated steatosis; this effect was more pronounced in fibrosis [17]. Based on published data, it is known that telmisartan has partial PPAR γ agonist action that is associated with reduced levels of glucose, triglyceride and insulin resistance in an animal model of high-fat, high-carbohydrate diet. In the same study, this PPAR γ action is not observed with olmesartan [18]. It seems that preventive action of

* Corresponding author. Tel.: +55 41 32712285; fax: +55 41 32711657.
E-mail address: lizandreabaroncini@hotmail.com (L.A.V. Baroncini).

olmesartan is exclusively related to angiotensin II type I receptor blockade [17]. Therefore, based on such findings, we conducted this study to assess if olmesartan, has potential preventive action on NAFLD in hypercholesterolemic rabbits.

2. Methods

2.1. Animals

Thirty-four white adult male rabbits (New Zealand), with a mean age of 3.7 months, were selected for this study. Animals were handled in compliance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, and protocol approval was obtained from the Pontifical Catholic University Animal Research Committee. The animals were divided into three groups: group I (GI), control group, 13 rabbits; group II (GII), olmesartan group, 12 rabbits; and group III (GIII), normal group, 9 rabbits. During the 56 day study, the animals from GI and GII were fed a specific diet (Nuvilab®) plus 1% cholesterol (Sigma–Aldrich®). This diet (Nuvilab®) does not alter lipid metabolism of the animals. For the GII diet, 1 mg/kg/day of olmesartan (commercially available from Sankio) was administered by oral gavage from day 1 through day 56. On day 56, the animals from GI and GII were submitted to liver resection. Animals from GIII were fed only a specific diet (Nuvilab®) and were submitted to liver resection on day 28. Anesthesia was induced with ketamine (Vetanarcol®, König; 30 mg/kg) and intramuscular xylazine (Coopazine®, Coopers; 6 mg/kg). After the procedure, the rabbits were sacrificed by a lethal barbiturate dose.

2.2. Blood chemistry

Blood samples were obtained on the first day of the experiment and also immediately before sacrifice by cardiac puncture. Clinical laboratory assessment included fasting serum glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TGC), creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). Measurements were taken using an automated system (Abbott Architect ci8200; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

2.3. Histological analysis

The liver segments were removed and fixed with 10% formaldehyde buffered with phosphate (pH=7.6) and then paraffin embedded. Three slices with two histological sections were prepared, one with a left medial lobe liver sample and one with a quadrade lobe liver sample. One slice was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and two slices were stained with periodic acid Schiff (PAS) and Gomori's trichrome. The slices were analyzed blindly for steatosis, lobe inflammation, hepatic cell balonization, and fibrosis status according to the histological score system for NAFLD [19] using a five-head Olympus® BX 40 microscope.

2.4. Statistical analysis

Categorical variables were expressed as percentages and continuous variables were expressed as mean \pm SD and medians. The Shapiro–Wilks test was used for testing sample normality. For quantitative parameters, the Student *t*-test and Mann–Whitney nonparametric test were used for the comparison between groups. Fisher's exact test was used for qualitative or categorical variables. Statistical significance was indicated by a value of $p < 0.05$. For multiple comparisons through Fisher's exact test the level of significance was correct by Bonferroni. Therefore, for these comparisons, statistical significance was indicated by a value of $p < 0.017$. Analy-

ses were performed using Statistica/W version 5.1 (StatSoft, Tulsa, OK).

3. Results

3.1. Metabolic and lipid profiles

Animal weight gain did not differ among the groups between baseline and euthanasia (Table 1). Baseline glucose, TC, HDL-C, TGC, creatinine, urea, AST, and ALT levels were not different among all groups before initiation of the diet. Serum glucose levels were significantly decreased in all three groups at the euthanasia, when compared to the beginning (Table 2). Graded elevations in TC and TGC levels were observed from the initial phase until sacrifice without significant differences between GI and GII. Levels of HDL-C were similar between GI and GII (Table 3). Creatinine and urea levels were also similar at the end of the study between GI and GII (data not show). Graded elevations in AST levels were observed from the initial phase until sacrifice in GI and GII. However, in GI the difference between initial phase and sacrifice and the percentage variation of levels of AST were higher than in GII. Levels of ALT were similar among groups throughout the study (Table 2).

3.2. Histological analysis

Steatosis was present in all animals from GI and GII, but was not seen in animals from GIII. When GI and GII were compared, the steatosis score was significantly different between the groups, with higher scores in GI ($p < 0.013$). The pattern of steatosis was microvesicular (GI and GII 100%), and pan-acinar distribution occurred in 53.8% of GI and 16.7% of GII animals (Fig. 1). Perisinusoidal and periportal fibrosis occurred in 46.2% of the animals from GI. There was no fibrosis in GII and GIII (Fig. 2). Lobular inflammation (grades 0–2) occurred in 84.6% of the animals from GI. Animals from GII and GIII had no lobular inflammation (score 0). Hepatic cell balonization occurred in all animals, without significant differences among GI, GII, and GIII. The NAFLD activity score was significantly higher in animals from GI when compared to animals from GII and GIII ($p < 0.001$ for both); the NAFLD score was higher in animals from GII when compared to animals from GIII ($p < 0.001$) (Table 4).

4. Discussion

The activation of the renin–angiotensin system appears to be involved in the pathological process of NAFLD. Findings from experimental models suggest a role of angiotensin II in the induction of oxidative stress, inflammatory response [12] and liver fibrogenesis [13]. Also, the relationship between the activation of the renin–angiotensin system and insulin resistance has been shown experimentally [20]. Improved insulin sensitivity with the use of the angiotensin II receptor blockers has been reported in two experimental models using obese Zucker rats and fructose fed rats with irbesartan and olmesartan respectively [21,22], as well as clinical studies [23]. In other animal models, olmesartan and telmisartan, used preventively, showed important results. Telmisartan significantly attenuated hepatic steatosis in rats with a diet rich in lipids [14] and carbohydrates and lipids [15]. Olmesartan markedly attenuated hepatic steatosis in rats also subjected to high fat diet [16]. In an animal model of NASH (rats submitted to methionine and a choline-deficient diet), olmesartan also significantly attenuated steatosis [17]. In the present study, 50% of animals from GII (olmesartan group) had the lowest possible score of steatosis (grade 1) and only one animal (7.7%) from GI (control group) had the same score. The maximum score (grade 3) occurred in 16.7% of the olmesartan group and in 38.5% of the control group. The between-groups

Table 1
Weight variation between groups.

Weight	Group	n	Mean ± sd	p
Basal (B)	GI	13	2862.31 ± 164.67	<0.001 ^a
	GII	12	3091.25 ± 96.06	
	GIII	9	2640.00 ± 239.44	
Euthanasia (E)	GI	13	3206.92 ± 240.24	0.022 ^b
	GII	12	3493.75 ± 301.79	
Difference (E – B)	GI	13	344.62 ± 256.88	0.406 ^b
	GII	12	402.50 ± 250.88	
Variation (%)	GI	13	12.27 ± 9.35	0.650 ^b
	GII	12	12.94 ± 8.10	

Difference E – B, difference between euthanasia and baseline.

^a ANOVA, $p < 0.05$.^b Mann-Whitney test, $p < 0.05$.**Table 2**
Serum biochemical parameters at baseline and euthanasia.

Group	GL (mg/dl) mean ± sd	AST (IU/L) mean ± sd	ALT (IU/L) mean ± sd
Baseline (B)			
GI	196.69 ± 28.18	26.00 ± 7.85	40.92 ± 19.19
GII	219.33 ± 31.15	35.75 ± 16.06	40.67 ± 14.62
GIII	205.89 ± 49.20	37.00 ± 18.80	49.44 ± 21.90
Euthanasia (E)			
GI	170.46 ± 35.82	69.00 ± 42.38 ^b	42.38 ± 16.40
GII	168.00 ± 33.02	43.7521.54 ±	41.42 ± 14.69
GIII	170.56 ± 31.48	34.0017.94 ±	50.44 ± 21.91
Difference E – B			
GI	–26.23 ± 39.98	43.00 ± 41.50 ^b	1.46 ± 16.25
GII	–51.33 ± 32.24	8.00 ± 23.32 ^a	0.75 ± 10.21
GIII	–35.33 ± 36.43	–3.0022.67 ±	1.00 ± 13.16
Percentage variation			
GI	–12.09 ± 21.01	178.47 ± 183.69 ^b	13.97 ± 49.80
GII	–22.80 ± 13.89	41.68 ± 100.46 ^a	6.88 ± 35.66
GIII	–15.47 ± 14.36	5.4060.11 ±	5.47 ± 25.13

Data represent means. GI, control group; GII, olmesartan group; GIII, normal group; GL, glucose; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; difference E – B, difference between euthanasia and baseline.

^a $p < 0.005$ compared with the G1.^b $p < 0.005$ compared with the G3.

comparison revealed a significant difference ($p = 0.013$), indicating that olmesartan attenuated the development of steatosis. In a pilot study, 7 patients with NASH and hypertension received losartan for 48 weeks; overall, 5 of these patients had improvement in the degree of hepatic inflammation [24]. In the present study, lobular inflammation occurred in 11 (84.6%) of 13 animals in the control group. The majority of animals (69.2%) from the control group had the lowest possible score (grade 1). However, no animals from the olmesartan group developed any sign of inflammation. There was a significant difference between the two groups,

demonstrating that olmesartan prevented lobular inflammation ($p < 0.001$). In both studies cited above, which also used olmesartan preventively, there was attenuation of liver fibrogenesis. The study that used rats submitted to a high-fat diet showed that olmesartan markedly prevented the increase in hepatic collagen volume fraction and transforming growth factor $\beta 1$ mRNA expression [16]. In one study with an animal model of NASH, histological analysis revealed significant reduction of development of liver fibrosis with olmesartan [17]. In the present study, mild fibrosis (grade 1) occurred in 46.2% of the control group, but, it did not occur in

Table 3
Serum lipids at baseline and euthanasia.

Group	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	TGC (mg/dl)
Baseline (mean ± sd)			
GI	41.31 ± 20.03	18.92 ± 9.11	46.46 ± 16.37
GII	50.67 ± 18.15	21.50 ± 6.13	61.83 ± 43.54
Euthanasia (mean ± sd)			
GI	2146.77 ± 471.20	24.92 ± 6.96	168.46 ± 79.58
GII	2079.50 ± 799.59	24.42 ± 7.73	214.83 ± 126.61
Difference E – B (mean ± sd)			
GI	2105.46 ± 478.90	6.00 ± 9.51	122.00 ± 70.02
GII	2028.83 ± 786.47	2.92 ± 8.26	153.00 ± 118.28
Percentage variation (mean ± sd)			
GI	6522.18 ± 3963.28	68.73 ± 113.87	271.93 ± 165.68
GII	4128.40 ± 1149.44	18.67 ± 44.19	348.06 ± 319.42

Data represent means. GI, control group; GII, olmesartan group; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; TGC, triglycerides; difference E – B, difference between euthanasia and baseline. None of the measured parameters did differ significantly between GI and GII.

Please cite this article in press as: Sturzeneker MCS, et al. Olmesartan severely weakened the development of NASH in an animal model of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* (2011), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.047

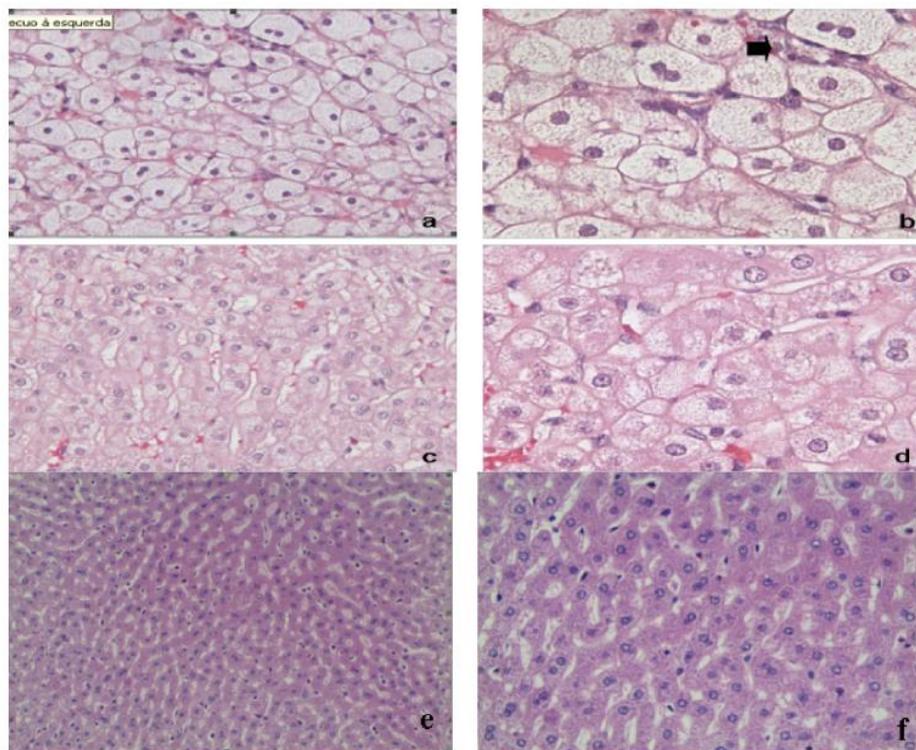


Fig. 1. (a) Hepatocytes with cytoplasmic swelling and microvesicular steatosis are seen diffusely in the lobule; control group (hematoxylin and eosin stain). (b) Higher magnification showing the microvesicular steatosis and focus of lobular inflammation (arrow); control group (hematoxylin and eosin stain). (c) Rabbit treated with olmesartan with minor degree of steatosis; olmesartan group (hematoxylin and eosin stain). (d) Higher magnification showing the degree of steatosis and absence of fibrosis (hematoxylin and eosin stain). (e) Liver of normal group with preserved lobular architecture (hematoxylin and eosin stain). (f) Higher magnification showing no steatosis in normal group (hematoxylin and eosin stain).

the olmesartan group. The difference between the two groups was highly significant ($p < 0.001$), which indicates that olmesartan also prevented the development of fibrosis. Although we have cited a pilot study and experiments that used different species of animal models, different mechanisms of induction of NAFLD and differ-

ent diet compositions, the results are in agreement. The NAFLD activity score (NAS) is defined as the unweighted sum of the scores for steatosis (0–3), lobular inflammation (0–3), and hepatocellular ballooning (0–2). Cases with an NAS of 0–2 were generally not considered diagnostic of steatohepatitis; most cases with score of ≥ 5

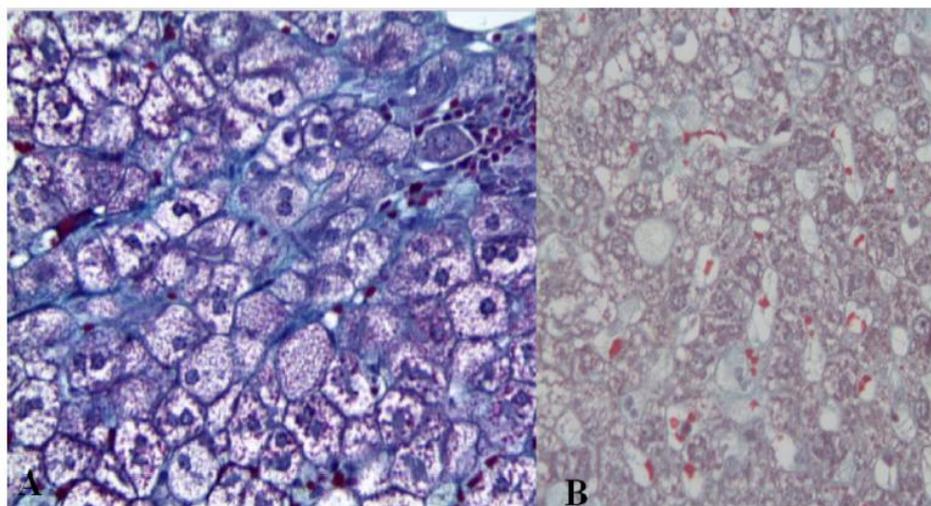


Fig. 2. (A) Pericellular fibrosis observed in the control group (Gomori stain); (B) higher magnification liver lobe of olmesartan group. No fibrosis is seen (Gomori stain).

Table 4
Results of histological analysis.

Item	Definition	Score	Percentage for group		
			G1	G2	G3
Steatosis grade	<5%	0	0.0%	0.0%	100.0%
	5 a 33%	1	7.7%	50.0%	0.0%
	>33 a 66%	2	53.8%	33.3%	0.0%
	>66%	3	38.5%	16.7%	0.0%
Fibrosis stage	None	0	53.8%	100.0%	100.0%
	Perisinusoidal or periportal	1	46.2%	0.0%	0.0%
Lobular inflammation	No foci	0	15.4%	100.0%	100.0%
	<2 foci per 200× field	1	69.2%	0.0%	0.0%
	2–4 foci per 200× field	2	15.4%	0.0%	0.0%
	>4 foci per 200× field	3	0.0%	0.0%	0.0%
Hepatocellular ballooning	None	0	0.0%	0.0%	0.0%
	Few balloon cells	1	69.2%	100.0%	100.0%
	Many cells/prominent ballooning	2	30.8%	0.0%	0.0%
NAS	Not NASH	0–2	7.7%	50.0%	100%
	Borderline	3–4	46.1%	50.0%	0.0%
	NASH	≥5	46.1%	0.0%	0.0%

NAS, non-alcoholic fatty liver disease activity score; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

were diagnosed as steatohepatitis; and cases with activity scores of 3 and 4 were divided almost evenly between the 3 diagnostic categories (NASH, borderline, or not NASH) in the study performed for their validation [19]. In the present study, an NAFLD activity score ≥ 5 occurred in 46.1% of the control group and in none of the animals from the olmesartan group. An NAFLD activity score ≤ 2 occurred in only one animal from the control group and in 50% of animals from the olmesartan group. The comparison between the two groups showed a significant difference ($p < 0.001$), indicating that olmesartan significantly prevented the development of NASH. When evaluating the aminotransferases, a significant increase was seen in AST levels, without a concomitant increase in ALT levels. Levels of AST in the control group at euthanasia were significantly higher than in the olmesartan group. Also, no significant difference occurred in AST between the olmesartan group and the normal group. In other studies that used rabbit models of NASH, similar to the present study, aminotransferase activity either did not change significantly compared to the normal group [25–27] or the more pronounced change was seen in AST levels [28]. In the present model, there was a marked increase in TC and TGC levels, but no significant change in HDL-C, over 8 weeks. The levels of TC and TGC at the end of the study were similar in the control group and the olmesartan group, showing that Olmesartan did not affect their levels. Glucose levels were similar in all three groups, and significantly lower at euthanasia time than at the beginning of the study. However, there is no data indicating that blood glucose levels influenced the results or that olmesartan influenced blood glucose levels. There were significant differences in the weight of the animals at the beginning and end of study; weight gain in the three groups was similar, but the average weight at the end of study was greater in the olmesartan group than in the other two groups. We believe that this fact did not influence the results. Experimental animal models of NAFLD with rabbits are used infrequently and most of the proposed models differ in the method of disease induction. In our study, the chosen model has some unique features, such as the ease of inducing hypercholesterolemia and atherosclerotic lesions. Also the relatively low cost of this type of experiment facilitates the development of the study of atherosclerosis in other organs. Tannock and King [29] recently concluded that the scientific community should be aware of and consider the use of new models of atherosclerosis to advance our understanding of the process involved in atherogenesis and its complications.

Still, this model can contribute to the development of a standard model of experimental NAFLD in rabbits. The findings of the present study characterize a preventive effect of olmesartan in experimental models of NAFLD. Histological analysis, which was based on the parameters of the scoring system for assessing NAFLD [19], showed significant action in the major histopathological changes that make up the spectrum of the disease. Further studies are needed to solidify these findings and, thus, define an adjuvant curative therapy for hypertensive patients with NAFLD or preventive therapy for hypertensive patients with risk factors for the development of this disease.

5. Conclusions

In hypercholesterolemic rabbits, olmesartan significantly attenuated hepatic steatosis and prevented the development of lobular inflammation and liver fibrosis. Based on the NAFLD activity score, olmesartan significantly weakened the development of NASH in rabbits fed a high cholesterol diet.

References

- [1] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Engl J Med* 2002;346(16):1221–31.
- [2] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40(6):1387–95.
- [3] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98:960–7.
- [4] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42(1):44–52.
- [5] Kim WR, Brown Jr RS, Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002;36:227–42.
- [6] Angelico F, Burattin M, Alessandri C, Del Ben M, Lirussi F. Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD005166.
- [7] Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45(4):846–54.
- [8] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl. 1):S99–112.
- [9] Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003;37(5):1202–19.
- [10] Lirussi F, Azzalini L, Orlando S, Orlando R, Angelico F. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD004996.

Please cite this article in press as: Sturzeneker MCS, et al. Olmesartan severely weakened the development of NASH in an animal model of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* (2011), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.047

- [11] Orlando R, Azzalini L, Orando S, Lirussi F. Bile acids for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(January (1)):CD005160.
- [12] Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, et al. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(3):G642–51.
- [13] Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(9):1383–94.
- [14] Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* 2006;48(1):51–7.
- [15] Sugimoto K, Qi NR, Kazdová L, Pravenec M, Ogihara T, Kurtz TM. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 2006;47(5):1003–9.
- [16] Yamamoto E, Dong YF, Kataoka K, et al. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. *Hypertension* 2008;52(3):573–80.
- [17] Hirose A, Ono M, Saibara T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45(June (6)):1375–81.
- [18] Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension* 2004;43:993–1002.
- [19] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41(6):1313–21.
- [20] Zhou MS, Schulman IH. Prevention of diabetes in hypertensive patients: Results and implications from the VALUE trial. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5(1):361–8.
- [21] Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 2001;38:884–90.
- [22] Higashiura K, Takada T, Li Y, et al. The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2000;13:290–7.
- [23] Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M, Coleman CI. The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28(9):2261–6.
- [24] Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, et al. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004;40(5):1222–5.
- [25] Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N, et al. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol* 2006;41(10):971–80.
- [26] Fujimoto M, Tsuneyama K, Kainuma M, et al. Evidence-based efficacy of Kampo formulas in a model of non alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* 2008;233(3):328–37.
- [27] Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2007;170(3):967–80.
- [28] Fu JF, Fang YL, Liang L, Wang CL, Hong F, Dong GP. A rabbit model of pediatric nonalcoholic steatohepatitis: the role of adiponectin. *World J Gastroenterol* 2009;15(8):912–8.
- [29] Tannock LR, King VL. Animal models of atherosclerosis: more than mice. *Atherosclerosis* 2010;212(1):32–3.